

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jörg Schipper

„Vergleich von Expressionsraten von CRHR1, CRHR2
sowie MC2-Rezeptoren in Nasenschleimhäuten von Patienten mit
chronischer Rhinosinusitis mit und ohne Polyposis Nasi sowie mit und ohne
allergischer Rhinitis“

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sandra Ines Büter

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referent: Prof. Dr. med. Martin Wagenmann

Koreferent: PD Dr. med. Kerim Beseoglu

Für meine Mutter

Zusammenfassung

Die chronische Rhinosinusitis (CRS), die mit oder ohne nasale Polypen (NP) auftreten kann, ist eine inflammatorische Erkrankung multifaktorieller Genese der Nasenhaupt- und -nebenhöhlen. Eine Trennlinie im Pathomechanismus der CRSw/sNP kann bislang nicht definiert werden.

Stress ist ein immunmodulierender Faktor und wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) reguliert. *Corticotropin-Releasing-Hormon* (CRH) und *Urocortin* (UCN) sowie das *Adrenocorticotrope Hormon* (ACTH) sind wichtige Modulatoren der HHN-Achse. Durch chronischen Stress kann es zu Veränderungen der physiologischen Regulierungsmechanismen der HHN-Achse kommen. Dadurch kann das Immunsystem gestört, proinflammatorische Prozesse ausgelöst sowie chronisch entzündlichen Erkrankungen exazerbiert werden.

In diesem Kontext ist es interessant, ob CRH, UCN sowie ACTH und die zugehörigen Rezeptoren CRH-Rezeptor 1 und 2 (CRHR1/2) sowie der Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R) bei der CRS sowie bei der Allergischen Rhinitis (AR) einen regulatorischen Einfluss auf die inflammatorischen Prozesse in der Nasenschleimhaut ausüben.

Daher ist die Zielsetzung der Arbeit die Lokalisation der CRHR1, CRHR2 sowie MC2R in der NSH und mögliche Expressionsunterschiede sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nachzuweisen.

Dafür sind immunhistochemische Untersuchungen, *quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion* sowie *Western Blot*-Analysen durchgeführt worden. Für die jeweiligen Methoden ist Gewebe von Patienten mit CRSw/sNP mit und ohne Allergie verwendet worden. Für die Kontrollgruppe wurde Gewebe von gesunden Patienten entnommen, die im Rahmen einer Septumplastik, Conchotomie oder Septorhinoplastik an der Nase operiert worden sind.

CRHR1 und CRHR2 konnten sowohl mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen als auch mittels qRT-PCR nachgewiesen werden. Immunhistochemisch konnten die Rezeptoren an Gefäßendothelien in der Lamina propria und an serösen sowie mukösen Drüsenepithelien lokalisiert werden. Bei den qRT-PCR Ergebnissen zeigte sich bei Patienten mit CRSwNP mit Allergie eine signifikante Erhöhung der Expressionrate von *CRHR2* in der NSH. Die Expressionsrate von *CRHR1* wies einen vergleichbaren Trend im selben Patientenkollektiv auf. Bei Patienten mit AR konnte unabhängig von dem Vorhandensein von NP eine signifikante Erhöhung von *CRHR2* gezeigt werden. Der *MC2R* konnte weder immunhistochemisch noch mittels qRT-PCR detektiert werden.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zeigen, dass CRHR1 sowie CRHR2 eine wesentliche Rolle bei der Regulation von inflammatorischen Prozessen spielen. In Bezug auf CRS könnte insbesondere die Aktivierung der Mastzellen durch CRH und die dadurch erfolgte VEGF-Sezernierung eine denkbare Rolle spielen. Auch sollte eine mögliche Kortisonresistenz bei Patienten mit CRS in Betracht gezogen werden. Durch chronischen Stress könnten die regulatorischen Effekte der HHN-Achse gestört und so die anti-inflammatorische Wirkung von Kortison aufgehoben werden.

Chronischer Stress scheint bei AR ein pathophysiologischer Faktor zu sein, der verstärkend auf den allergischen Entzündungsprozess wirkt. Hierzu passen die Ergebnisse, die zeigen, dass insbesondere bei allergischer Entzündung der NSH vermehrt *CRHR2* exprimiert wird und auch in den immunhistochemischen Färbungen eine stärkere Färbung der Gefäßendothelien und Drüsenepithelien gezeigt werden konnte.

Da die Rezeptoren in der NSH nachgewiesen werden konnten, scheinen sie eine Rolle in der peripheren Stressregulation einzunehmen. Doch kann aktuell keine valide Aussage über die genauen funktionellen Abläufe und Effekte von peripherem CRH, UCN und den dazugehörigen Rezeptoren getroffen werden.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
A. bidest	<i>Aqua bidestillata</i>
A. dest	<i>Aqua destillata</i>
ABC	<i>Avidin-Biotin-Complex</i>
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AFRS	<i>Allergic Fungal Rhinosinusitis</i>
AK	Antikörper
AR	Allergische Rhinitis
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CP	<i>Crossing Point</i>
CRH	<i>Corticotropin-Releasing-Hormon</i>
CRHR1	<i>Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 1</i>
CRHR2	<i>Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 2</i>
CRS	Chronische Rhinosinusitis
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddCt	delta-delta-Ct-Methode
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
EAACI	<i>European Academy of Allergology and Clinical Immunology</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FESS	<i>Functional Endoscopic Sinus Surgery</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
gDNA	<i>Genomic deoxyribonucleic acid</i>
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse
IHC	Immunhistochemie
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

INF-γ	Interferon-gamma
MC2R	Melanocortin-2-Rezeptor
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μl	Mikroliter
Min	Minute
MMP	Matrix Metalloproteinase
MW	Mittelwert
N.	Nervus
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
NM	Nasenmuscheln
NP	Nasenpolypen
NSH	Nasenschleimhaut
OMK	Osteomeataler Komplex
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion
RAST	Radioallergosorbent Test
RLT-Puffer	Qiagen Lysepuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RPE-Puffer	Qiagen Waschpuffer
RW1-Puffer	Qiagen Waschpuffer
SCIT	Subkutane Immuntherapie
SDS	<i>Sequencing Detection System</i>
sIg	spezifisches Immunglobulin
SIT	Spezifische Immuntherapie
SLIT	Sublinguale Immuntherapie
SP	Substanz P
TGF-β	<i>Transforming-Growth-Factor-beta</i>
UV	Ultraviolett
UCN	<i>Urocortin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial Growth Factor</i>

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Anatomie und Physiologie der Nase	1
1.2 Rhinosinusitis	3
1.2.1 Chronische Rhinosinusitis	4
1.2.1.1 Chronische Rhinosinusitis ohne Nasenpolypen	7
1.2.1.2 Chronische Rhinosinusitis mit Nasenpolypen	8
1.2.2 Allergische Rhinitis	9
1.3 Stress als immunmodulierender Faktor	12
1.3.1 Stress und HHN-Achse	12
1.3.2 CRH, Urocortin und CRHR1/2	13
1.3.3 Stress, Immunsystem und Allergie	14
2 HYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	17
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Patientenkollektiv	18
3.1.1 Einschlusskriterien	18
3.1.2 Erhebung des <i>Lund-Scores</i>	18
3.1.3 Prick-Test	19
3.1.4 Gesamt- und spezifisches-IgE	19
3.2 Gewebeproben	20
3.3 Material	20
3.3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	20
3.3.2 Substanzen und Lösungen	22
3.4 Methoden	24
3.4.1 Immunhistochemie	24
3.4.1.1 Gewebeeinbettung	24
3.4.1.2 Gewebe schneiden	25
3.4.1.3 Positivgewebe	25
3.4.1.4 Färbung	25
3.4.2 RNA-Isolierung	26
3.4.2.1 Konzentrationsbestimmung der RNA	28
3.4.2.2 Qualitätskontrolle der RNA	29
3.4.3 cDNA-Synthese	29
3.4.4 Qualitätskontrolle der cDNA	30
3.4.5 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	32
3.4.5.1 Primer-Design	33
3.4.5.2 Durchführung	34

3.4.5.3 Datenauswertung	35
3.4.5.4 Statistische Auswertung	36
3.4.6 Western Blot	36
3.4.6.1 Proteinextraktion	36
3.4.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	36
3.3.6.3 Überprüfung der Antikörper	37
3.3.6.4 Zelllinien	37
3.3.6.5 Blotten	37
4 ERGEBNISSE	40
4.1. Patientenkollektiv	40
4.2 Qualitative und morphologische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	41
4.2.1 Übersicht	41
4.2.2 CRHR1	42
4.2.3 CRHR2	47
4.2.4 MC2R	52
4.3 Western Blot	53
4.4 Quantitative RT-PCR	55
4.4.1 Übersicht	55
4.4.2 CRHR1	56
4.4.3 CRHR2	59
5 DISKUSSION	62
5.1 Ergebniskritik	62
5.1.1 CRH und UCN als Modulatoren bei inflammatorischen Prozessen	63
5.1.2 CRH und UCN als Modulatoren bei AR	65
5.1.3 Periphere HHN-Achse	68
5.2 Allgemeine Methodenkritik	69
5.2.1 Probanden	69
5.2.2 Probenentnahme	71
5.2.3 Immunhistochemie	72
5.2.4 qRT-PCR	73
5.2.5 Western Blot	74
5.3 Schlussfolgerung	76
7 LITERATURVERZEICHNIS	78
8 DANKSAGUNG	91
9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	92

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Diagnosekriterien der CRS modifiziert nach EPOS 2012	4
Abb. 2:	Coronare CT-Aufnahmen von Nasennebenhöhlen (aus dem Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf)	5
Abb. 3:	Immunhistochemische Austestung der CRHR1-, CRHR2- und MC2R-AK am Positivgewebe mit jeweiliger Negativkontrolle in 50x (A1-A2) und 100x (B1-C2) Vergrößerung	41
Abb. 4:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 im Gewebe von drei Patienten der Kontrollgruppe in 100x (A-B) und in 25x (C) Vergrößerung	43
Abb. 5:	Negativkontrolle der Abb. 4 C in 50x Vergrößerung	43
Abb. 6:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 im Gewebe von drei Patienten mit CRSsNP ohne Allergie in 50x (A1), 100x (A2, C) und 400x (B) Vergrößerung	44
Abb. 7:	Negativkontrolle der jeweiligen Proben in Abb. 6 in 50x (A, C) und 25x (B) Vergrößerung	44
Abb. 8:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 im Gewebe von drei Patienten mit CRSsNP mit Allergie in 200x (A, C2), 100x (B) und 50x (C1) Vergrößerung	45
Abb. 9:	Negativkontrolle der jeweiligen Proben in Abb. 8 in 50x (A), 100x (B) und 25x Vergrößerung	45
Abb. 10:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 im Gewebe von zwei Patienten mit CRSwNP ohne Allergie in 100x (A1, A2, B) Vergrößerung	46
Abb. 11:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 in Gewebe von zwei Patienten mit CRSwNP mit Allergie in 200x (A) und 100x (B) Vergrößerung	46
Abb. 12:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 im Gewebe von zwei Patienten der Kontrollgruppe in 200x (A, B1) und 50x (B2) Vergrößerung	47
Abb. 13:	Negativkontrolle der jeweiligen Proben in Abb. 12 in 50x (A) und 25x (B) Vergrößerung	48
Abb. 14:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 in Gewebe von zwei Patienten mit CRSsNP ohne Allergie in 100x (A1) und 200x (A2-B2) Vergrößerung	48
Abb. 15:	Negativkontrolle der Abb. 14 A in 50x Vergrößerung	48
Abb. 16:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 in CRSsNP mit Allergie-Gewebe von 3 Patienten in 400x (A,C1) und 200x (B,C2) Vergrößerung	49
Abb. 17:	Negativkontrolle der jeweiligen Proben in Abb. 16 in 50x (A,B) und 100x (C) Vergrößerung	49
Abb. 18:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 im Gewebe von drei Patienten mit CRSwNP ohne Allergie in 200x (B) und 100x (A,C) Vergrößerung	50
Abb. 19:	Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 im Gewebe von zwei Patienten mit CRSwNP mit Allergie in 200x (A2, B) und 100x (A1) Vergrößerung	51
Abb. 20:	Immunhistochemischer Nachweis von MC2R in CRSsNP ohne und mit Allergie- Gewebe von 2 Patienten in 100x (A1), 200x (A2, B2) und 50x (B1) Vergrößerung	52
Abb. 21:	CRHR1 AK-Testung	54
Abb. 22:	CRHR2-AK-Testung	54
Abb. 23:	RNA-Qualitätskontrolle	55
Abb. 24:	Expressionsunterschiede von <i>CRHR1</i> in den abgebildeten Gruppen in Bezug auf die Kontrollgruppe	56

Abb. 25: Expressionsunterschiede von <i>CRHR1</i> bei CRSwNP im Vergleich zu CRSsNP in Bezug auf die Kontrollgruppe	57
Abb. 26: Expressionsunterschiede von <i>CRHR1</i> bei CRS mit Allergie im Vergleich zu CRS ohne Allergie in Bezug auf die Kontrollgruppe	57
Abb. 27: Einfluss des <i>Lund-Scores</i> auf die <i>CRHR1</i> Expression bei CRS in Bezug auf die <i>CRHR1</i> Expression bei einem <i>Lund-Score</i> ≤ 10	58
Abb. 28: Expressionsunterschiede von <i>CRHR2</i> in den abgebildeten Gruppen in Bezug auf die Kontrollgruppe	59
Abb. 29: Expressionsunterschiede von <i>CRHR2</i> bei CRSwNP im Vergleich zu CRSsNP in Bezug auf die Kontrollgruppe	60
Abb. 30: Expressionsunterschiede von <i>CRHR2</i> bei CRS mit Allergie im Vergleich zu CRS ohne Allergie in Bezug auf die Kontrollgruppe	60
Abb. 31: Einfluss des <i>Lund-Scores</i> auf die <i>CRHR2</i> Expression bei CRS in Bezug auf die <i>CRHR2</i> Expression bei einem <i>Lund-Score</i> ≤ 10	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Punktwertvergabe beim <i>Lund-Score</i>	18
Tabelle 2: Verwendete Primär-AK in der IHC	26
Tabelle 3: Stammlösung 1 zur Elimination genomischer DNA	29
Tabelle 4: Stammlösung 2 für reverse Transkription	30
Tabelle 5: Stammlösung für PCR-Kontrolle	30
Tabelle 6: β_2 -Mikrotubulin 5'- und 3'-Primersequenzen	31
Tabelle 7: Verwendete Primer-Paare für <i>MC2R</i> , <i>CRHR1</i> , <i>CRHR2</i> und <i>GAPDH</i>	34
Tabelle 8: Stammlösung für die qRT-PCR	34
Tabelle 9: Mastermix für SDS-PAGE	38
Tabelle 10: verwendete AK im WB	39
Tabelle 11: Sekundär-AK im WB	39
Tabelle 12: Charakteristika des Patientenkollektivs	40
Tabelle 13: Ausprägung der Expressionsrate	56
Tabelle 14: Ausprägung der Expressionsrate von <i>CRHR1</i> in den einzelnen CRS-Gruppen	59

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Nase

Der Nasen-Rachen-Raum gehört zu den oberen Atemwegen und dient der Fortleitung des Luftstroms sowie zur Anfeuchtung und Erwärmung der eingeatmeten Luft.

Den äußeren Zugang der Nase bilden die Nasenlöcher, die in den Nasenvorhof (*Vestibulum nasi*) führen. Das *Vestibulum nasi* reicht bis zur Nasenklappe, die den Übergang zur Nasenhaupthöhle bildet (Lenarz und Boenninghaus, 2012). Dahinter befinden sich die *Choanen*, die in den *Nasopharynx* münden. Die paarig angelegten Nasenhaupthöhlen werden medial durch die Nasenscheidewand bis zu den *Choanen* voneinander getrennt. Hier befinden sich die Ansatzstellen der *Concha nasalis inferior, media et superior* (NM). Die obere und mittlere NM gehören zum *Os ethmoidale*, während die untere NM einen eigenständigen Knochen (*Os turbinale*) aufweist. Gelegentlich ist eine *Concha nasalis suprema* angelegt. Im Normalfall kommen die NM nicht mit dem Septum in Berührung, so dass zwischen diesen Strukturen ein gemeinsamer Nasengang (*Meatus nasi communis*) besteht, der mit den anderen Nasengängen kommuniziert. Die NM erhalten ihre Form durch eine jeweilige Knochenlamelle, die mit schwellkörperartiger Schleimhaut überzogen ist. Jeweils unter den NM liegen die Nasengänge (*Meatus nasi inferior, medius et superior*), in die u.a. die NNH und der Tränennasengang drainieren.

Der obere Nasengang bildet die Öffnung für die *Cellulae posteriores*. Der *Sinus frontalis, maxillaris* sowie die *Cellulae ethmoidales anteriores et mediae* drainieren in den *Meatus nasi medius*. Der *Canalis nasolacrimalis* mündet in den unteren Nasengang (Aumüller und Wolff, 2010).

Die NNH sind pneumatische Räume und dienen der Gewichtsreduktion der Schädelknochen. Weiterhin sollen sie neben den Nasenhaupthöhlen als Resonanzräume den individuellen Klang der Stimme beeinflussen, was allerdings bisher nicht sicher nachgewiesen worden ist (Benninghoff und Christ, 2008; Lenarz und Boenninghaus, 2012). Man unterscheidet die paarigen *Sinus maxillares, frontales* sowie *sphenoidales* und die *Cellulae ethmoidales*. NNH-Ostien, *Infundibulum ethmoidale* und angrenzende anatomische Strukturen bilden eine funktionelle Einheit und werden als *OMK* bezeichnet.

Die Nase wird topographisch-histologisch in die *Regio cutanea, respiratoria* sowie *olfactoria* unterteilt. Zu der *Regio cutanea* gehört das *Vestibulum nasi*, das mit mehrschichtigem, verhorntem Plattenepithel ausgekleidet ist und borstenartige Haare enthält, die als erster Filter der Atemluft fungieren. Am *Ostium internum* verliert das

Epithel die Hornschicht und geht in das respiratorische mehrreihige Flimmerepithel über (Aumüller und Wolff, 2010).

Der respiratorische Abschnitt nimmt den größten Teil in der Nasenhöhle ein, der sich über die mittlere und untere NM, das kaudale Septum sowie die NNH erstreckt. Der überwiegende Teil der NSH wird durch mehrreihiges, zilientragendes Zylinderepithel ausgekleidet, das mit Stützzellen und sekretorischen Becherzellen durchsetzt ist. Der Zilienschlag erreicht eine Geschwindigkeit von ca. 3-12 mm pro Minute und ist in Richtung *Pharynx* gerichtet (Lenarz und Boenninghaus, 2012). Die Becherzellen und die seromukösen Drüsen der *Propria* produzieren die muköse Schicht der Epitheloberfläche, in der Glykoproteine, antibakterielle Proteine (*Lysozym*, *Laktoferrin*), *Immunglobuline* und *Proteaseinhibitoren* enthalten sind. Exogene Partikel und Bakterien werden in dem mukösen Film gelöst, durch sekretorische Enzyme inaktiviert und schließlich durch den mukoziliären Transport in den *Nasopharynx* transportiert (Lenarz und Boenninghaus, 2012; Benninghoff und Christ, 2008).

Die NM dienen der Oberflächenvergrößerung und Erzeugung einer turbulenten Strömung. Mit Hilfe venöser Schwellkörper in den NM wird die Atemluft auf etwa 36°C erwärmt (Benninghoff und Christ, 2008). Das alternierende An- und Abschwollen der NM wird als nasaler Zyklus bezeichnet und folgt einer drei bis vier Stunden Rhythmik (Mirza *et al.*). Ein weiterer Schutzmechanismus für die unteren Atemwege ist die Befeuchtung der eingeatmeten Luft durch Produktion von Nasensekret und Wasserverdunstung auf eine Luftfeuchtigkeit von ca. 70–80% (Benninghoff und Christ, 2008).

Die *Regio olfactoria* ist auf der oberen NM, am Nasendach und am oberen Septum lokalisiert. Sie besteht aus primär bipolaren Riechzellen, Stützzellen sowie Basalzellen. Olfaktorische Drüsen produzieren ein Sekret für Riechstoffe. Die *Fila olfactoria* ziehen durch die *Lamina cribrosa* und schließen sich zum *Bulbus olfactorius* zusammen (Aumüller und Wolff, 2010).

Die Gefäßversorgung der vorderen und hinteren Nasenabschnitte erfolgt getrennt. Der obere Teil der Nasenhöhle wird durch die *A. ethmoidalis anterior* und *posterior* aus der *A. carotis interna* versorgt. Der untere Abschnitt, die laterale Nasenwand und das Septums sind das Versorgungsgebiet der *A. sphenopalatina*, die aus der *A. carotis externa* entstammt (Aumüller und Wolff, 2010).

Die sensible Innervation erfolgt über den *N. ophthalmicus* und den *N. maxillaris* des *N. trigeminus*. Der vordere Bereich der Nasenhöhle wird durch den *N. ethmoidalis anterior*, der hintere durch die *Nn. nasales posteriores* versorgt. Die vegetativen Nervenfasern

lagern sich den Somatoafferenzen an. Die parasympathische Versorgung der *Glandulae nasales* wird durch den *N. petrosus major* nach Umschaltung im *Ganglion pterygopalatinum* gesichert. Die sympathische Innervation der Nasengefäße erfolgt durch den *N. petrosus profundus* (Aumüller und Wolff, 2010). Durch die parasympathische Stimulation werden die Schleimhautdrüsen zur Sekretion angeregt, so dass die NSH anschwillt. Die sympathische Innervation bewirkt eine Verminderung des arteriellen Zuflusses und führt zur Abschwellung der NSH (nasaler Zyklus).

1.2 Rhinosinusitis

Die Rhinitis ist ein entzündlicher Prozess der NSH. Meistens ist die Schleimhaut der angrenzenden NNH mitbetroffen, daher wird heute der Begriff Rhinosinusitis verwendet. Rhinosinusitis ist ein Überbegriff; die Entzündung wird multifaktoriell ausgelöst und es werden zahlreiche Subtypen in der Literatur beschrieben. Epidemiologisch gehört das Krankheitsbild zu den häufigsten Konsultationsgründen und stellt eine hohe sozioökonomische Belastung dar (Bhattacharyya, 2003).

Die Diagnose Rhinosinusitis wird unabhängig von der Ätiologie gestellt und richtet sich nach obligaten und nicht-obligaten klinischen und zusätzlichen endoskopischen sowie radiologischen Kriterien. Der Schweregrad des Krankheitsbildes kann anhand einer visuellen Analogskala (VAS) in mild (VAS = 0 – 3), moderat (VAS = 3 – 7) und schwer (VAS = 7 – 10) unterteilt werden. Ab einem VAS-Wert > 5 wird die *Quality of Life (QOL)* von den Patienten als eingeschränkt eingestuft (Lim *et al.*, 2007). Abhängig von der Beschwerdedauer wird ein akutes bzw. ein chronisches Krankheitsbild unterschieden. Eine akute Rhinosinusitis ist charakterisiert durch das vollständige Abklingen der Symptome in weniger als 12 Wochen. Anhaltende Beschwerden über 12 Wochen sprechen für eine CRS (Fokkens *et al.*, 2012).

Weitere Formen der Rhinitis sind u.a. allergische, medikamenten- oder ernährungsabhängige, hormonellbedingte, atrophische sowie idiopathische Rhinitis. Weiterhin kann eine CRS auch bei hereditären Erkrankungen wie Mukoviszidose oder dem Kartagener-Syndrom auftreten (Stuck, Boris, A., 2011). In dieser Arbeit soll insbesondere die CRS mit und ohne Polypen sowie die AR näher beschrieben werden.

1.2.1 Chronische Rhinosinusitis

CRS ist ein weltweit inzidenten Krankheitsbild. In den vereinigten Staaten von Amerika beträgt die Prävalenz etwa 13% (Pleis *et al.*, 2009), wobei Frauen etwas häufiger erkranken als Männer (Chen *et al.*, 2003). Jede Altersgruppe ist betroffen, das Vorkommen steigt jedoch mit zunehmenden Alter und stagniert ab dem 60. Lebensjahr (Chen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2010). Die Diagnosestellung erfolgt anhand der in Abb. 1 dargestellten Kriterien und kann mit Hilfe des sogenannten *Lund-Scores* radiologisch näher klassifiziert werden.

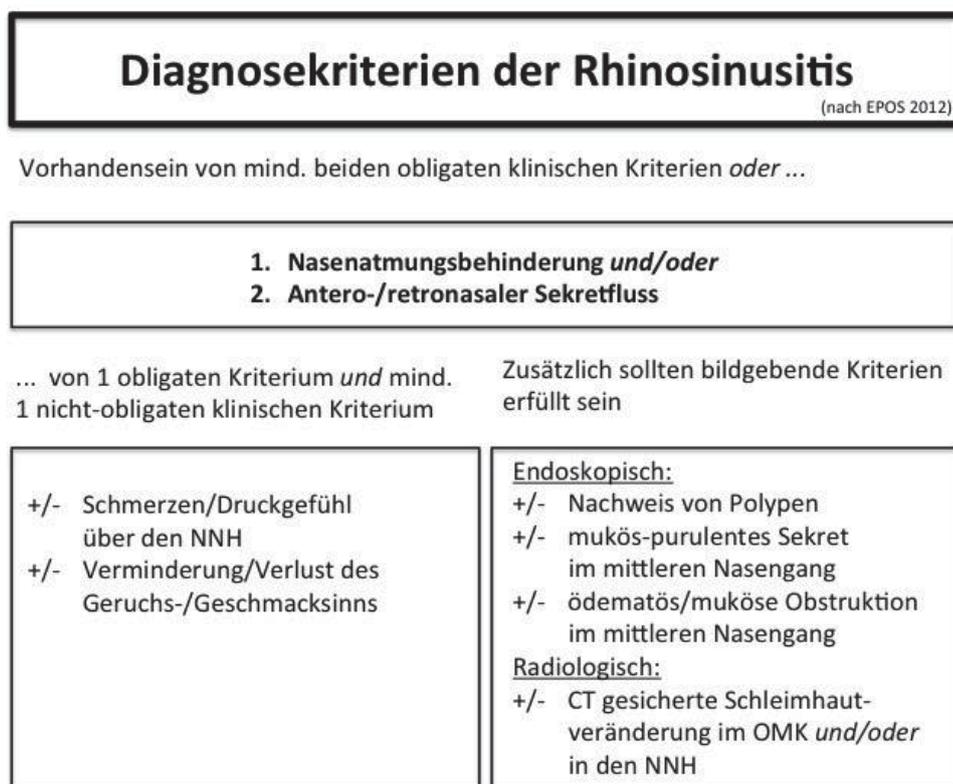


Abb. 1: Diagnosekriterien der CRS modifiziert nach EPOS 2012

Basierend auf coronaren CT-Bildern der NNH (s. Abb. 2) wird die Entzündungsausdehnung jedes Sinus seitengetreunt jeweils mit Punktwerten beurteilt (0 = keine Verlegung; 1 = partielle Verlegung; 2 = komplette Verlegung). Der OMK erhält wegen der schwierigen Beurteilung nur die Punktwerte null und zwei, so dass ein Gesamtpunktwert von 24 Punkten erreicht werden kann. Die Höhe des *Scores* korreliert mit dem Ausmaß der klinischen Symptome (Lund und Kennedy, 1997).

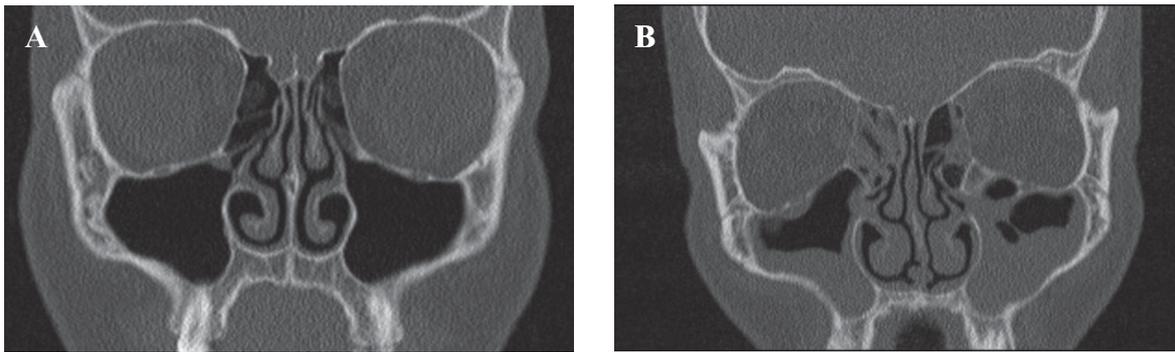


Abb. 2: Coronare CT-Aufnahmen von Nasennebenhöhlen (aus dem Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf)

A: Bild von unauffälligen NNH

B: Bild einer CRS mit Verlegung der Sinus maxillares, ethmoidales sowie beider OMK

Die Therapie von CRS ist konservativ, zunächst mittels topischer Glukokortikosteroide einzuleiten. Bei schweren Verläufen kann die systemische Gabe von Glukokortikosteroiden ggf. in Kombination mit Breitspektrumantibiotika (z.B. Aminopenicillin+Betalactamase-Inhibitor oder Cephalosporine der 2. Generation) ein möglicher Therapiansatz sein (Stuck, Boris, A., 2011). Die operative Sanierung wird bei Versagen der konservativen Therapie eingesetzt (Fokkens *et al.*, 2012). Der minimalinvasive Eingriff mittels *Functional Endoscopic Sinus Surgery* (FESS) ist die bevorzugte Vorgehensweise, es gibt jedoch auch mikroskopisch geführte oder von außen ausgehende Operationsmöglichkeiten. Im Rahmen der operativen Sanierung werden die Ventilation und die mukoziliäre Clearance wiederhergestellt.

CRS stellt sich als heterogenes Krankheitsbild multifaktorieller Genese dar. Die genaue Ätiologie ist bisher unbekannt (Fokkens *et al.*, 2012), so werden in der Literatur unterschiedliche Hypothesen diskutiert.

Zum einen die sogenannte Pilzhypothese, die auf Ponikau *et al.* zurückgeht, beinhaltet, dass ubiquitär vorkommende Pilze (vor allem *Asperigillus* und *Alternaria*) eine Erhöhung der eosinophilen Granulozyten in der NSH und im Nasensekret sowie Aktivierung der T_H2-Zellen bewirken und so den inflammatorischen Prozess auslösen (Ponikau *et al.*, 1999; Ponikau *et al.*, 2005a). In diversen Publikationen wurde diese Hypothese lange kontrovers diskutiert. So konnte beispielsweise in mehreren Studien kein signifikanter Nutzen von Antimykotika nachgewiesen werden (Ebbens *et al.*, 2009; Gerlinger *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2008; Ponikau *et al.*, 2005b).

Die Superantigen-Hypothese wurde erstmals von Bachert *et al.* beschrieben und geht davon aus, dass *S. aureus* Enterotoxine sezerniert, die als Superantigene fungieren. Diese

führen zu einer unspezifischen Aktivierung von T-Helferzellen (T_H), einer Freisetzung von Zytokinen und Auslösung einer lokalen IgE-Antwort (Bachert *et al.*, 2001; Seiberling *et al.*, 2005b). Dadurch werden vermehrt eosinophile Granulozyten rekrutiert und eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Bei ca. 50% der Patienten mit CRSwNP konnten spezifische IgE-AK gegen die Enterotoxine nachgewiesen werden (Bachert *et al.*, 2001). Bei CRSsNP und Kontrollprobanden hingegen konnte kein Nachweis erbracht werden (Seiberling *et al.*, 2005a; van Zele *et al.*, 2004).

Die Immun-Barrieren-Hypothese andererseits, geht bei der Entstehung von CRS von einer Schädigung der mechanischen Barriere und/oder des angeborenen Immunsystems des sinunasalen Epithels, ähnlich wie bei Asthma und anderen chronisch inflammatorischen Erkrankungen, aus (Kern *et al.*, 2008). Die Schädigung soll durch genetische oder umweltbedingte Einflüsse entstehen und zu einer erhöhten mikrobiellen (bakteriell bzw. fungoid) Kolonisierung führen (Tieu *et al.*, 2009). Es wird diskutiert, ob in diesem Rahmen der mikrobielle Befall eher als modifizierender Faktor und nicht als primär pathologischer Auslöser fungiert (Kern *et al.*, 2008). Auch fungoider oder bakterieller Biofilm wird als pathologischer Trigger für CRS genannt (Foreman *et al.*, 2012) und könnte bei einer Schädigung der Immun-Barriere leichter entstehen oder diese forcieren (Fokkens *et al.*, 2012).

Gemeinsam haben diese pathophysiologischen Erklärungsversuche, dass bei CRS eine T-Zell Aktivierung stattfindet, wobei die Differenzierung zu einer T_H1 - bzw. T_H2 -Antwort mit einem bestimmten Phenotyp korreliert. So ist CRSsNP vermehrt mit einer T_H1 -Antwort und CRSwNP eher mit einer T_H2 -Antwort assoziiert (van Zele *et al.*, 2006). Daher kann von zwei unterschiedlichen Entitäten ausgegangen werden.

Wie aus der Literatur hervorgeht, gibt es bis heute keinen genau definierten Pathomechanismus, sondern es wird von einem Zusammenspiel von mehreren exogenen Pathogenen, Veränderungen in der sinunasalen Mukosa, sowie einer geschädigten Immunabwehr ausgegangen (Fokkens *et al.*, 2012). Daher steht die Untersuchung der Pathogenese der CRS weiterhin im Mittelpunkt vieler Studien (Meltzer *et al.*, 2004).

1.2.1.1 Chronische Rhinosinusitis ohne Nasenpolypen

CRSsNP ist mit 60-65% die häufigste Form der CRS und umfasst Patienten mit allergischer und nicht-allergischer Rhinosinusitis und/oder mit Immundefizit. Die Patienten mit CRSsNP leiden charakteristischerweise an persistierenden Symptomen mit periodisch auftretenden Verschlechterungen (Fokkens *et al.*, 2012).

Welche Faktoren eine Auslösung bedingen, wird weiterhin diskutiert. So ist die Rolle von Atopie als Kofaktor bei CRSsNP ungeklärt und die Studienlage dazu divergent. Mehrere Studien haben ergeben, dass eine Korrelation zwischen dem Auftreten atopischer Erkrankungen und dem Ausmaß von CRSsNP besteht (Houser und Keen, 2008; Emanuel und Shah, 2000). Andere Arbeitsgruppen konnten dies nicht bestätigen und führen die Ergebnisse auf das gesteigerte Interesse der Autoren an Allergien zurück (Karlsson und Holmberg, 1994; Hinriksdóttir und Melén, 1994). Ein weiterer Faktor ist die Immundefizienz. So leiden immundefiziente Patienten deutlich öfter an einer CRSsNP (Chee *et al.*, 2001). Morphologisch-anatomische Faktoren, wie z.B. knöcherne Abwandlungen der Nasenhaupt- und -nebenhöhlen, wirken sich kaum auf die Prävalenz von CRSsNP aus (Jones, 2002).

Histopathologisch weist die NSH bei CRS eine verdickte Basalmembran, subepitheliale Ödeme, Kollagenablagerungen und hyperplastische Drüsen sowie hyperplastische Becherzellen auf. Als charakteristisches Merkmal der CRSsNP wird die Fibrosierung der NSH beschrieben. Pseudozystische Ausbildungen, wie bei CRSwNP, werden nicht beobachtet (Terrier *et al.*, 1976; Pawankar und Nonaka, 2007). Im entzündeten Gewebe konnten insbesondere mononukleäre Zellen und neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden und signifikant weniger Eosinophile als bei CRSwNP (Georgitis *et al.*, 1995).

CRSsNP ist pathophysiologisch charakterisiert durch einen T_H1 dominierten inflammatorischen Prozess mit erhöhten *Interferon-gamma* (IFN- γ) und *Transforming-growth-beta* (TGF- β) (van Zele *et al.*, 2006). TGF- β ist ein Zytokin und induziert u.a. eine Myofibroblasten-Proliferation. Diese führt vor allem zu einer Erhöhung der Kollagen-Produktion und Herunterregulation von Matrix Metalloproteinasen (MMP) sowie zur Heraufregulation von deren Inhibitoren. MMPs sind u.a. an der Rekrutierung und Migration von Immunzellen sowie insbesondere beim *Remodelling* beteiligt. Dabei fungieren sie u.a. als Kollagenasen und verhindern so eine vermehrte Kollagenproduktion und -ablagerung. Bei CRSsNP wird der fehlende Regulierungsmechanismus des

Kollagenabbau durch die verminderte MMP-Aktivität als möglicher Grund für die Fibrosierung beschrieben (McCawley und Matrisian, 2001; Watelet *et al.*, 2004).

1.2.1.2 Chronische Rhinosinusitis mit Nasenpolypen

CRSwNP kommt in allen Volksgruppen vor mit einem Altersgipfel in den mittleren Lebensjahren. Männer (54.5%) erkranken häufiger als Frauen (45.5%) mit circa 83 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Tan *et al.*, 2013).

Charakterisiert ist CRSwNP durch bilaterales Vorkommen von NP im mittleren Nasengang (Meltzer *et al.*, 2004). NP sind durchsichtige gelb-gräuliche bis weißliche Schleimhautanhängsel, die mit inflammatorischem Material gefüllt sind. Ihre Farbe ist durch ihren geringen Gefäßanteil bedingt. NP bilden sich zunächst im OMK, können aber auch im Bereich der Nasenhöhle und Sinus auftreten (Scadding *et al.*, 2008). Die genauen Auslöser für die Bildung von NP sind nicht bekannt.

Weiterhin wird eine Assoziation von CRSwNP mit Asthma bronchiale und Aspirin-Sensibilität diskutiert (Stevenson *et al.*, 2006). So wird ein sogenanntes *Samter* Syndrom oder auch eine *Samter* Trias beschrieben, die durch bilateral auftretende Polypen, Aspirin-Sensitivität und Asthma bronchiale charakterisiert ist (Fokkens *et al.*, 2012). Bei Aspirin-sensiblen Asthmatikern besteht eine Prävalenz von NPs von 60-70% im Vergleich zu 10% bei Aspirin-toleranten Asthmatikern (Fokkens *et al.*, 2012). Diese Form der CRSwNP ist durch schwere Verläufe mit erhöhter Rezidivrate von NP gekennzeichnet. Zusätzlich wird eine erhöhte Dichte von eosinophilen Granulozyten beschrieben. Diese Erhöhung soll u.a. durch eine Hochregulierung von Eosinophilen aktivierenden Zytokinen, insbesondere IL-5 ausgelöst werden (Hamilos *et al.*, 1998; Fokkens *et al.*, 2012).

Ebenso wird auch bei Asthmatikern ohne Aspirin-Sensibilität eine Assoziation mit CRSwNP in der Literatur beschrieben. Allerdings sind die Zusammenhänge noch nicht vollends verstanden (Bousquet *et al.*, 2008). Auch hier konnte eine Erhöhung von eosinophilen Granulozyten und Eosinophilen aktivierenden Zytokinen, wie beispielsweise IL-5, nachgewiesen werden (Fokkens *et al.*, 2012; Wagenmann, 2002).

Histopathologisch wird bei CRSwNP ohne Samter-Syndrom ein ödematöses Struma mit Albuminablagerung, Pseudozysten sowie eine subepitheliale und perivaskuläre Infiltration inflammatorischer Zellen beobachtet (van Crombruggen *et al.*, 2011).

CRSwNP ist eine T_H2 polarisierte Entzündung. Im polypösen Gewebe und im Nasensekret ist die Konzentration von eosinophilen Granulozyten, der Interleukine (IL)-5, -13 und IgE sowie Histamin gesteigert (Drake-Lee und McLaughlan, 1982; Bachert *et al.*,

1997). Allerdings gibt es offenbar geographische Unterschiede, deren Bedeutung letztendlich noch unklar sind. So ist bei Asiaten keine T_H2 , sondern eine T_H1 und T_H17 Polarisation nachweisbar mit Erhöhung von IL-6 und -17 sowie vorwiegend neutrophilen Granulozyten (Zhang *et al.*, 2008).

Die T_H2 -Aktivierung bewirkt bei B-Zellen durch Sezernierung von u.a. IL-4,-9 und -13 eine Differenzierung zu Plasmazellen. Letztere produzieren Immunglobulin (Ig) E, das zu einer Mastzelldegranulation und somit zu einer Histaminfreisetzung führt. IL-5, das von T_H2 gebildet wird, initiiert einen Anstieg der IgE-Synthese. Außerdem führt das Zytokin insbesondere bei Patienten mit nachgewiesenen IgE-AK gegen Staphylokokken-Enterotoxine (s. 1.2.1) zu einer verringerten Apoptose und so zu einer Erhöhung der eosinophilen Granulozyten (van Crombruggen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu CRSsNP ist bei CRSwNP zu beobachten, dass TGF- β erniedrigt und gleichzeitig MMPs erhöht sind (van Bruaene *et al.*, 2009; Watelet *et al.*, 2004). Das führt zu ödematösen Ausbildungen und einer verringerten Kollagenproduktion. Die Unausgeglichenheit der TGF- β Konzentrationen wird in aktuellen Studien als Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen den Krankheitsentitäten gewertet (van Crombruggen *et al.*, 2011).

1.2.2 Allergische Rhinitis

Die AR ist eine atopische Erkrankung, die nach Allergenexposition zu einer IgE induzierten Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp sowie zu einer allergischen Entzündung der NSH führt (Bousquet *et al.*, 2008).

Die Lebenszeitprävalenz beträgt mehr als 20% und ist in den letzten 40 Jahren kontinuierlich angestiegen (van Cauwenberge *et al.*, 2003; Beasley, 1998). Häufig ist eine Assoziation mit anderen atopischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale oder atopischer Dermatitis vorhanden (Bousquet *et al.*, 2008).

Auslösende Inhalationsallergene stammen insbesondere von Hausstaubmilben, Katzen- und Hundehaaren, Schimmelpilzsporen, Gräser-, Getreide- sowie Baumpollen. Symptome der AR sind wässrige Rhinorrhö, nasale Obstruktion, Pruritus und rezidivierendes Niesen, die bis zu Schlafstörungen und erheblichen Einschränkungen im täglichen Leben führen können (van Cauwenberge *et al.*, 2003). Diese können abhängig von der auslösenden Allergenpräsenz intermittierend (<4 Tage/Woche oder <4 aufeinander folgende Wochen) oder persistierend (>4 Tage/Woche oder >4 aufeinander folgende Wochen) auftreten. Der

Schweregrad wird je nach Symptomausprägung und -vielfalt in mild, moderat und schwer unterteilt (Bousquet *et al.*, 2008).

Die Diagnose erfolgt anhand der Anamnese, der klinischen Untersuchung und des Nachweises von spezifischem IgE durch den Haut-Prick-Test oder RAST (s. Kapitel 3.1.3 und 3.1.4). Um eine manifeste Erkrankung von einer im Haut- und Bluttest nachweisbaren Sensibilisierung zu unterscheiden, kann ein nasaler Provokationstest mit dem auslösenden Allergen durchgeführt werden. Dabei wird das vermutete Allergen auf die NSH gebracht und die folgende klinische Reaktion, wie Obstruktion, Hypersekretion, Pruritus sowie Niesen, dokumentiert und die Luftdurchgängigkeit mittels anteriorer Rhinomanometrie erfasst (Malm *et al.*, 2000).

Eine therapeutische Erstmaßnahme ist die Vermeidung auslösender Allergene. Da dies meist nicht durchführbar ist, wird die AR vor allem medikamentös behandelt (Bousquet *et al.*, 2008). Bei milden Verlaufsformen werden orale Antihistaminika eingesetzt, die den Histamin-1-Rezeptor kompetitiv hemmen und so die Wirkung von Histamin abschwächen (Naclerio and Rosenwasser, 2002). Bei moderat bis schweren Fällen wird als Mittel der ersten Wahl topische Glukokortikosteroide verwendet. Neben der antiinflammatorischen Wirkung, reduzieren sie die allergischen Symptome (s.o.). Nur bei schwer kontrollierbaren Verlaufsformen kommen systemische Glukokortikosteroide zum Einsatz und die zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen werden in Kauf genommen (van Cauwenberge *et al.*, 2003). Eine weitere Therapiemöglichkeit bei mittelschwerer bis schwerer sowie perennialen AR ist ein Nasenspray mit der Wirkstoffkombination aus Azelastinhydrochlorid (Antihistaminikum) und Fluticasonpropionat (Glukokortikoid), welches eine antihistamine, mastzellenstabilisierende, antileukotriene sowie antiinflammatorische Wirkung aufweist. Studien haben gezeigt, dass diese Wirkstoffkombination zu einer signifikanten Besserung von nasalen und okulären Symptomen führt (Klimek *et al.*, 2014).

Ein kausaler Therapieansatz ist die allergenspezifische Immuntherapie, die frühzeitig begonnen werden sollte. Durchgeführt wird die SIT als subkutane oder sublinguale Immuntherapie und wird vor allem bei Gräser- und Baumpollen, Katzen- und Hundeallergenen, Pilzsporen sowie Hausstaubmilben eingesetzt, wobei für die meisten Allergene die Wirksamkeit der SCIT noch besser untersucht ist als die der SLIT (van Cauwenberge *et al.*, 2003; Bousquet *et al.*, 1998).

Bei persistenter Hypertrophie der NM können in Einzelfällen operative Interventionen eingesetzt und die NM verkleinert werden.

Pathophysiologisch ist die AR eine Typ-1 Überempfindlichkeitsreaktion, bei der die T_H2 Immunantwort dominiert und dadurch die IgE Produktion gesteigert wird (s. Kapitel 1.2.1.2). Mastzellen sind wesentliche Effektorzellen, dabei wird je nach Lokalisation zwischen *connective tissue mast cells* und *mucosal mast cells* unterschieden. Letztere produzieren zudem IL-5 und IL-6 (Baraniuk, 1997).

In der Sensibilisierungsphase lagern sich die Allergene nach Inhalation auf der NSH ab, werden durch das Nasensekret verdünnt und diffundieren in das Gewebe. Die Allergene werden dort von antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Langerhans-Zellen, Makrophagen) aufgenommen, proteolytisch gespalten und naiven $CD4^+$ T_H0 -Lymphozyten präsentiert. Diese differenzieren sich durch spezifische Stimuli zu T_H2 -Lymphozyten (Baraniuk, 1997; Vale *et al.*, 1981).

Dadurch wird eine Prozesskaskade in Gang gesetzt, die zu einem AK-Switch führt. Dabei werden B-Zellen angeregt, die zuerst IgM-AK gegen ein spezifisches Allergen synthetisieren, sich zu Plasmazellen zu differenzieren und allergenspezifisches IgE zu produzieren. Bei erneuter Allergenexposition können diese schnell proliferieren und IgE sezernieren (Vale *et al.*, 1981).

In der Frühphase der allergischen Immunantwort bindet zirkulierendes allergenspezifisches IgE an den hochaffinen IgE-Rezeptor $Fc\epsilon RI$ auf der Membranoberfläche der Mastzellen. Dadurch kommt es zu einer Kreuzvernetzung zweier membrangebundener IgE-AK durch ein spezifisches Allergen. Hierdurch werden die Mastzellen zur Degranulation angeregt und setzen u.a. Histamin, Tryptase und IL-4 frei (Coker *et al.*, 2003; Gould *et al.*, 2003). Bei der eingeleiteten Effektorphase kommt es zur *de novo* Synthese von Prostaglandin D_2 und Leukotrienen. Histamin bindet an den H_1 -Rezeptor und stimuliert so parasympathische Nerven. Die Stimulation bewirkt neben nasaler Obstruktion durch Vasodilatation, Plasmaexsudation sowie subepithelialer Ödeme, eine Rhinorrhö durch Aktivierung nasaler Drüsen (van Cauwenberge *et al.*, 2003).

Vier bis acht Stunden danach beginnt die späte Phase der allergischen Reaktion, die durch Hypertrophie der NSH charakterisiert ist. Durch Chemokine und andere Mediatoren kommt es zu einer Infiltration der Lamina propria mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen sowie T_H2 -Zellen. Die eingewanderten Zellen sezernieren weitere proinflammatorische Mediatoren, die zu einer allergischen Entzündung führen (van Cauwenberge *et al.*, 2003; Baraniuk, 1997; Dykewicz und Hamilos, 2010).

1.3 Stress als immunmodulierender Faktor

Stress ist ein bekannter immunmodulierender Faktor und hat als solcher einen großen Einfluss auf die Entstehung und Exazerbation von Krankheiten, wie z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen, Depression, inflammatorische Prozesse und Allergien. Die Regulation von Stress erfolgt hormonell durch die hypothalamische-hypophysäre-adrenale Achse (Montoro *et al.*, 2009).

1.3.1 Stress und HHN-Achse

Jeder Organismus muss auf äußere Stressoren reagieren, um sein physiologisches Gleichgewicht zu erhalten. Ein frühes Modell dieser Adaptationsprozesse geht auf die Arbeiten von H. Selye zurück (Selye, 1950). Stress wird durch spezifische externe oder interne Stimuli (Stressoren) ausgelöst und bewirkt im Organismus physische und/oder psychische Reaktionen, die das drohende Ungleichgewicht kompensieren und das Gleichgewicht (Homöostase) wiederherstellen. Die adaptiven Reaktionen können unzureichend, anhaltend oder übermäßig ausfallen und so den Gesundheitszustand gefährden und zu Krankheiten führen (Chrousos und Gold, 1992). Die Stressreaktion eines Organismus wird von der HHN-Achse auf unterschiedlichen Ebenen beeinflusst. So führt die Aktivierung u.a. zu gesteigerter Aufmerksamkeit, Wachheit und Schmerztoleranz sowie zu erniedrigtem Appetit, sexueller Erregung und Schlaf. Zudem werden das kardiovaskuläre System sowie die Atmung aktiviert und immunologische Entzündungsreaktionen gehemmt (Chrousos und Gold, 1992). Nach stattgehabter Stressreaktion werden die Stresshormone wieder abgebaut und das Gleichgewicht wird wieder hergestellt. Ist es nicht möglich den Stressor auszuschalten und die Homöostase sicherzustellen, können langfristige physische und psychische Schäden entstehen (Selye, 1950; McEwen, 2004).

Die Aktivierung der HHN-Achse erfolgt zudem stressunabhängig über einen zirkadianen Rhythmus, wobei Kortisol pulsatil ausgeschüttet wird. In den frühen Morgenstunden kann die höchste und in den ersten Nachtstunden die niedrigste Kortisolkonzentration nachgewiesen werden (Bliss *et al.*, 1953).

Bei der Aktivierung der HHN-Achse, unabhängig durch welchen Mechanismus, wird im paraventriculären *Nucleus* des Hypothalamus u.a. CRH, ein aus 41 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid, gebildet (Vale *et al.*, 1981). Über das hypophysäre

Pfortadersystem erreicht CRH die Adenohypophyse. Dort bindet und aktiviert CRH CRHR1, wodurch die Produktion und Freisetzung von ACTH beginnt. Das primäre Ziel von ACTH sind MC2-Rezeptoren in der Nebennierenrinde, die u. a. für die Freisetzung von Glukokortikoiden (insbesondere Kortisol), verantwortlich sind (Leonard, 2005; Herman *et al.*, 2003). Über einen komplexen *Feedback* Mechanismus wird die HHN-Achse durch die ausgeschütteten Glukokortikoide reguliert. Dabei wird die HHN-Achse bei zu hohen Glukokortikoid-Konzentrationen auf allen Ebenen inhibiert und es kommt zur verminderten Ausschüttung von CRH, ACTH sowie Kortisol (Gupta *et al.*, 2007).

1.3.2 CRH, Urocortin und CRHR1/2

Neben CRH gehören Urocortin (UCN), Urocortin 2 (UCN2) und Urocortin 3 (UCN3) zu der CRH Familie.

CRH ist im Gehirn fast ubiquitär vorhanden, insbesondere wird es im paraventriculären *Nucleus* sezerniert. Peripher wurde CRH bislang im Darm, in der Haut und in der Nebenniere nachgewiesen (Bale und Vale, 2004). UCN wird vor allem im *Nucleus Edinger Westphal*, im Hypothalamus und im Rückenmark exprimiert (Vaughan *et al.*, 1995). UCN2 findet man im Hypothalamus, Hirnstamm und Rückenmark (Reyes *et al.*, 2001). Im Hypothalamus, Hirnstamm und Amygdala sowie peripher im Dünndarm und in der Haut ist UCN3 lokalisiert (Lewis *et al.*, 2001). Darüber hinaus sind die Peptide der CRH Familie auch in verschiedenen peripheren Geweben vorhanden und interagieren mit den CRH-Rezeptoren (Dautzenberg und Hauger, 2002).

Bisher sind die beiden Subtypen der CRH-Rezeptoren CRHR1 und CRHR2 isoliert worden. CRHR1 ist ein aus 397-438 Aminosäuren bestehendes Protein und wird insbesondere in der Hypophyse, im *Neokortex*, *Cerebellum*, *Amygdala* sowie im *Bulbus olfactorius* exprimiert. Peripher wurde der Rezeptor in Hoden, Ovarien und in der Nebennierenrinde nachgewiesen (Chalmers *et al.*, 1995; Dautzenberg und Hauger, 2002; Sánchez *et al.*, 1999). CRHR2 (415-420 Aminosäuren) wird vor allem peripher u.a. in kardialen Myozyten, im gastrointestinalen Trakt, in Lunge, Ovarien sowie im Skelettmuskel gefunden. Zentral kommt CRHR2 in subkortikalen Hirnregionen vor (Chalmers *et al.*, 1995; Nozu *et al.*, 1999; van Pett *et al.*, 2000). Beide Rezeptoren gehören zu der B1 Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen (Vita *et al.*, 1993). CRHR1 und CRHR2 werden von zwei verschiedenen Genen kodiert, sind aber auf Aminosäureebene zu 70% homolog. Die geringste Homogenität

von 60% weisen sie in ihrer extrazellulären Domäne auf, vor allem im N-Terminus (Dautzenberg und Hauger, 2002).

Von beiden Rezeptoren existieren mehrere Spleißvarianten. Für CRHR1 sind acht Spleißvarianten und die Isoformen α , β und c-h bekannt, die meisten davon sind funktionslos (Grammatopoulos und Chrousos, 2002). CRHR2 hat drei Isoformen α , β und γ (Dautzenberg und Hauger, 2002).

CRH hat eine zehnfach höhere Affinität zu CRHR1 als zu CRHR2. UCN zeigt zu beiden Rezeptoren die gleiche Affinität. UCN2 und UCN3 haben eine größere Bindungsaffinität zu CRHR2, wobei UCN2 in höherer Konzentration auch CRHR1 aktivieren kann (Lewis *et al.*, 2001).

1.3.3 Stress, Immunsystem und Allergie

Schon lange ist bekannt, dass sowohl das zentrale als auch das periphere Nervensystem mit dem Immunsystem auf verschiedenen Ebenen interagiert.

So wird die HHN-Achse u.a. während einer Entzündungsreaktion durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6 und -1 aktiviert. IL-6 scheint der Hauptinitiator der Immunstimulation zu sein, insbesondere bei chronisch entzündlichen Prozessen (Chrousos und Gold, 1992). CRH, das nach Aktivierung der HHN-Achse sezerniert wird, werden sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Baigent, 2001). Es wird davon ausgegangen, dass CRH und UCN eine immunmodellierende Wirkung besitzen und Immunzellen insbesondere über CRHR2 stimulieren (Baigent, 2001). Zentralnervös ausgeschüttetes CRH führt zur Kortisol-Freisetzung und gilt über diesen Signalweg als antiinflammatorisch. Hingegen wurde peripher produziertem CRH und UCN auch proinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen (Baigent, 2001). Die genaue Signalkaskade auf peripherer Ebene ist jedoch bislang nicht ganz verstanden.

Bei andauernder Aktivierung der HHN-Achse durch chronischen Stress kommt es zu Veränderungen der physiologischen Regulierungsmechanismen der HHN-Achse (Leonard, 2005). So konnte an Ratten gezeigt werden, dass chronischer Stress zu einer Hypersekretion von Glukokortikoiden und anhaltender Aktivierung des zentralen und peripheren Nervensystems führt (Irwin *et al.*, 1990). Diese Veränderungen werden auf die Desensibilisierung der Glukokortikoid-Rezeptoren und damit verbundenen Resistenz gegenüber dem negativen *Feedback*-Mechanismus zurückgeführt (Leonard, 2005). Auch

konnten bei Ratten mit hohem postnatalem Stress erhöhte Crh und Acth-Werte sowie Glukokortikoide gemessen werden (Plotsky und Meaney, 1993).

Weiterhin wurde in der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis und in der Haut von Psoriasispatienten eine erhöhte CRH- und CRHR1-Expression nachgewiesen. Dabei wurde insbesondere an vaskulären Endothelzellen und perivaskulären Mastzellen vermehrt CRHR1 exprimiert, was auf einen proinflammatorischen Effekt hinweist (Tagen *et al.*, 2007).

Die Eigenschaften von UCN werden in der Literatur divergent beschrieben. So konnten UCN ebenfalls proinflammatorische Wirkmechanismen bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise rheumatoider Arthritis, Osteoarthritis oder Colitis ulcerosa, nachgewiesen werden (Kohno *et al.*, 2001; Saruta *et al.*, 2004). Allerdings konnten Agnello *et al.* auch antiinflammatorische Eigenschaften von UCN zeigen (Agnello *et al.*, 1998).

Abgesehen von diesen Hinweisen auf eine Interaktion zwischen Psyche, neuronalem System und Immunsystem gibt es auch klinische Hinweise auf diese Zusammenhänge. So hatten Patienten mit CRS im Vergleich zu Patienten, die zusätzlich unter einem posttraumatischen Belastungssyndrom litten, eine schwächere Ausprägung der Symptome (Shejbal *et al.*, 2012). Ein ähnliches Ergebnis resultierte aus der Studie von Teixeira *et al.*, die COPD-Patienten mit posttraumatischem Belastungssyndrom untersucht haben. Auch hier war die Exazerbationsrate im Gegensatz zu der Kontrollgruppe deutlich erhöht (Teixeira *et al.*, 2015). Bei Patienten mit *Colitis ulcerosa* zeigte sich ebenfalls ein erhöhtes Exazerbationsrisiko, wenn sie zusätzlich chronischem Stress ausgesetzt waren (Levenstein *et al.*, 2000).

Der Einfluss von Stress auf die Entstehung von allergischen Entzündungsreaktionen wurde in mehreren Studien untersucht. Glukokortikoide und Katecholamine unterdrücken die IL-12 Produktion der antigenpräsentierenden Zellen und hemmen somit die T_H1-Antwort (Montoro *et al.*, 2009). Daneben haben Glukokortikoide einen direkten Effekt auf T_H2-Zellen, die dadurch vermehrt IL-4, IL-10 und IL-13 produzieren. Das führt zu einem T_H1/T_H2 Ungleichgewicht mit überwiegendem Anteil der T_H2-Antwort. Aus dem so entstandenen neuroimmunologischen Ungleichgewicht kann sich bei chronischem Stress ein Milieu entwickeln, das einen allergisch-entzündlichen Prozess begünstigt (Montoro *et al.*, 2009). In einer weiteren Studie wurden 499 Kinder aus Familien mit Krankheiten aus dem atopischen Formenkreis hinsichtlich des Einflusses von mütterlichem Stress auf das kindliche Immunsystem untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine frühe Exposition

gegenüber Stress u.a. die IgE-Gesamtkonzentration erhöht und eine T_H2 vermittelte inflammatorische Immunantwort fördert (Wright *et al.*, 2004). In einer anderen Studie wurde an gesunden Medizinstudenten in Examensvorbereitungen gezeigt, dass durch chronischen Stress eine Dysregulation der Zytokinausschüttung entsteht, die zu einer T_H2-Antwort führen kann (Marshall *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse verdeutlichen die engen Zusammenhänge zwischen entzündlichen und allergischen Prozessen und dem regulatorischen Einfluss von Stress. Die Rolle von peripher exprimierten CRH, UCN und den zugehörigen Rezeptoren bei inflammatorischen sowie bei allergischen Prozessen ist dabei weiterhin nicht vollständig geklärt.

2 Hypothese und Fragestellung

Aktuelle epidemiologische Daten zeigen einen Zusammenhang sowohl zwischen CRS und psychischem Stress als auch zwischen AR und psychischem Stress. Bislang finden sich jedoch nur wenige Untersuchungen zu möglichen neuroendokrinen Mechanismen in der NSH, die Erklärungsansätze für diese klinischen Beobachtungen bieten können. So konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nur in einer Studie von Kim *et al.* bei Patienten mit AR eine Überexpression von UCN sowie von CRHR1 und CRHR2 nachgewiesen werden. Daher soll in der vorliegenden Arbeit die Expression der CRH-Rezeptoren und des ACTH-Rezeptors untersucht werden. Ziel ist zunächst die Lokalisation der Rezeptoren und mögliche Expressionsunterschiede der CRHR1 und CRHR2 sowie MC2R in der NSH sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Dies soll mittels IHC, qRT-PCR und WB erfolgen. Für diese Methoden soll Gewebe von Patienten mit CRSw/sNP mit und ohne Allergie sowie von Gesunden untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten mit chronischer Rhinosinusitis, die nach der klinischen Routinediagnostik inklusive Nasenendoskopie, Allergiediagnostik (Haut-Prick-Test oder Bestimmung von spezifischem IgE) und bildgebenden Verfahren (CT der NNH) in der Hals-Nasen- und Ohrenklinik des Universitätsklinikum Düsseldorf an den NNH operiert wurden. Als Kontrollkollektiv dienten Patienten, die aufgrund einer Nasenseptumdeviation und Nasenmuschelhyperplasie an der Nase operiert wurden und bei denen in den klinischen Routineuntersuchungen eine CRS ausgeschlossen wurde. Alle Teilnehmer wurden schriftlich über die Studie aufgeklärt. Für die Durchführung der Studie lag ein schriftliches Votum der Ethikkommission (4366R) vor.

3.1.2 Erhebung des *Lund-Scores*

Bei allen Patienten wurde der *Lund-Score* (s. Kapitel 1.2.1) mittels CT-Bilder der NNH erhoben. Tabelle 1 zeigt eine Erhebungsübersicht.

Lund-Score	rechts	links
Sinus maxillaris		
vordere Ethmoidalzellen		
hintere Ethmoidalzellen		
Sinus sphenoidales		
Sinus frontalis		
Osteomeataler Komplex		
Zwischensumme	max. 12 Pkt	max. 12 Pkt
Gesamtscore	max. 24 Pkt	

Tabelle 1: Punktwertvergabe beim *Lund-Score*

Punktwertvergabe (außer OMK): 0 = keine Verlegung; 1 = partielle Verlegung; 2 = komplette Verlegung

Punktwertvergabe OMK: 0 = keine Verlegung; 2 = komplette Verlegung

Pro Seite kann ein maximaler Punktwert von 12 und insgesamt von 24 vergeben werden.

3.1.3 Prick-Test

Der Prick-Test dient zur Identifikation einer durch Immunglobulin E (IgE) vermittelten Soforttyp-Allergie und gilt neben der Anamnese als klinische Screeningmethode der ersten Wahl. Dabei wird das entsprechende Allergen in die Dermis eingebracht, in der sich die Mastzellen befinden. Tragen die Mastzellen spezifische IgE-AK für das Testallergen, kommt es bei einer Überbrückung von mindestens zwei AK zur Aktivierung und Freisetzung von Mediatoren (u.a. Histamin, Tryptase oder Tumornekrosefaktor- α). Innerhalb von 15 bis 20 Minuten entwickelt sich die Testreaktion, gekennzeichnet durch lokale Rötung, dermales Ödem (Quaddel) und Umgebungserthem. Voraussetzung für die Durchführung ist eine allergologische Anamnese und Abklärung möglicher Kontraindikationen (Bernstein, 2008; Dreborg und Frew, 1993).

Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wird 0,9% Natrium-Chlorid (NaCl) als Negativkontrolle und 1% Histaminhydrochlorid als Positivkontrolle verwendet. Nach einer 15minütigen Einwirkzeit werden mögliche Erythem- und Quaddelbildungen dokumentiert. Ist der mittlere Quaddeldurchmesser ≥ 3 mm und/oder der mittlere Erythemdurchmesser ≥ 5 mm gilt die Testreaktion als positiv. Der Test ist nur auswertbar, wenn die Negativkontrolle keine und die Positivkontrolle eine eindeutige positive Reaktion zeigt (Dreborg, 2001).

3.1.4 Gesamt- und spezifisches-IgE

Als Alternative zum Prick-Test wurde in der klinischen Routine in einzelnen Fällen die Gesamt- und spezifische IgE-Konzentration im Serum mittels ImmunoCAP gemessen. Diese Methode gehört zu den in-vitro Allergiediagnostikverfahren und ist ein sogenanntes solide-Phase-Fluoroenzym-Immunoassay. Dabei reagiert das spezifische IgE des Patienten mit dem kovalent gebundenen Allergen im ImmunoCAP. Es bildet sich ein fluoreszierender Enzym-Anti-IgE-Komplex. Die Fluoreszenzwerte korrelieren mit der Höhe der IgE-Konzentration im Patientenserum (Ewan und Coote, 1990).

Das Gesamt-IgE dient als zusätzlicher Parameter, wobei die alleinige Bestimmung keine spezifische Sensibilisierung auf ein Allergen nachweisen kann. Das sIgE ist der Anteil am Gesamt-IgE, der nachweislich spezifisch für ein bestimmtes Allergen ist. Der Nachweis von sIgE hat eine vergleichbare Wertigkeit mit einer positiven Reaktion im Haut-Prick-Test (Renz, 2010).

Den Patienten wurden jeweils zwei Serum-Röhrchen Blut abgenommen und in das Allergielabor der Dermatologie der Uniklinik Düsseldorf versandt. Dort wurde ein Screening auf inhalative Allergene (sx-1) mittels ImmunoCAP durchgeführt. Die klinische Relevanz muss mit einer allergologischen Anamnese und ggf. mit Hilfe eines Provokationstests bestimmt werden.

3.2 Gewebeproben

Alle Gewebeproben wurden im Rahmen eines operativen Verfahrens, beispielsweise bei einer funktionellen endoskopischen Nasennebenhöhlenoperation (FESS), Conchotomie oder Polypektomie an der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikum Düsseldorf gewonnen.

Das Untersuchungsmaterial umschließt NP, NSH sowie NM von Patienten mit CRSw/sNP, sowie mit und ohne allergischer Rhinitis. Außerdem wurden NM und/oder NSH von Patienten ohne CRSw/sNP und ohne Allergie, die im Rahmen einer Septumplastik, Conchotomie oder Septorhinoplastik an der Nase operiert wurden, verwendet.

3.3 Material

3.3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Brutschrank (Modell 100)	Memmert, Schwabach, D
Brutschrank (Modell P4OU)	Memmert, Schwabach, D
Crystal Mount™ (Cat. MØ2)	Biomedica Corp. Foster City, CA, USA
Cycler ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Deckgläser (18x18 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig, D
Digitalkamera (D7000)	Nikon, Düsseldorf, D
Einbettkassetten	Sakura, USA
Einmalskalpelle	Feather Safety Razor Corp., Osaka, J
Elektrophoresekammern	Roth, Karlsruhe, D
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Farbstift (S2002)	DAKO, Glostrup, DM

Geldokumentationssystem (E-BOX VX2)	Peqlab, Erlangen, D
Kompaktschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Biberach an der Riss, D
Kühlschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach an der Riss, D
Kühlschrank (-80°C)	Liebherr, Biberach an der Riss, D
Micro Amp™ 96-Well Plate N801-0560	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikroskop (BX-40)	Olympus, Hamburg, D
Mikrotom (Hn40)	Reichert-Jung, München, D
Mikrotomklingen (N35H)	Feather Safety Razor Corp., Osaka, J
Mikrotomklingenhalter (160x45x12) (Mikrotom Set Typ 160)	PFM Medical AG, Köln, D
Mikrowelle (M501)	Whirlpool, Stuttgart, D
NanoDrop (ND-1000) (Spectrophotometer)	Peqlab, Erlangen, D
Objektträger (76x26 mm)	Engelbrecht, Edermünde, D
Optical Adhesive Covers 4360954	Applied Biosystems, Foster City, USA
Paraffin-Streckbad (Modell 1052)	GFL, Burgwedel, D
PBS Tabletten	Oxoid, Hampshire, UK
Pinzetten	Roth, Karlsruhe, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg, D
PVDF Membran, Cat. No. RPN363 F (Amersham Hybond™-P)	GE Healthcare, München, D
Reaktionsplatte 384-Well 4309849	Applied Biosystems, Foster City, USA
Rotationsschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Rotor-Stator Homogenisator (Tissue Ruptor)	Qiagen, Hilden, D
Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Stromversorgungsgerät PowerEase® 500 Cat. No. EI8700	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, D
Thermomixer Comfort 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Transferschwämmchen	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Vortex Typ Reax 1R	Heidolph Instruments, Schwabach, D
X-Cell Sure Lock™ Novex® Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
X-Cell™ Blot Module No. 1277194-013	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge (5415D)	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge (Tube-Strop Picofuge™)	Stratagene, Heidelberg, D

3.3.2 Substanzen und Lösungen

Material	Hersteller
ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
Ambion® RNase freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Aqua dest.	Braun AG, Melsungen, D
Bluing and solution	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
1-Butanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
DAB	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Ethanol:	
Abs.	Merck KGaA, Darmstadt, D
96%	Merck KGaA, Darmstadt, D
70%	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	
Filterpapier	Whatman GmbH, Dassel, D
Formaldehyd 37%	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Formalin 4%	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ladepuffer 6x Loading Dye Solution (#R0611)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Milchpulver Blotting Grade T145-4	Roth, Karlsruhe, D
NuPage Antioxidant Cat. No. NP0005	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage Gelsystem 4-12% 1,5mm x 10 well; Cat. No. NP0335	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Cat. No. NP0007	
NuPage Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Cat. No. NP0009	
NuPage MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Cat. No. NP0002	
Transfer Buffer (20x) Cat. No. NP0006-1	
PBS	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit 23225	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Ponceau S (81460)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, D
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
QiaShredder	Qiagen, Hilden, D
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, D
Referenz-RNA	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Super Signal® West Pico Chemiluminescent Stable Peroxide Solution (250 ml) Luminol/Enhancer Solution (250 ml)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
SYBR-Green	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, D

Puffer

50 x TAE-Elektrophoresepuffer:

242 g/l	Trishydroxymethylaminomethan
57,1 ml/l	Eisessig (# 100063)
100 ml/l	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 0,5 M, pH 8, # 819040)

Programme

SDS 2.3 Programm
Excel Microsoft Office
Prism 5

3.4 Methoden

3.4.1 Immunhistochemie

Mit Hilfe der IHC lassen sich molekulare Strukturen in histologischen Gewebeschnitten darstellen. Dafür werden AK verwendet, die spezifisch an den entsprechenden Antigenen binden. Die AK sind entweder direkt an einen Farbstoff oder an Enzyme gekoppelt. Letztere spalten Substrat-Chromogen-Lösungen mittels Sekundär- oder Tertiär-AK in farbige Produkte auf (Bourne, 1997).

In dieser Arbeit wurde die sogenannte Avidin-Biotin-Complex (ABC-) Methode angewandt. Dabei wird sich die hohe Spezifität und Bindungsaffinität von Avidin (Eiweiß) für Biotin zu Nutze gemacht. Der genaue Reaktionsablauf wird im Kapitel 3.4.1.4 beschrieben.

3.4.1.1 Gewebereinbettung

Das Gewebe für die IHC wurde im OP direkt nach der Entnahme in sterile Plastikbehälter mit 4%igen Formalin eingebettet. Danach erfolgte eine zweitägige Fixierung in 10%igen Formalin (Formaldehyd 37% gemischt mit Aqua dest.) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gewebe in beschriftete Einbettkassetten überführt, durch eine aufsteigende Alkohol-Verdünnungsreihe (4x1h 70%iger Alc., 2x1h 96%iger Alc., 1h abs. Alc.) entwässert und über Nacht in 2-Propanol gelagert. Es folgte eine Überführung in 1-Butanol für eine Stunde. Die weiteren Schritte wurden im Brutkasten bei ca. 60°C durchgeführt. Die Proben wurden für zwei Stunden in einer 1:1 Lösung aus 1-Butanol und Paraffin, dann zwei Mal 2 Stunden in Paraffin und abschließend über Nacht in frischem Paraffin eingelegt. Im letzten Schritt wurden die Präparate mit frischem Paraffin ausgegossen.

3.4.1.2 Gewebe schneiden

Mit Hilfe eines Schlittenbahnmikrotoms wurden von jeder Probe jeweils zwanzig 5 bis 6µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden diese in einem 40°C warmen Wasserbad für ca. 1 Minute entfaltet und auf beschichtete Objektträger gezogen. Zur Trocknung erfolgte eine Lagerung im Brutkasten bei ca. 35°C für 12 Stunden.

3.4.1.3 Positivgewebe

Bereits geschnittenes und auf Objektträger überführtes Hypophysengewebe bzw. Nebennierengewebe wurde vom Forschungslabor der Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Das Gewebe dient als Positivkontrolle für CRHR1 und CRHR2 bzw. MC2-Rezeptoren bei der IHC.

3.4.1.4 Färbung

Die Färbung der Präparate ist Primär-AK unabhängig immer nach demselben Protokoll durchgeführt worden. Das Normalserum bzw. der Sekundär-AK wurden jeweils dem Primär-AK angepasst. Bei jedem Versuch wurde jeweils eine Negativkontrolle pro Probe (Färbung ohne Primär-AK) verwendet. Zur Testung der AK wurde Hypophysengewebe bzw. Nebennierengewebe als Positivkontrolle verwendet.

Zunächst wurden die Präparate mit Xylol (2x10 Minuten) entparaffiniert und durch eine absteigende Alkohol-Verdünnungsreihe (2 Mal 5 Minuten abs. Alc., 5 Min. 96%iger Alc., 5 Min. 70%iger Alc.) rehydriert. Daraufhin erfolgte eine Waschung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Diese wurde vorher aus 1l Aqua dest. und zehn Tabletten PBS angesetzt. Im zweiten Schritt wurde die endogene Peroxidase mittels Methanol und Wasserstoffperoxid (245ml Methanol gemischt mit 5ml H₂O₂) für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Danach sind die Präparate mit PBS gewaschen (2 Mal 5 Minuten) und mit dem DAKO-Farbstift umrandet worden, um eine optimale Fixierung der nachfolgenden Substanzen zu gewährleisten. Für die weiteren Schritte wurde das *Peroxidase Vectastain Kit* verwendet. Zunächst wurden die Objektträger auf den Färbekästen positioniert und mit 100µl Normalserum (10ml PBS gemischt mit 150µl Pferde-Serum) pro Präparat für 30 Minuten inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Sekundär-AK zu verhindern. Danach wurde das Serum vorsichtig abgeklopft. Den

Schnitten wurden jeweils 100µl des verdünnten Primär-AK (s. Tabelle 2) zugegeben und über Nacht bei 4°C in einer sogenannten feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurden die Präparate mit PBS gewaschen (2 Mal 5 Minuten) und anschließend mit jeweils 100µl des biotinylierten Sekundär-AK (10ml PBS gemischt mit 50µl Sekundär-AK [Pferd anti-Maus bzw. Ziege anti-Kaninchen]) für 30 Minuten bedeckt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS (2 Mal 5 Minuten) erfolgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex für weitere 30 Minuten. Dieser musste eine halbe Stunde vor der Inkubation bei Raumtemperatur angesetzt werden und bestand aus einer Mischung von 100µl Reagenz A (Avidin DH), 100µl Reagenz B (biotinylierte Meerrettichperoxidase-H), sowie 10ml PBS. Danach wurde mit PBS gewaschen (2x5 Minuten). Für die Färbung wurde das Chromogen DAB verwendet. Dafür wurden zunächst zwei Tropfen Pufferlösung mit 5ml A. dest. gemischt, anschließend vier Tropfen DAB-Lösung und nach Vortexen zwei Tropfen H₂O₂ hinzugegeben und nochmals gevortexet. Die Präparate wurden mit dieser Lösung für 3 Minuten überschichtet und im Anschluss 5 Minuten mit Wasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hematoxylin für ungefähr 2 Minuten. Danach wurden die Schnitte mit Wasser gewaschen bis sie klar wurden und jeweils zehn Mal in *Rinse Solution* und in Wasser getaucht. Abschließend wurden die Schnitte 1 Minute in eine *Bluing Solution* gegeben, mit Wasser abgespült und mit jeweils einem Tropfen Histogel eingedeckelt. Anschließend wurden die Präparate unter dem Mikroskop untersucht und mit einer Digitalkamera fotografiert.

Spezifität	Typ	Wirt/Isotyp	Verdünnung	Firma
CRHR1	Monoklonal	Maus	1:100	R&D Systems, Wiesbaden, D
CRHR2	Polyklonal	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge, GB
MC2R	Polyklonal	Kaninchen	1:100	Alomone, Jerusalem, I

Tabelle 2: Verwendete Primär-AK in der IHC

3.4.2 RNA-Isolierung

Das Gewebe wurde unmittelbar nach der operativen Entnahme in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, in Stickstoff schockgefroren und darin bis zur Verarbeitung gelagert. Für die Gesamt-RNA-Isolierung wurde das *RNeasy Mini Kit* für tierisches Gewebe von Qiagen verwendet und entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Die in den *RNeasy Mini* Säulen enthaltene Silica-Membran bindet bei Anwesenheit von chaotropen Salzen spezifisch RNA-Moleküle. Diese kann durch mehrere Waschschrte eluiert

werden. Die Silica-Membran hat eine Bindekapazität von bis zu 100µg RNA, das maximale Ladevolumen beträgt 700µl und die untere Ausschlussgröße liegt bei 200 Nukleotiden Länge.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden an einem RNase freien Arbeitsplatz und auf Eis durchgeführt, um die Aktivität von RNAsen zu minimieren und somit eine mögliche Denaturierung der RNA zu verhindern. Aus jeder Probe wurde zunächst ein ca. 1mm großes Gewebestück mit einem Einmalskapell entnommen und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß überführt, das 300µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10µl β-Mercaptoethanol auf 1ml RLT-Puffer) enthielt. Der RLT-Puffer beinhaltet das denaturierende *Chaotrop Guanidiniumthiocyanat*, das RNAsen inaktiviert und einen Abbau der RNA verhindert.

Anschließend wurde mit Hilfe eines *Rotor-Stator Homogenisators* das Gewebe zerkleinert und homogenisiert. Dann wurden nochmals 300µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol hinzugegeben. Im folgenden Schritt wurde das Lysat auf die *QiaShredder* Säulen überführt und für 2 Minuten bei maximaler Beschleunigung zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und für weitere 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säulen fungieren als Filter und entfernen Zelltrümmer und andere unlösliche Metaboliten. Wieder erfolgte die Überführung des Lysats in ein neues 1,5ml Eppendorf-Gefäß, dem jeweils ein Volumen 70%iger Ethanol zugesetzt und mit einer Pipette vermischt wurde. Durch den Ethanolzusatz werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der RNA und den *OH-Silikat-Atomen* ausgebildet um die RNA selektiv an die *Silica-Membran* zu binden. Anschließend wurden 700µl des Gemisches in die *RNeasy Mini* Säulen pipettiert und für 15 Sekunden bei 8000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Mit dem restlichen Gemisch wurde der Vorgang wiederholt.

Es folgte ein erster Waschschrift mit 350µl RW1-Puffer, welcher auf die *RNeasy Mini* Säule hinzugeben wurde. Für 15 Sekunden wurde das Lysat bei 8000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um mögliche verunreinigende, genomische DNA abzubauen, wurden 80µl DNase I in RDD-Puffer auf die Säulen gegeben und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Die Lösung musste im Vorfeld angesetzt werden. Dabei wurden pro Säule je 10µl DNase I zu 70µl RDD-Puffer gegeben und vorsichtig gemischt. Im Anschluss an die DNA-Digestion wurden weitere 350µl RW1-Puffer hinzugegeben, für 15 Sekunden bei 8000rpm zentrifugiert und wiederum der Überstand verworfen. In einem weiteren Waschschrift wurden 500µl des RPE-Puffers auf die Säulen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Danach erfolgte nochmals eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei

8000rpm und der Durchfluss wurde verworfen. Beim folgenden Trockenschritt wurden wieder 500µl RPE-Puffer auf die Säulen pipettiert und für 2 Minuten bei 8000rpm zentrifugiert. Der RW1- und der RPE-Puffer dienen zur Reinigung der Membran, um mögliche Kontaminationen mit Proteinen, Salzen und Metaboliten sowie anderen zellulären Bestandteilen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule in ein neues Sammelröhrchen überführt und für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Säule in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß gegeben und 30µl RNase-freies Wasser hinzugefügt, sodass während einer einminütigen Zentrifugation bei 8000rpm RNA eluiert werden konnte. Die gewonnene RNA wurde sofort auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C zwischengelagert.

3.4.2.1 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde mit Hilfe des *NanoDrop*[®] *Spektrophotometers* ermittelt. Bereits 1µl der eluierten RNA genügen, um eine Extinktionsmessung durchzuführen. Dabei entsteht eine Flüssigkeitssäule zwischen dem oberen und unteren Messständer durch die eine Xenonlichtquelle pulsartig einen Lichtstrahl aussendet (Desjardins *et al.*, 2009). Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260nm. Davor wurde das *NanoDrop*[®] *Spektrophotometer* mit 1,5µl RNase freiem Wasser geeicht, welches als Referenzwert diente. Die Konzentration wird in ng/µl angegeben. Die Reinheit der RNA-Lösung wurde durch die 260/280nm und 260/230nm Quotienten eingestuft. Dabei sollte das 260/280nm Verhältnis bei ungefähr 2,0 liegen, Werte darunter sprechen für eine Verunreinigung durch Proteine. Eine mögliche Kontamination mit Ethanol oder Pufferlösungen zeigt der 260/230nm Quotient an. Hierbei sollte das Verhältnis nicht unter 1,8 und nicht über 2,2 liegen, um eine hohe Reinheit der RNA sicherzustellen (Fleige und Pfaffl, 2006; Desjardins *et al.*, 2009).

3.4.2.2 Qualitätskontrolle der RNA

Zur Integritätskontrolle der isolierten RNA wurden 2µl RNA und 4µl Elektrophoreseladepuffer in einem nicht-denaturierenden 1%igen TAE-Agarose-Gel (mit 0,07µg/ml Ethidiumbromid) bei ca. 90V aufgetrennt. An den Banden der ribosomalen RNA (rRNA) kann die Qualität der RNA unter UV-Licht (250 – 310nm) mittels Geldokumentationssystem kontrolliert werden. Das Verhältnis der Intensität der 18S zur 28S rRNA-Bande sollte 1:2 betragen. Sind die Ladetaschen ebenfalls angefärbt, liegt eine genomische DNA-Kontamination vor (Fleige und Pfaffl, 2006).

3.4.3 cDNA-Synthese

Die eluierte und überprüfte RNA wird durch *Reverse Transkription* in cDNA umgeschrieben. Dabei erzeugt die *Reverse Transkriptase*, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, einen zu dem RNA-Strang komplementären DNA-Strang (cDNA). Die cDNA dient als *Template* für die anschließende qRT-PCR. Für die *Reverse Transkription* wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von Qiagen verwendet und die entsprechende Handhabung nach Herstellervorgaben befolgt. Die folgenden Schritte sind auf Eis durchgeführt worden, um einen möglichen RNA-Abbau und eine unspezifische cDNA-Synthese zu verhindern. Um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA zu eliminieren, wurden jeweils 14µL der Stammlösung 1 mit folgenden Bestandteilen angesetzt (s. Tabelle 3).

Reagenz	Volumen
<i>gDNA Wipeout Puffer 7x</i>	2 µL
<i>Template RNA</i>	V für 1,0 µg
RNAse – freies Wasser	variabel
Gesamtvolumen	14 µL

Tabelle 3: Stammlösung 1 zur Elimination genomischer DNA

Die Stammlösung 1 wurde für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und im Anschluss sofort auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Herstellung der entsprechenden Stammlösung für die Transkriptionsreaktion (siehe Tabelle 4).

Reagenz	Volumen
<i>Quantiscript Reverse Transcriptase</i>	1 µL
<i>Quantiscript RT Buffer 5x</i>	4 µL
<i>RT Primer Mix</i>	1 µL
Gesamtvolumen	6 µL

Tabelle 4: Stammlösung 2 für reverse Transkription

Im weiteren Verlauf wurden 6µl der Stammlösung 2 zu 14µl der Stammlösung 1 gegeben und bei 42°C für 30 Minuten inkubiert. Im weiteren Schritt folgte eine Inkubation bei 95°C für 3 Minuten, um die *Quantiscript Reverse Transkriptase* zu inaktivieren. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

3.4.4 Qualitätskontrolle der cDNA

Um eine mögliche Kontamination der cDNA mit genomischer DNA zu detektieren, wurde eine Qualitätskontrolle mittels PCR durchgeführt. Hierfür wurden *Primer*, die das Haushaltsgen β 2-Mikrotubulin amplifizieren, verwendet. Ein Reaktionsansatz enthielt die in Tabelle 5 aufgelisteten Komponenten.

Reagenz	Volumen
Stammlösung	12,5 µL
<i>Primer forward</i>	1,5 µl
<i>Primer reverse</i>	1,5 µl
H ₂ O	4,5 µl
cDNA (1:25)	5 µl
Gesamtvolumen	25 µL

Tabelle 5: Stammlösung für PCR-Kontrolle

Zur Amplifikation wurden die β 2-Mikrotubulin 5'- und 3'-*Primer* (s. Tabelle 6) verwendet. Neben den cDNA-Proben wurden zur internen Kontrolle eine Referenz-cDNA sowie eine Wasserprobe mit amplifiziert. Die PCR begann mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 Minuten, um die Wasserstoffbrücken der doppelsträngigen DNA zu trennen. Es folgten 28 Zyklen mit je 20s andauernder Denaturierung bei 95°C, um sicherzustellen, dass nur noch Einzelstränge vorlagen. Anschließend erfolgte die *Primerhybridisierung*. Dabei lagern sich die *Primer* innerhalb von 20s bei 58°C spezifisch an den jeweiligen komplementären Bereich der Einzelstrang-DNA an. In der Extensionsphase (20s bei 72°C) wurden die *Primer* an ihrem 3'-Ende mittels *DNA-Polymerase* und *Nucleotiden* verlängert. An den letzten Zyklus schloss sich ein Extensionsschritt von 5 Minuten bei 72°C an.

Abschließend erfolgte eine Gel-Elektrophorese mittels eines 1,5%igen Agarose-Gels (Mullis *et al.*, 1986; Rassow, 2006).

Gen	Sequenz	Basenpaare
<i>β-2-MG 3'</i> :		
<i>Forward:</i>	5'- GTTGCTCCACAGGTAGCTCTAG - 3'	110bp
<i>Reverse:</i>	5'- ACAAGCTTTGAGTGCAAGAGATTG - 3'	
<i>β-2-MG 5'</i> :		
<i>Forward:</i>	5'- GTCTCGCTCCGTGGCCTTAG -3'	128bp
<i>Reverse:</i>	5'- CATTCTCTGCTGGATGACGTGAG - 3'	

Tabelle 6: β_2 -Mikrotubulin 5'- und 3'-Primersequenzen

3.4.5 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative RT-PCR oder Echtzeit-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren beruhend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (s. Kapitel 3.4.4). Durch diese Methode ist es möglich, einen qualitativen Nachweis einer gesuchten DNA-Sequenz zu erbringen und zugleich den DNA-Gehalt der eingesetzten Proben zu bestimmen. Der DNA-Gehalt entspricht der mRNA Expression des untersuchten Gens. 1992 wurde die Quantifizierungsmethode von Higuchi *et al.* entwickelt, wobei erstmalig *Ethidiumbromid* zu der PCR-Reaktion hinzugefügt wurde, das mit doppelsträngiger DNA interkaliert und so den Reaktionsverlauf sichtbar macht (Higuchi *et al.*, 1992). Das PCR-Gerät wurde zur Detektion der Fluoreszenz zusätzlich mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera ausgestattet (Higuchi *et al.*, 1992). Heutzutage werden andere Fluoreszenzfarbstoffe, insbesondere *SYBR[®] Green I*, verwendet. Mit diesem Farbstoff kann jede PCR-Reaktion beobachtet werden, da er sich in die *minor-grooves* der doppelsträngigen DNA einlagert (Morrison *et al.*, 1998). Dabei strahlt der Farbstoff, wenn er vorher bei einer Wellenlänge von 497nm angeregt wurde, Licht von einer Wellenlänge von 560nm ab. Bei fortschreitender Zyklus-Anzahl steigen die Produkt- und Fluoreszenzkonzentration proportional zueinander an, sodass aus dem gemessenen Fluoreszenzgehalt der DNA-Gehalt ermittelt werden kann (Wittwer *et al.*, 1997). Der Nachteil der Methode ist seine niedrige Spezifität, da sich *SYBR[®] Green I* auch in unspezifischen Primer-Dimere einlagert und somit nicht zwischen Ziel-Produkt und Artefakten unterschieden werden kann. Aus diesem Grund muss nach der qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden (s.u.) (Vandesompele *et al.*, 2002).

Die charakteristische Amplifikationskurve besteht aus vier Phasen, wobei in Phase 1 eine exponentielle Amplifikation stattfindet. Allerdings liegt zu diesem Zeitpunkt die Reporterfluoreszenz unter der sogenannten Hintergrundfluoreszenz, da die *Templatekonzentration* noch zu gering ist. Phase 2 umfasst die exponentielle Phase, in der der Fluoreszenz-Schwellenwert oder C_T -Wert bestimmt werden kann. Dieser Wert beschreibt den Zeitpunkt, in der die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. In Phase 3 erfolgt die lineare Amplifikation, in der sich die PCR-Reaktion verlangsamt, da immer weniger *Nucleotide* und *Primer* vorhanden sind und die Polymerase und *Nucleotide* durch die hohen Temperaturen geschädigt werden. Im Anschluss geht die PCR-Reaktion in Phase 4, die Plateauphase, über. Nach der Amplifikationsphase folgt eine

Schmelzphase, bei der die PCR-Produkte von 60°C auf 99°C erhitzt werden bis der jeweilige spezifische Schmelzpunkt erreicht wird und die Auftrennung in Einzelstränge erfolgt (Heid *et al.*, 1996). Bei der fortlaufenden Fluoreszenzmessung wird dabei eine Abnahme der Signalintensität detektiert und die jeweilige Schmelztemperatur, abhängig vom *Guanin*- und *Cytosin*-Gehalt des PCR-Produkts, kann ermittelt werden. Graphisch stellt sich der Schmelzpunkt als *Peak* der Schmelzkurve dar (Ririe *et al.*, 1997).

Nach Ablauf eines qRT-PCR-Laufes werden die erhobenen Daten analysiert und der C_T -Wert ermittelt. Der C_T -Wert steht für die Zyklenanzahl, an der sich das Maximum der zweiten Ableitung der Fluoreszenzkurve befindet (Phase 2). Daraus resultiert, dass je höher der DNA-Gehalt einer Probe ist, desto eher wird ein Fluoreszenzsignal gemessen, das die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und umso niedriger ist der C_T -Wert (Heid *et al.*, 1996).

Um mögliche Fehlerkomponenten bei dem Vergleich der C_T -Werte auszuschließen, wird ein *Housekeeping-Gen* (HKG), in dieser Arbeit GAPDH, als Referenz-Gen verwendet. Ein HKG ist eine Gensequenz, die in allen Zellen exprimiert und nicht reguliert wird, so dass ein konstantes Expressionslevel besteht. Die Bestimmung der relativen Quantifizierung erfolgt durch die Verhältnisbildung zwischen Ziel-Gen und HKG (Giulietti *et al.*, 2001).

3.4.5.1 Primer-Design

Die Primer-Paare für die qRT-PCR wurden anhand der entsprechenden Gensequenzen mit Hilfe des Primer-Design-Programms *Primer-BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) entworfen. Die Gen-Bank Accessionsummern lauten NM_001145146.1 (*CRHR1*), NM_001202475.1 (*CRHR2*) und NM_000529.2 (*MC2R*). Um ein spezifisches Primer-Paar zu erhalten, wurden folgende Parameter beachtet. Die Primerlänge sollte zwischen 18-22bp liegen, die Länge des PCR-Produkts zwischen 100-250bp, der Guanidin/Cytosin-Gehalt sollte 40-60% und die Schmelztemperatur (T_m -Wert) ca. 60°C betragen, wobei der Temperaturunterschied zwischen *forward*- und *reverse-Primer* nicht mehr als 0,5°C sein sollte. Am 3'-Ende sollten sich maximal zwei G- oder C-Basen befinden, um ein mögliches *Mispriming* zu vermeiden und keine inter- und/oder intramolekuläre Komplementarität bestehen. Außerdem sollte vermieden werden, dass vier gleiche Basen hintereinander auftreten, um

Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu verhindern (Dieffenbach *et al.*, 1993).

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgelistet. Die gelieferten *Lyophilisate* wurden mit der angegebenen Menge an H₂O gelöst und für die qRT-PCR 1:10 verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Primer bei -20°C aufbewahrt.

Gen	Sequenzen	Produktlänge (bp)	Annealing-Temp. (°C)	GC (%)
MC2R		162		
<i>Forward:</i>	5'- GGT GGT GCT TAC GGT CAT CT - 3'		59.75	55
<i>Reverse:</i>	5'- GAT CGA GCC AGC AGG AAC AT - 3'		60.18	55
CRHR1		100		
<i>Forward:</i>	5'- CGG GTC GTC TTC ATC TAC TTC A - 3'		59.58	55
<i>Reverse:</i>	5'- TGG CAG AAC GGA CCT CAC T - 3'		60.84	
CRHR2		109		
<i>Forward:</i>	5'- AAT GCT TGG AGA ATG GGA CG - 3'		58.24	50
<i>Reverse:</i>	5'- ACA AGG GCG ATG CGG TAG - 3'		59.81	61
GAPDH		122		
<i>Forward:</i>	5'- CCC CTC TGC TGA TGC CCC CA - 3'		66.34	70
<i>Reverse:</i>	5'- TGA CCT TGG CCA GGG GTG CT - 3'		66.15	65

Tabelle 7: Verwendete Primer-Paare für *MC2R*, *CRHR1*, *CRHR2* und *GAPDH*

3.4.5.2 Durchführung

Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und zügig pipettiert. Es wurde jeweils eine 384 Well Platte verwendet. Für den Ansatz der qRT-PCR wurde folgende Stammlösung (s. Tabelle 8) angesetzt:

	<i>GAPDH</i>	<i>CRHR1/CRHR2/MC2R</i>
Mischungsverhältnis (<i>Primer forward/reverse</i>)	300:900	300:300
Reagenz	Volumen	
<i>Primer forward</i>	0,75 µl	0,75 µl
<i>Primer reverse</i>	2,25 µl	0,75 µl
<i>A. bidest</i>	4,5 µl	6 µl
<i>SYBR Green</i>	12,5 µl	12,5 µl
Endvolumen pro Well	20 µl	

Tabelle 8: Stammlösung für die qRT-PCR

Im Anschluss wurden 5µl cDNA (1:10 verdünnt) hinzugegeben, um ein Endvolumen von 25µl pro Well zu erhalten. In Vorversuchen wurden die genauen Mischungsverhältnisse der *Primer*, die optimale Verdünnung der cDNA sowie die optimale *Annealing* Temperatur ausgetestet. Als interne Positivkontrolle wurde eine Referenz-cDNA und als Negativkontrolle dH₂O verwendet. Alle Proben wurden als Triplet pipettiert und die Platte anschließend mit einer Folie versiegelt. Die Platte wurde für 30s zentrifugiert und in das Detektionssystem gegeben. Der Vorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt.

3.4.5.3 Datenauswertung

Nach Beendigung des Laufes wurden die Ergebnisse mit dem Software Programm *Sequencing Detection System* (SDS) 2.3 erhoben und anschließend nach der sogenannten *delta-delta-Ct-Methode* (ddCt) ausgewertet. Mit Hilfe dieser Methode kann die relative Quantifizierung des Ziel-Gens ermittelt werden, indem die Expression des Ziel-Gens zur Expression des HKG ins Verhältnis gesetzt wird. Zunächst wird der Mittelwert der drei erhobenen Ct-Werte bestimmt. Im Anschluss wird die Differenz zwischen den gemittelten Ct-Werten des Zielgens und des HKG berechnet ($Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{HKG}} = dCt\text{-Wert}$). Dann wird die Differenz zwischen den zwei Versuchsbedingungen ($dCt_{\text{„krank“}} - dCt_{\text{„gesund“}} = ddCt$) gebildet. Die relative Expression des Zielgens errechnet sich, normiert auf die Expression des HKG und im Verhältnis einer Vergleichsprobe aus 2^{-ddCt} (Livak und Schmittgen, 2001). Die Berechnungen wurden anhand der genannten Formel mit *Microsoft Excel* durchgeführt und anschließend statistisch mittels *Prism 5* ausgewertet.

3.4.5.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mittels Prism 5 durchgeführt. Die kontinuierlichen Variablen wurden mittels *mean* +/- Standardabweichung dargestellt. Abhängig von dem Verteilungsmuster der kontinuierlichen Variablen wurde der Kruskal-Wallis-Test oder die einfaktorielles Varianzanalyse angewandt. Die kategorialen Variablen wurden als Zahlen und Prozente beschrieben und mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. Ein *p-value* von $\leq 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3.4.6 Western Blot

3.4.6.1 Proteinextraktion

Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um die Aktivität von Proteinasen zu minimieren und somit eine mögliche Denaturierung des Proteins zu verhindern. Aus jeder Gewebeprobe wurde zunächst ein ca. 1mm großes Gewebestück mit einem Einmalskalpell entnommen und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß gegeben, das 180µl D2-Lysepuffer enthielt. Anschließend wurde mit Hilfe eines *Rotor-Stator Homogenisators* das Gewebe zerkleinert und homogenisiert. Das Gemisch wurde für ca. 1 Stunde auf Eis gestellt und nachfolgend bei 4°C für 10 Minuten bei 10000rpm zentrifugiert. Das gewonnene Eluat wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C zwischengelagert.

3.4.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Der quantitative Nachweis des Proteingehalts erfolgte mit Hilfe des *Pierce BCA Protein Assay Kits*. Diese Methode beruht auf der *Biuret*-Reaktion, wobei Cu^{2+} -Ionen in alkalischem Milieu zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Die Bicinchoninsäure (BCA) bildet mit den einwertigen Kupferionen eine violette Komplexverbindung deren Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562nm liegt (Smith *et al.*, 1985). Die Farbentstehung ist abhängig von der Proteinstruktur, den vorhandenen Proteinbindungen und Aminosäuren (*Cystein*, *Cystin*, *Tryptophan* und *Tyrosin*). Dabei verhält sich die Intensität des Farbkomplexes zu der Proteinkonzentration im Lysatgemisch proportional. Zunächst wurden Standards mit definierten Proteinkonzentrationen aus bovinem

Serumalbumin (BSA) (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000µg BSA/ml) erstellt, um eine entsprechende Eichgerade zu erhalten. Die Probenlösungen wurden als Duplikat (je 12,5µl Probe [1:10 Verdünnung] und 100µl Reagenzlösung) auf einer 96er Well-Platte angesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Konzentrationsmessung anhand der Eichgerade bei einer Wellenlänge von 540nm.

3.3.6.3 Überprüfung der Antikörper

Um sicherzustellen, dass die jeweiligen AK spezifisch für ein Epitop sind und keine Kreuzreaktivität zeigen, insbesondere da CRHR1 und CRHR2 eine Homogenität von 70% aufweisen, wurden folgende Überprüfungsschritte vorgenommen. Zunächst musste die genaue Protein-/Epitop-Sequenz, an die der AK bindet, bekannt sein. Dann wurde mittels der Genomdatenbank *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) das Transkript des entsprechenden Gens gesucht und die passende Proteinsequenz ausgewählt. Daraus wurde die adäquate AK-Sequenz entnommen. Im Anschluss erfolgte eine *BLAST*-Analyse der AK-Sequenz (<http://www.ebi.ac.uk>). In diesem Schritt können mehrere Proteinsequenzen eingefügt werden, um eine mögliche Homogenität auszuschließen.

3.3.6.4 Zelllinien

Die Zelllinien *3T3* und *HeLa* wurden vom Forschungslabor der HNO-Klinik Düsseldorf bereitgestellt. Die *3T3*-, sowie die *HeLa*-Zelllinie wurden nach Hersteller-Anleitung als Positivkontrolle für CRHR1 und die *3T3*-Zelllinie ausschließlich für CRHR2 verwendet.

3.3.6.5 Blotten

Die Methode Western Blot ist ein immunologisches Verfahren, um ein bestimmtes Protein in einem Proteingemisch nachzuweisen und wurde 1979 erstmals von Towbin *et al.* sowie Renart *et al.* beschrieben (Towbin *et al.*, 1979; Renart *et al.*, 1979). Dazu werden die Proteine zunächst durch *SDS-PAGE* (*Sodium-Dodecyl-Sulphate-Polyacryl-Amid Gelelektrophorese*) nach ihrem Molekulargewicht, Ladung und Form aufgetrennt. Das Beladungsvolumen der Gelkammern betrug 35µl, dafür wurde eine Stammlösung (s.

Tabelle 9) mit folgenden Komponenten erstellt und die Proben entsprechend einer Proteinladung von 200µg verdünnt.

Reagenz	Volumen
Ladepuffer (4x)	8,75 µl
Reducing Agent (10x)	3,5 µl
Gesamtvolumen	12,25 µl

Tabelle 9: Mastermix für SDS-PAGE

Danach wurden die Proben 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und dann sofort auf Eis gebracht. Zur Auftrennung der Proteine wurden die Proben und ein Marker auf ein kommerziell erhältliches 12%iges Bis-Tris Gel aufgetragen. Dieses wurde in eine Laufkammer eingespannt, die mit *MES-SDS-Laufpuffer* aufgefüllt wurde. Zusätzlich wurden 200µl Antioxidans hinzugegeben. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 110V für 1,5 Stunden nach 15minütiger Einlaufzeit bei 60V und Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden die Proteine vom Gel auf eine *Polyvinylidendifluorid-Membran* (PVDF) durch direkte Elektrophorese (Sandwich-Verfahren) übertragen und fixiert. Dazu wurde das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt, die zuvor 3 Minuten in Methanol aktiviert wurde. Die weiteren Sandwich-Komponenten (Transferschwämmchen und Filterpapier) wurden ausreichend in Transfer-Puffer getränkt. Das Sandwich wurde anschließend zusammengestellt und in eine Blot-Apparatur eingespannt. Diese wurde mit Transfer-Puffer aufgefüllt und 200µl Antioxidans hinzugegeben. Die Übertragung erfolgte bei 20V und Raumtemperatur für 1,5 Stunden. Nach dem Blotten wurde eine reversible Ponceau-Färbung durchgeführt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen. Nach erfolgter Bilddokumentation wurde die Membran mit H₂O entfärbt. Um freie Bindungsstellen der Membran zu blocken, wurde sie für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Magermilch inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primär-AK über Nacht bei Raumtemperatur im Rotationsschüttler. Die jeweiligen Verdünnungen sind in Tabelle 10 aufgelistet. Es folgten drei Waschschrte für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur mit T-PBS auf einem Schüttler. Im Anschluss wurde die Membran mit dem jeweils entsprechenden Sekundär-AK (1:10000fach verdünnt; s. Tabelle 11) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte eine Wiederholung der drei oben genannten Waschschrte. Mit Hilfe von ECL (*Enhanced chemiluminescent detection*

reagents) wurden Bilder mit verschiedener Belichtungsdauer in der *Kodak Image Station* angefertigt.

Spezifität	Typ	Wirt/Isotyp	Verdünnung	Firma
CRHR1 (ab77686)	polyklonal	Ziege	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
CRHR1 (ab136055)	polyklonal	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, UK
CRHR1 (AB9370)	polyklonal	Maus	1:200	Merck Millipore, Billerica, US
CRHR2 (ab75168)	polyklonal	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 10: verwendete AK im WB

Spezifität	Wirt/Isotyp	Verdünnung	Firma
Anti-Kaninchen (RPN4301)	Ziege	1:10000	GE Healthcare, München, D

Tabelle 11: Sekundär-AK im WB

4 Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv

Insgesamt wurden Gewebeproben von 49 Patienten in die Studie eingeschlossen. In Tabelle 12 sind die einzelnen Gruppen und Charakteristika des Patientenkollektivs aufgelistet. Darunter litten sieben Patienten an CRSsNP ohne Allergie, zwei an CRSsNP mit Allergie, 16 an CRSwNP ohne Allergie und 13 an CRSwNP mit Allergie. 11 Patienten litten an einer NAB bei Nasenmuschelhyperplasie, wobei eine CRS sowie eine atopische Grunderkrankung ausgeschlossen werden konnten. Diese Kohorte diente als Kontrollgruppe.

Weiterhin wurden 22 Patienten zuvor mit Cortison (systemisch oder lokal) behandelt, davon waren 17 Patienten in der CRSwNP-Gruppe, 1 in der CRSsNP-Gruppe und 4 in der Kontrollgruppe.

Von 36 Patienten konnte der *Lund-Score* anhand von CT-Bildern berechnet werden. Ein Wert > 10 wurde als hochgradig und ein Wert ≤ 10 als leichtgradig ausgeprägte CRS gewertet. Bei Patienten, die zur Kontrollgruppe zugeordnet wurden, ist oftmals kein CT-Bild präoperativ angeordnet worden.

Charakteristika	Gesamt (n=49)	CRSsNP (n=9)	CRSwNP (n=29)	Kontrolle (n=11)	p-value
Demografie					
Frauen (%)	15 (30,6)	6 (66,6)	7 (24,1)	2 (14,3)	0,848
Alter (Jahren)	40 +/- 14 (35)	38 +/-12 (35)	43 +/- 13 (41)	34 +/- 16 (29)	0,218
Komorbiditäten					
Allergie (ganzjährig/saisonal)	15 (30,6%)	2 (22,2%)	13 (44,8%)	0	0,0244
Raucher (%)	16 (32,7%)	2 (22,2%)	9 (31,0%)	5 (42,9%)	0,1286
Medikation					
Cortison (systemisch/lokal)	22 (44,9%)	1 (11,1%)	17 (58,6%)	4 (28,6%)	0,3111
Score					
Lund-Score	12 +/- 6	8 +/- 5,2	14,5 +/- 5	4 +/-3	< 0.0001

Tabelle 12: Charakteristika des Patientenkollektivs

Auswertung Alter und Lund-Score mittels einfaktorieller Varianzanalyse bzw. Kruskal-Wallis-Test
Die übrige Auswertung erfolgte mittels Chi-Quadrat-Analyse

4.2 Qualitative und morphologische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

4.2.1 Übersicht

Die Paraffineinbettung erfolgte bei allen eingegangenen Proben und es blieb eine gute Gewebestruktur erhalten. Ein Teil der Proben konnte auf Grund von technischen Fehlern nicht in ausreichend guter Qualität geschnitten und somit nicht verwendet werden.

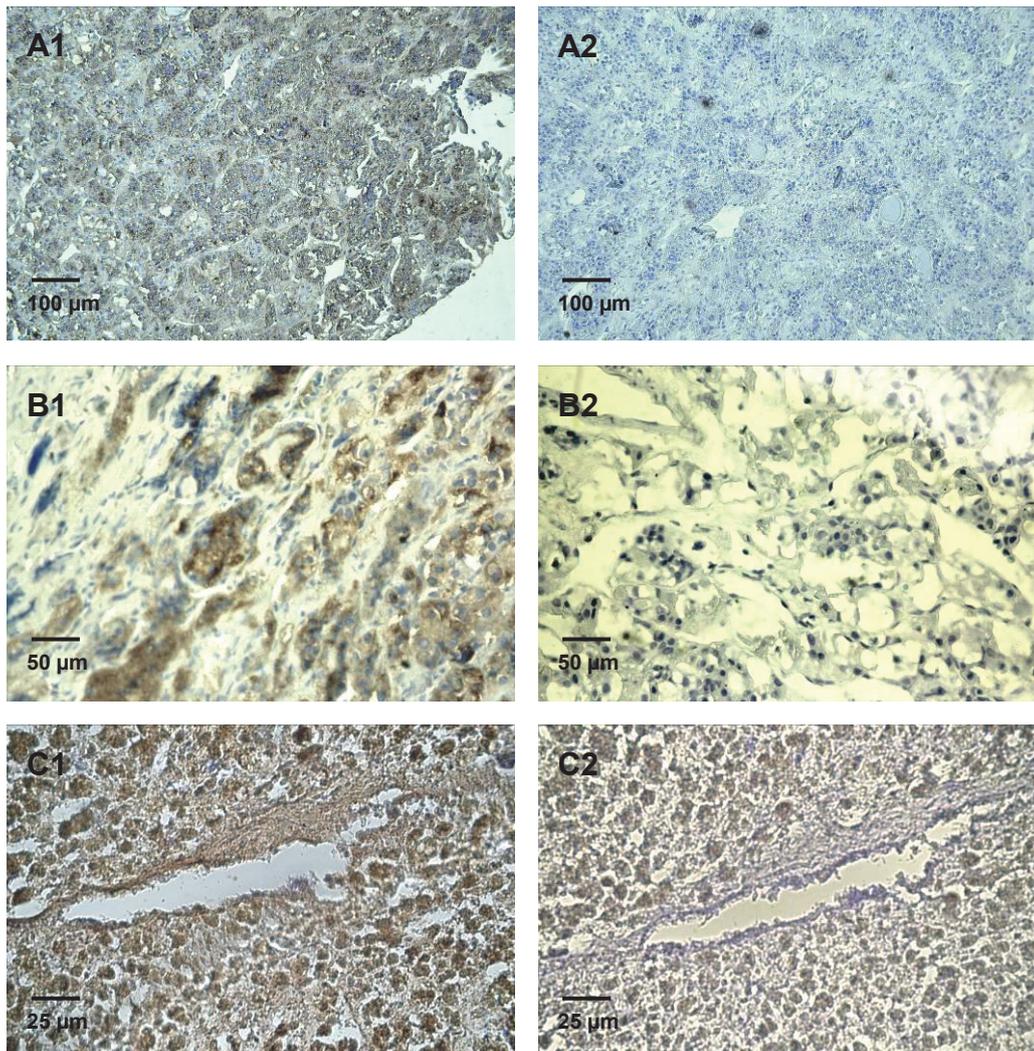


Abb. 3: Immunhistochemische Austestung der CRHR1-, CRHR2- und MC2R-AK am Positivgewebe mit jeweiliger Negativkontrolle in 50x (A1-A2) und 100x (B1-C2) Vergrößerung

A1: Anfärbung des CRHR1 im Hypophysengewebe (braun gefärbt)

A2: Negativkontrolle

B1: Anfärbung des CRHR2 im Hypophysengewebe (braun gefärbt)

B2: Negativkontrolle

C: Anfärbung des MC2R im Nebennierengewebe (braun gefärbt)

C2: Negativkontrolle (mit brauner Hintergrundfärbung)

Bei jedem Färbevorgang wurde pro Gewebeschnitt eine Negativkontrolle durchgeführt. Bei einem Teil der Proben ist es während des Färbeprozesses zu Schäden der Schnitte

gekommen, so dass diese nicht zur Auswertung zur Verfügung standen. Insgesamt konnten 18 Schnitte gefärbt und ausgewertet werden.

Zunächst wurden die jeweiligen AK an entsprechendem Positivgewebe ausgetestet, wobei ebenfalls bei jedem Färbeverfahren jeweils eine Negativkontrolle durchgeführt worden ist (Abb. 3). Das Färbeprodukt von CRHR1, CRHR2 und MC2R stellt sich auf Grund der DAB-Färbung braun dar. CRHR1 und CRHR2 haben ein spezifisches Färbemuster am Hypophysengewebe gezeigt und in der jeweiligen Negativkontrolle ist keine Hintergrundfärbung erkennbar (Abb. 3 A1-B2). Der MC2R-AK weist am Nebennierengewebe ebenfalls ein spezifisches Färbemuster auf, allerdings zeigt die Negativkontrolle eine leichte braune Hintergrundfärbung (Abb. 3 C1-C2).

4.2.2 CRHR1

Insgesamt wurden jeweils 16 Gewebeschnitte von 13 Patienten für die CRHR1 Färbung verwendet. Der Rezeptor konnte im Zielgewebe sowohl bei Patienten mit CRSw/ mit und ohne Allergie, als auch in der Kontrollgruppe immunhistochemisch detektiert werden.

Im Färbeergebnis zeigen sich vor allem eine spezifische Anfärbung von vaskulären Endothelien, von mukösen und serösen Drüsenepithelien sowie eine unspezifische Anfärbung von submukösem Bindegewebe. Zum Teil zeigt sich eine leichte Hintergrundfärbung, die allerdings die Auswertung nicht negativ beeinflusst.

In Abbildung 4 ist das Färbemuster des CRHR1 in der Kontrollgruppe dargestellt. Es lassen sich dort wenige, schwach gefärbte Gefäßendothelien und Drüsenepithelien nachweisen. Allerdings zeigt Abb. 4 C eine starke Färbung des submukösen Bindegewebes. Die Negativkontrolle von Abb. 4 C ist in Abb. 5 zu erkennen.

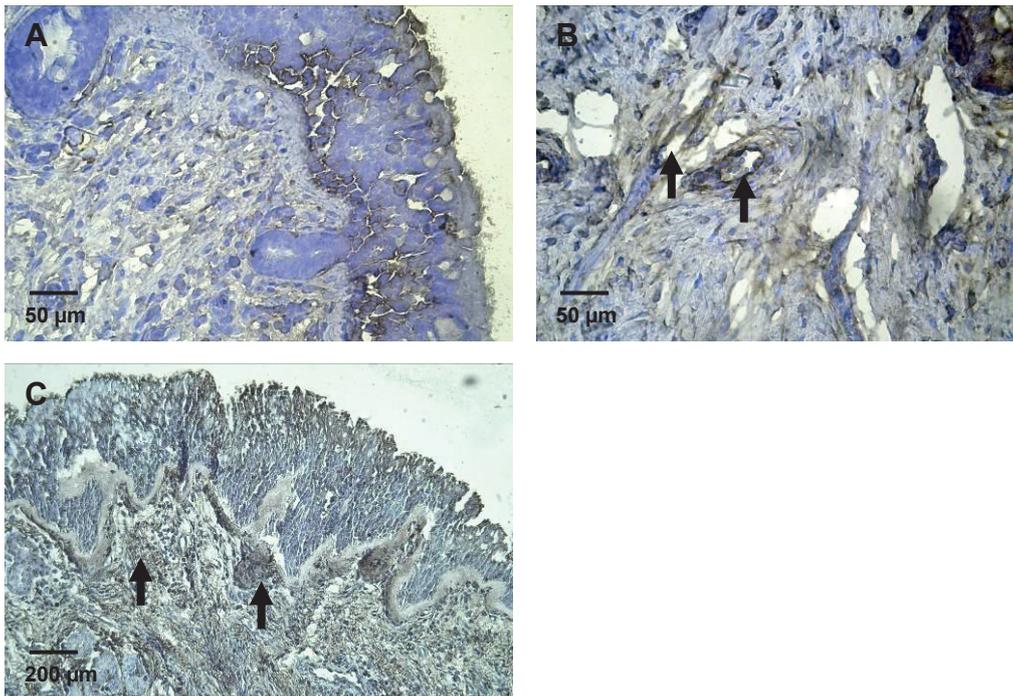


Abb. 4: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 im Gewebe von drei Patienten der Kontrollgruppe in 100x (A-B) und in 25x (C) Vergrößerung

A: Außer bei einem Gefäß sind kaum spezifische Gefäßendothelien nachweisbar

B: Schwach gefärbte Gefäßendothelien (s. Pfeile)

C: Starke Färbung des submukösen Bindegewebes (s. Pfeile)

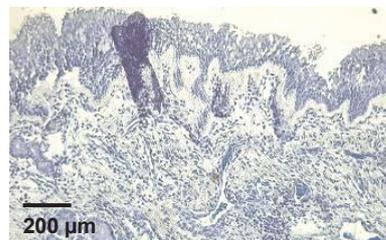


Abb. 5: Negativkontrolle der Abb. 4 C in 50x Vergrößerung

Die Färbeergebnisse der CRSsNP ohne Allergie-Proben zeigen im Vergleich zum Normalgewebe ein stärkeres Färbeverhalten an serösen und mukösen Drüsenepithelien (Abb. 6). Die Gefäßendothelien sind ähnlich schwach angefärbt. Im Flimmerepithel sind ebenfalls vereinzelte Braunfärbungen zu erkennen. Unspezifische Färbungen des Bindegewebes, insbesondere in der Lamina propria sind in allen Schnitten zu sehen. Die jeweiligen Negativkontrollen sind in Abb. 7 dargestellt.

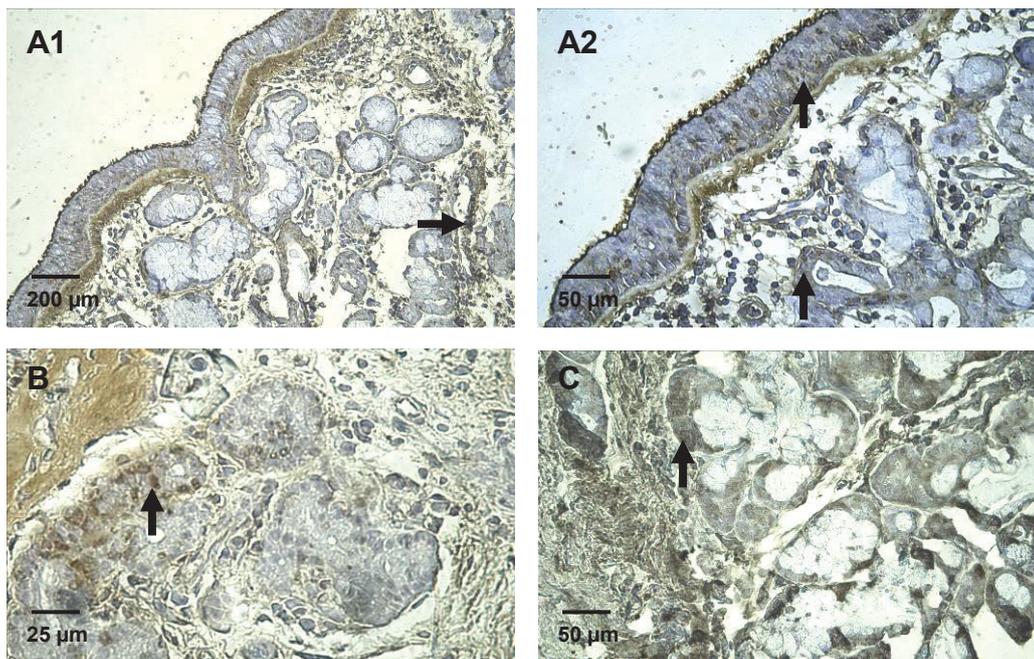


Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 im Gewebe von drei Patienten mit CRSsNP ohne Allergie in 50x (A1), 100x (A2, C) und 400x (B) Vergrößerung

A1 und A2: Braun gefärbte Gefäßendothelien und Drüsenepithelien (s. Pfeile) sowie unspezifische Färbung der Lamina propia

B: Braun gefärbte Drüsenepithelien von serösen Drüsen und unspezifische Färbung der Lamina propia

C: Schwach gefärbte Drüsenepithelien von mukösen Drüsen und unspezifische Färbung des umgebenden Bindegewebes

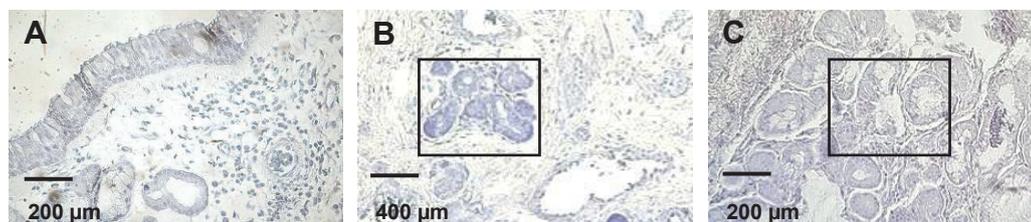


Abb. 7: Negativkontrolle der jeweiligen Proben in Abb. 6 in 50x (A, C) und 25x (B) Vergrößerung

A: Repräsentativer Ausschnitt der Probe A1 und A2

B: Kästchen markiert den entsprechenden Ausschnitt der Probe B

C: Kästchen markiert den entsprechenden Ausschnitt der Probe C

Bei den Proben der Patienten mit CRSsNP mit Allergie ist eine verstärkte Anfärbung der serösen und mukösen Drüsenepithelien sowohl gegenüber des Normalgewebes als auch gegenüber der Proben der Patienten mit CRSsNP ohne Allergie erkennbar (Abb.8). Außerdem ist eine schwache Färbung der Gefäßendothelien, sowie eine ähnlich starke Braunfärbung des Bindegewebes darstellbar (Abb. 8 A s. Pfeile). Die jeweiligen Negativkontrollen sind in Abb. 9 abgebildet.

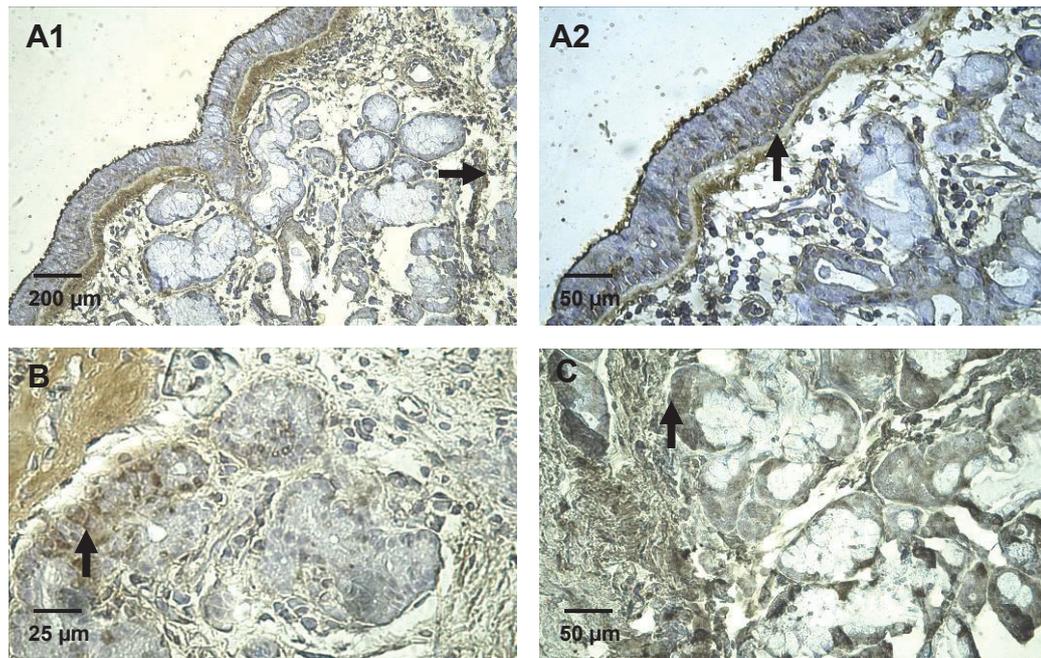


Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 im Gewebe von drei Patienten mit CRSsNP mit Allergie in 200x (A, C2), 100x (B) und 50x (C1) Vergrößerung

A: Braun gefärbte Gefäßendothelien und Drüsenepithelien sowie starke unspezifische Färbung der Lamina propria und des Bindegewebes (s. Pfeile)

B: Braun gefärbte seröse Drüsenepithelien (s.Pfeil) und leicht gefärbte Gefäßendothelien

C: Braun gefärbte Gefäßendothelien und Drüsenepithelien (s.Pfeil) sowie unspezifische Färbung der Lamina propria

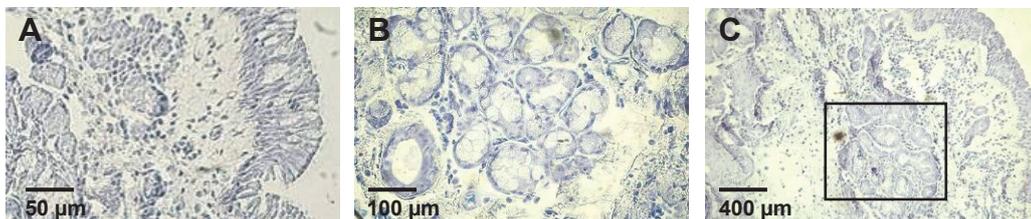


Abb. 9: Negativkontrolle der jeweiligen Proben in Abb. 8 in 50x (A), 100x (B) und 25x Vergrößerung

A: Repräsentativer Ausschnitt der Probe A

B: Repräsentativer Ausschnitt der Probe B

C: Kästchen markiert den entsprechenden Ausschnitt der Probe C2

Die Färberegebnisse der Patientenproben mit CRSwNP ohne Allergie zeigen eine schwach stärkere Färbung der Gefäßendothelien im Vergleich zum Gewebe der Kontrollgruppe. Auch das seröse Drüsenepithel wird nur schwach angefärbt (s. Abb. 10). Weiterhin ist eine schwache unspezifische Färbung des Bindegewebes in allen dargestellten Schnitten zu erkennen.

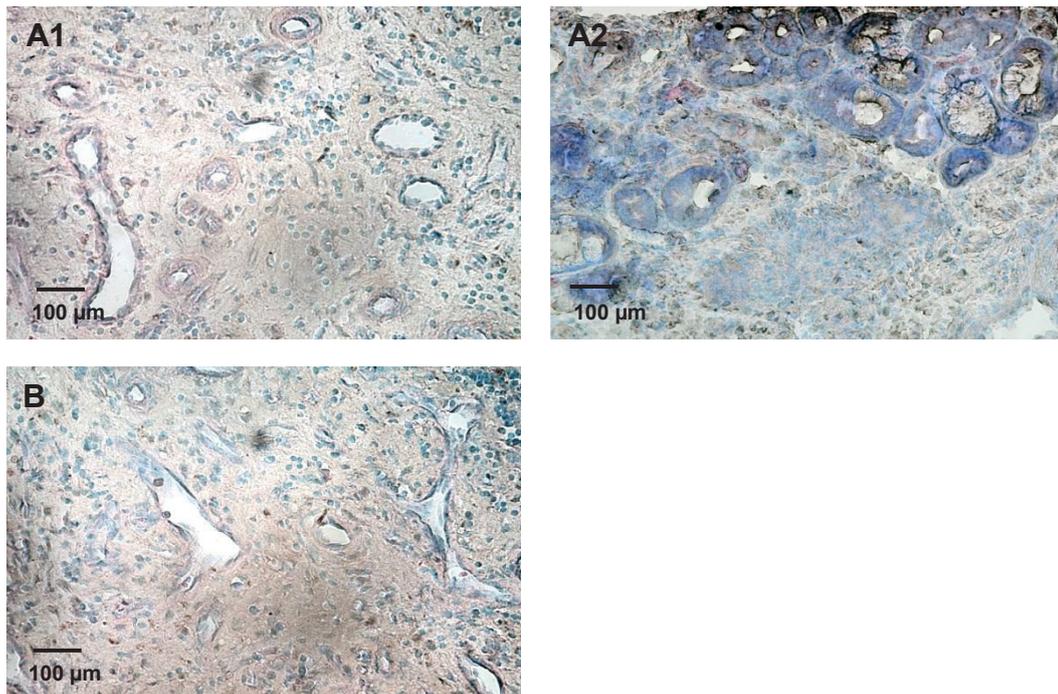


Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 im Gewebe von zwei Patienten mit CRSwNP ohne Allergie in 100x (A1, A2, B) Vergrößerung

A1: Braun gefärbte Gefäßendothelien und leichte Färbung des Bindegewebes

A2: Leicht braun gefärbte Drüsenepithelien; am oberen Rand ist eine starke Färbung der Drüsenepithelien zu erkennen (Artefakt)

B: Leicht braun gefärbte Gefäßendothelien und schwache Färbung des Bindegewebes

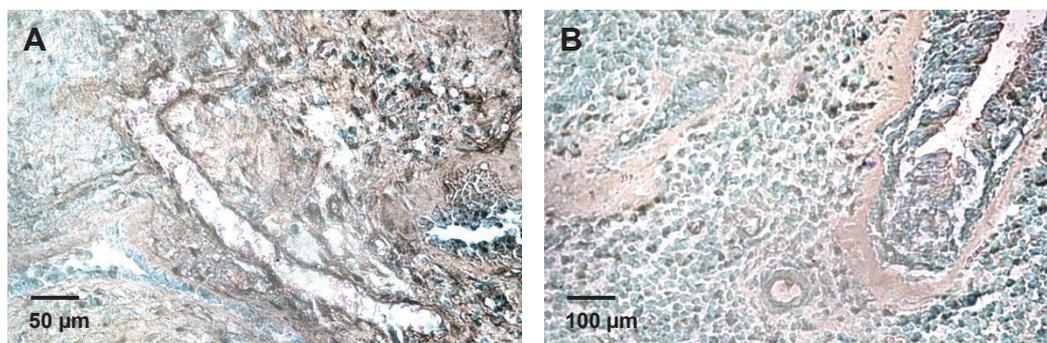


Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR1 in Gewebe von zwei Patienten mit CRSwNP mit Allergie in 200x (A) und 100x (B) Vergrößerung

A: Braun gefärbte Gefäßendothelien und unspezifische Färbung des Bindegewebes

B: Sehr schwach braun gefärbte Gefäßendothelien und unspezifische Färbung des Bindegewebes

Die Abb. 11 zeigt die immunhistochemischen Nachweise von CRHR1 im Gewebe von Patienten mit CRSwNP mit Allergie. Die Färbung der Gefäßendothelien ist im Vergleich zum Gewebe der Kontrollgruppe kaum stärker. Drüsenepithelien konnten nicht angefärbt werden. Es zeigt sich auch hier eine leichte unspezifische Hintergrundfärbung.

4.2.3 CRHR2

Insgesamt wurden 17 Gewebeschnitte von 12 Patienten für die CRHR2 Färbung verwendet. Der Rezeptor konnte im Zielgewebe sowohl bei Patienten mit CRSw/sNP mit und ohne Allergie als auch in der Kontrollgruppe immunhistochemisch detektiert werden.

Bei der immunhistochemischen Darstellung von CRHR2 färben sich insbesondere Gefäßendothelien und Drüsenepithelien. Es findet sich auch eine Anfärbung des umgebenen Bindegewebes, allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den CRHR1 Färbeergebnissen. Die jeweiligen Negativkontrollen zeigen eine spezifische Blaufärbung der Zellkerne und keine Hintergrundfärbung durch DAB.

In Abb. 12 ist das Färbeergebnis im Normalgewebe zu erkennen. Es zeigt sich eine schwache Anfärbung der entsprechenden Zielstrukturen. Drüsenepithelien und Bindegewebe sind leicht angefärbt, wobei diese bei der Hintergrundfärbung nicht sicher von unspezifischen Effekten zu differenzieren sind. Abb. 13 zeigt die Negativkontrolle Gewebeschnitte in Abb. 12.

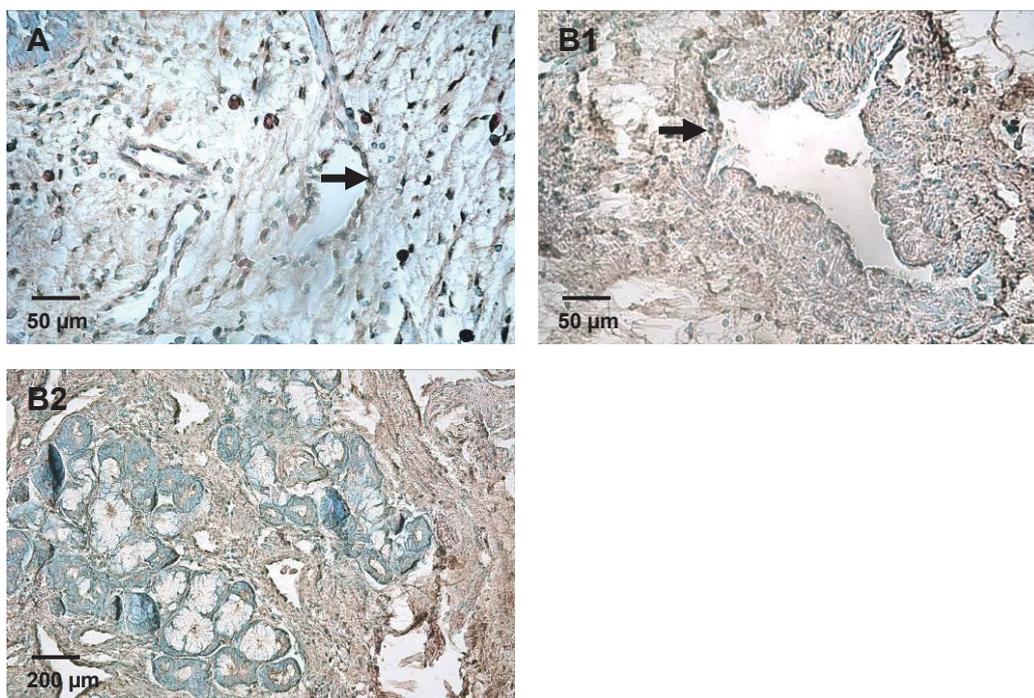


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 im Gewebe von zwei Patienten der Kontrollgruppe in 200x (A, B1) und 50x (B2) Vergrößerung

A: Schwach gefärbte Gefäßendothelien (s. Pfeil) sowie unspezifische Färbung des Bindegewebes

B1: Schwach gefärbte Gefäßendothelien sowie unspezifische Färbung des Bindegewebes

B2: Schwach gefärbte Drüsenepithelien sowie unspezifische Färbung des Bindegewebes

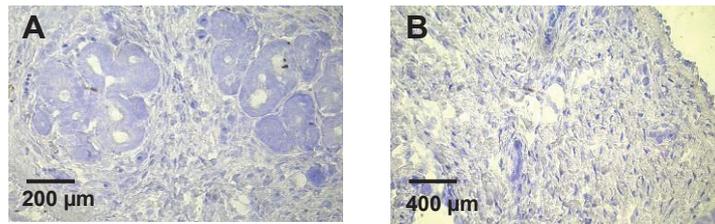


Abb. 13: Negativkontrolle der jeweiligen Proben in Abb. 12 in 50x (A) und 25x (B) Vergrößerung
 A: Repräsentativer Ausschnitt der Probe A
 B: Repräsentativer Ausschnitt der Probe B

In den dargestellten Gewebeschnitten von Patienten mit CRSsNP ohne Allergie zeigen sich im Vergleich zum Kontrollgewebe kaum Unterschiede im Färbeverhalten. Die Gefäßendothelien weisen eine schwache und die Drüsenepithelien keine erkennbare Anfärbung auf (s. Abb. 14). Eine Hintergrundfärbung ist schwach erkennbar.

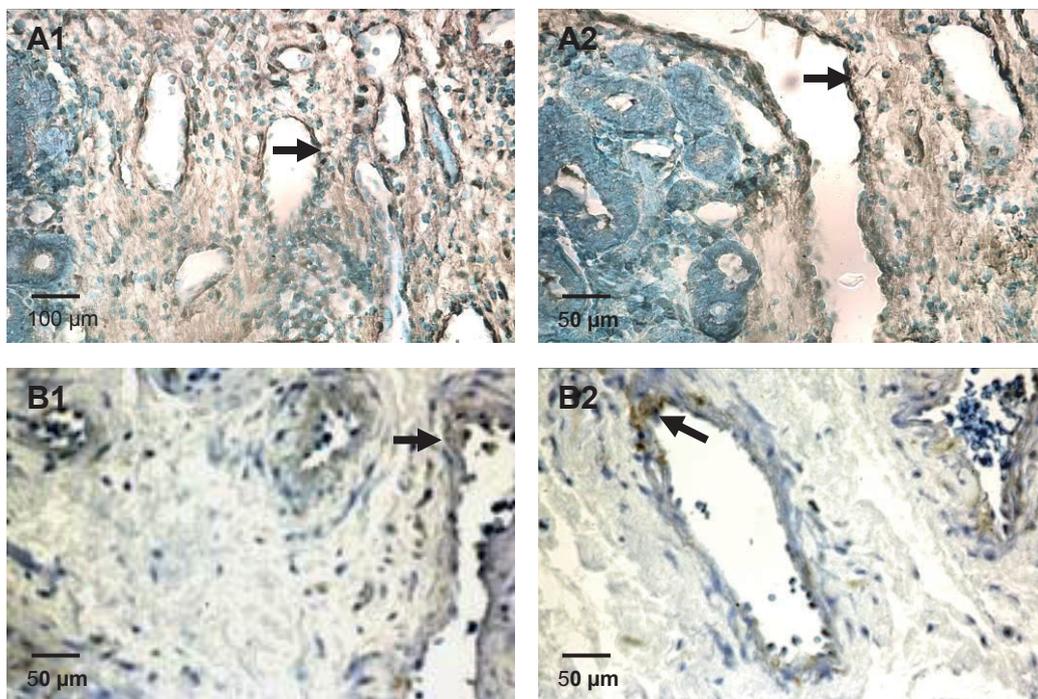


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 in Gewebe von zwei Patienten mit CRSsNP ohne Allergie in 100x (A1) und 200x (A2-B2) Vergrößerung
 A1 und A2: Schwach gefärbte Gefäßendothelien (s. Pfeil) sowie unspezifische Färbung des Bindegewebes
 B1 und B2: Schwach gefärbte Gefäßendothelien (s. Pfeil)

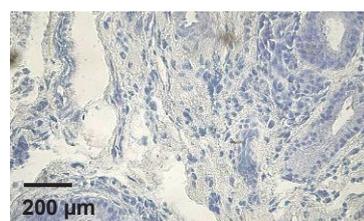


Abb. 15: Negativkontrolle der Abb. 14 A in 50x Vergrößerung

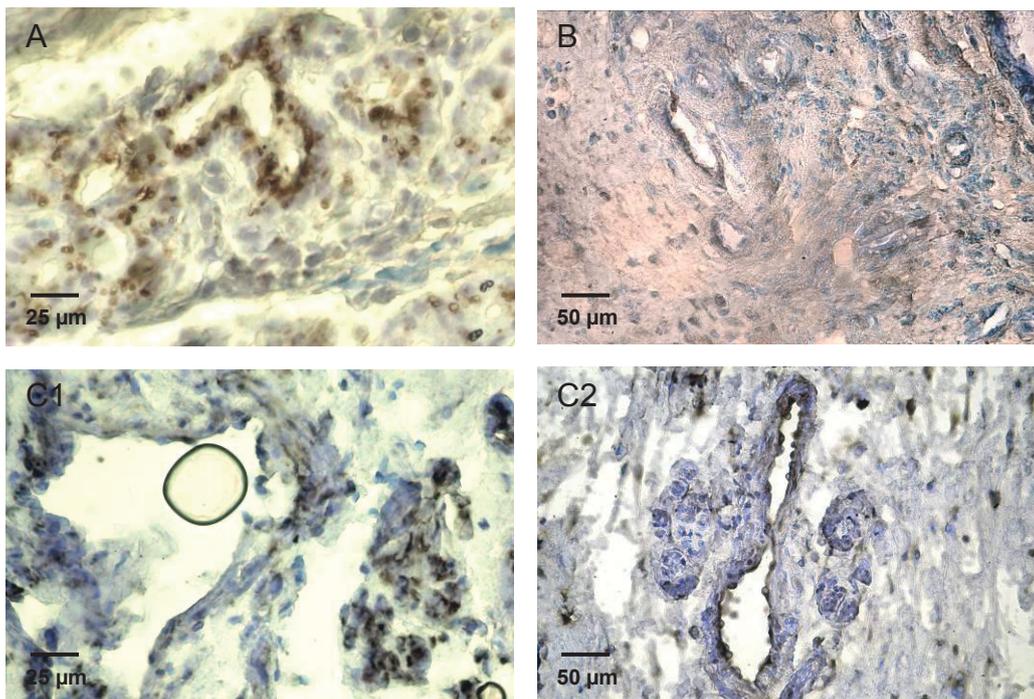


Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 in CRSsNP mit Allergie-Gewebe von 3 Patienten in 400x (A,C1) und 200x (B,C2) Vergrößerung

A: Braun gefärbtes seröses Drüsenepithel

B: Braun gefärbte Gefäßendothelien sowie unspezifische Färbung des Bindegewebes

C1 und C2: Braun gefärbte Gefäßendothelien, in C1 ist ein Artefakt (Luftblase) zu erkennen

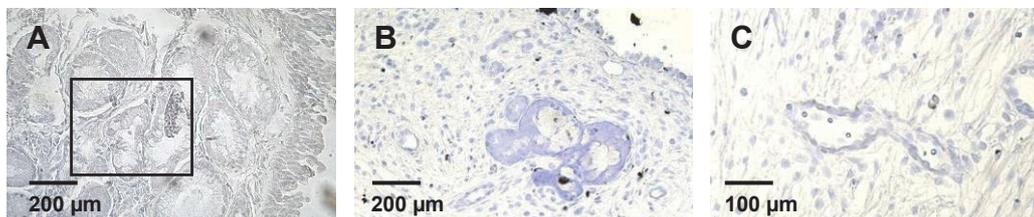


Abb. 17: Negativkontrolle der jeweiligen Proben in Abb. 16 in 50x (A,B) und 100x (C) Vergrößerung

A: Kästchen markiert den entsprechenden Ausschnitt der Probe A in Abb. 16

B: Repräsentativer Ausschnitt der Probe B

C: Repräsentativer Ausschnitt der Probe C2

Abb. 16 zeigt das Färbemuster von Gewebeschnitten von Patienten mit CRSsNP mit Allergie. Diese weisen im Vergleich zum Normalgewebe eine stärkere Braunfärbung der Drüsenepithelien auf. Im Gegensatz dazu stellen sich die Gefäßendothelien in gleicher Intensität dar. Eine unspezifische Hintergrundfärbung ist kaum erkennbar. Die jeweiligen Negativkontrollen sind in Abb. 17 dargestellt.

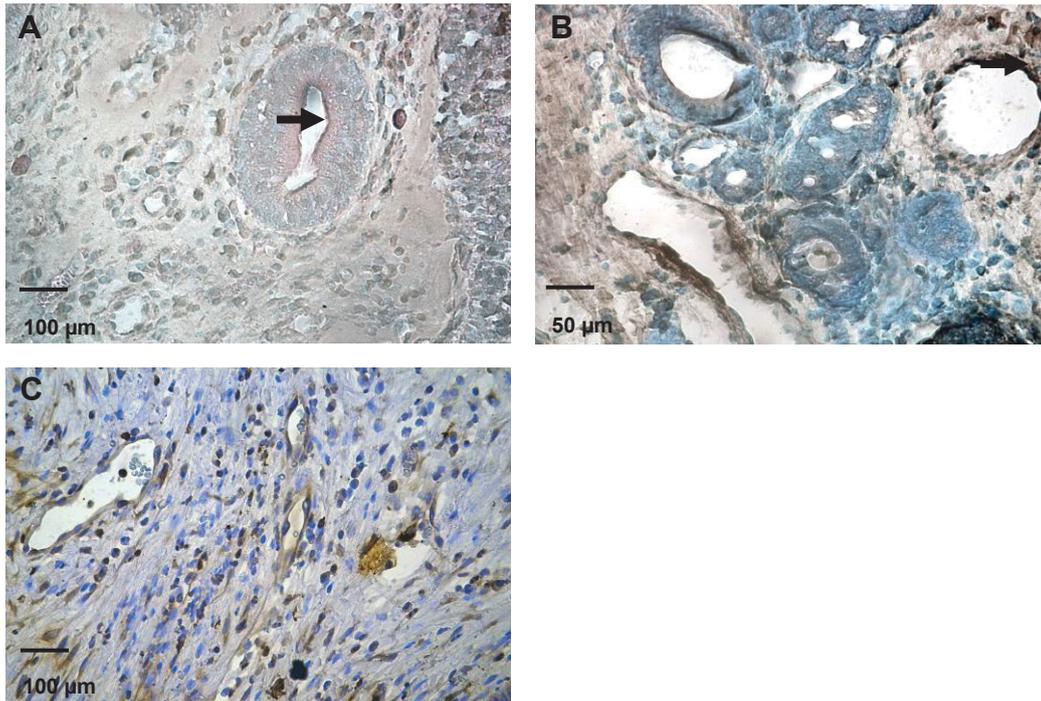


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 im Gewebe von drei Patienten mit CRSwNP ohne Allergie in 200x (B) und 100x (A,C) Vergrößerung

A: Braun gefärbte Gefäßendothelien (s. Pfeil)

B: Braun gefärbte Gefäßendothelien (s. Pfeil) und seröse Drüsenepithelien sowie unspezifische Färbung des Bindegewebes

C: Braun gefärbte Gefäßendothelien

In Abb. 18 sind die immunhistochemischen Färberegebnisse des CRHR2-AK im Gewebe von Patienten mit CRSwNP ohne Allergie dargestellt. Es zeigt sich eine deutlich stärkere Färbung der Gefäßendothelien im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Drüsenepithelien sind nur leicht angefärbt. Es zeigt sich nur eine leichte Hintergrundfärbung.

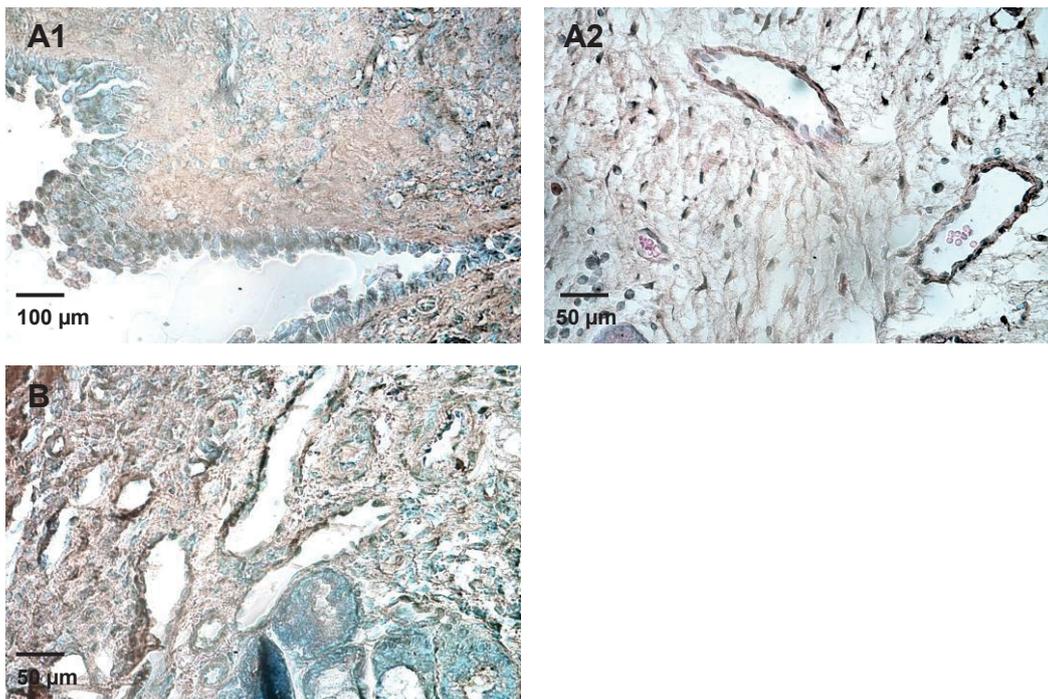


Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis von CRHR2 im Gewebe von zwei Patienten mit CRSwNP mit Allergie in 200x (A2, B) und 100x (A1) Vergrößerung

A1: Schwach braun gefärbte Gefäßendothelien

A2: Braun gefärbte Gefäßendothelien

B: Braun gefärbte Gefäßendothelien und unspezifische Färbung des Bindegewebes

Der immunhistochemische Nachweis von CRHR2 in Gewebe von Patienten mit CRSwNP mit Allergie ist in Abb. 19 dargestellt. Die Gefäßendothelien sind im Vergleich zum Kontrollgewebe stark braun angefärbt. Im Vergleich zu den Gewebeschnitten der Patienten mit CRSwNP ohne Allergie zeigt sich kein Unterschied. Die Drüsenepithelien sind nicht angefärbt, bei schwacher unspezifischer Färbung des Bindegewebes.

4.2.4 MC2R

Insgesamt wurden 10 Gewebeschnitte für die MC2R Färbung verwendet. Der Rezeptor konnte im Zielgewebe weder bei Patienten mit CRSw/sNP mit und ohne Allergie, noch in der Kontrollgruppe immunhistochemisch detektiert werden.

In Abb. 20 sind die Färbeergebnisse beispielhaft dargestellt. Es zeigt sich lediglich eine unspezifische Hintergrundfärbung. Gefäßendothelien und Drüsenepithelien sind nicht spezifisch gefärbt.

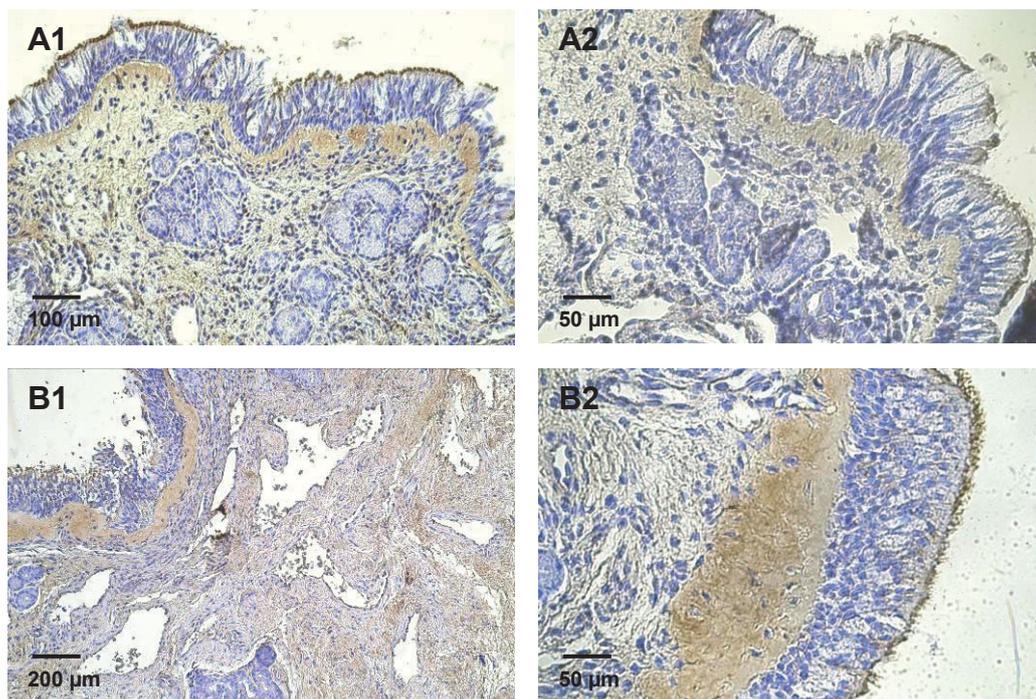


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis von MC2R in CRSsNP ohne und mit Allergie-Gewebe von 2 Patienten in 100x (A1), 200x (A2, B2) und 50x (B1) Vergrößerung

A1 und A2: CRS-Gewebe ohne Anfärbung von Gefäßendothelien oder Drüsenepithelien mit starker Färbung des Bindegewebes und der Lamina propria

B1 und B2: CRSA-Gewebe ohne Anfärbung von Gefäßendothelien oder Drüsenepithelien mit unspezifischer Hintergrundfärbung

4.3 Western Blot

Die Proteinextraktion konnte bei allen 49 Proben erfolgreich durchgeführt und die Proteinkonzentration mittels BCA gemessen werden.

Für die Western Blot-Analysen wurden jeweils 7 Proben und die in der Herstelleranleitung angegebenen Positivkontrollen verwendet. Es wurden pro AK zwei Testläufe durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Allerdings kam es aufgrund zu hoher Proteinkonzentrationen der Patientenproben zu einer Überladung der Bindekapazität der Western Blot Membranen. Hingegen wiesen die Positivkontrollen eine geringere Gesamtproteinkonzentration auf und die Banden waren bei gleicher Verdünnung oftmals nur schwach ausgeprägt (s. Abb. 21 und 22). Die Western Blots konnten anschließend nicht ausreichend ausgewertet werden und mögliche Proteinunterschiede nicht detektiert werden.

Insgesamt wurden drei CRHR1-AK von verschiedenen Anbietern ausgetestet. Bei keinem AK konnten spezifische, positive Banden in der Positivkontrolle (*HeLa*- und *3T3-Zellen*) nachgewiesen werden (s. Abb. 21). Bei der Austestung des CRHR2-AK konnten ebenfalls keine Banden, weder im Positivgewebe noch im Proteingemisch der Probanden, im spezifischen Bereich von 38 kDa detektiert werden (s. Abb. 22). Hinzu kommt, dass die Recherche für einen weiteren spezifischen AK für CRHR2 ergebnislos blieb.

Auf die Austestung des MC2-Rezeptors wurde aufgrund des bereits fehlenden Nachweises in der qRT-PCR verzichtet.

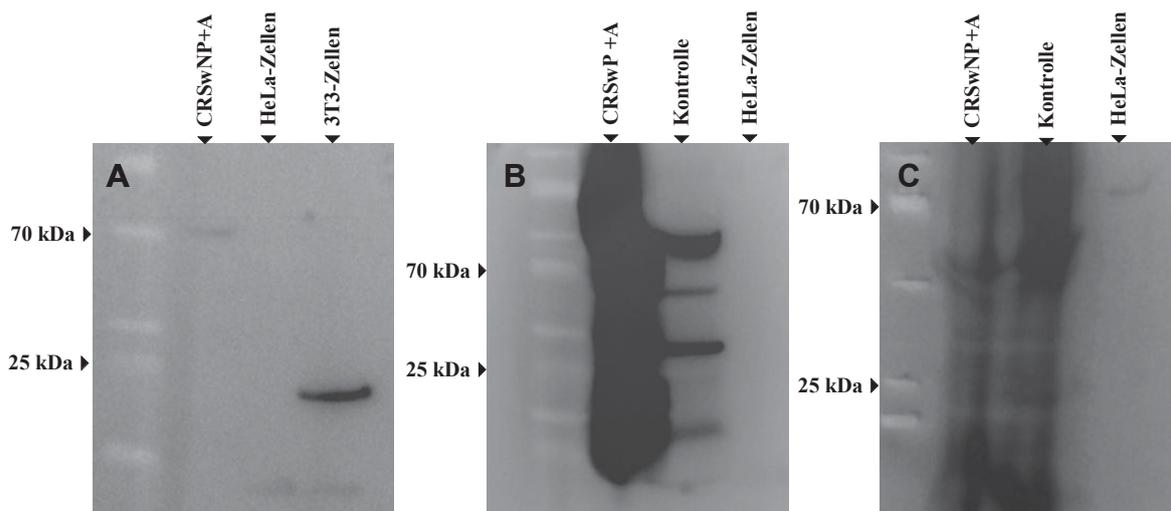


Abb. 21: CRHR1 AK-Testung

A: AK von *Abcam*. Weder die Banden der Positivkontrolle (HeLa- und 3T3-Zellen) noch der Probanden sind im Bereich von 60 kDa.

B: AK von *Abcam*. Hier zeigt sich bei einer Verdünnung von 1:200 eine Proteinüberladung der Western Blot Membran bei CRSwNP+A, so dass eine weitere Auswertung nicht möglich ist. In der Probe der Kontrollgruppe ist die Proteinüberladung geringer ausgeprägt, allerdings zeigten sich hier mehrere unspezifische Banden. Bei der Positivkontrolle (HeLa-Zellen) zeigt sich hingegen eine sehr schwache Bande außerhalb des spezifischen Bereichs von 51 kDa.

C: AK von *Merck*. Hier zeigt sich in der Positivkontrolle bei einer Verdünnung von 1:2000 keine Proteinüberladung im Gegensatz zu den Proben der Patienten. Der AK wurde vom Hersteller noch nicht für WB ausgetestet.

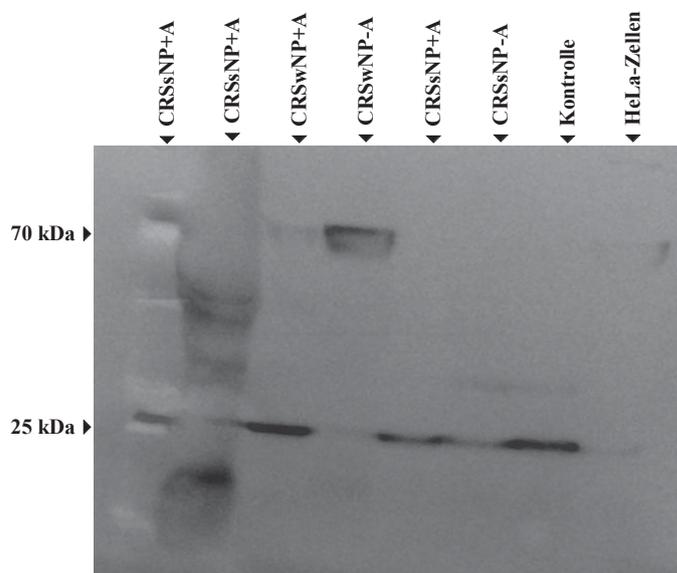


Abb. 22: CRHR2-AK-Testung

Insgesamt wurden bei 8 Proben der AK von Abcam ausgetestet. Bei der Positivkontrolle (HeLa-Zellen) zeigt sich eine sehr schwache Bande außerhalb des spezifischen Bereichs von 38 kDa. Auch bei den Patientenproben können lediglich Banden außerhalb des spezifischen Bereichs detektiert werden.

4.4 Quantitative RT-PCR

4.4.1 Übersicht

Die Methodik der RNA Extraktion aus Gewebe ist erfolgreich etabliert und bei insgesamt 49 Proben angewandt worden. Bei Gewebeproben, bei denen zu wenig Material vorhanden war oder die ausschließlich aus polypösem Gewebe bestanden, konnte keine RNA bzw. kontaminierte RNA gewonnen werden. Es wurde ausschließlich RNA bzw. cDNA genutzt, die in den Qualitätskontrollen Bestand hatten (s. Abb. 23).

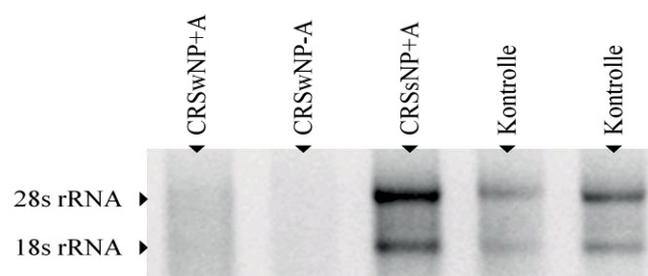


Abb. 23: RNA-Qualitätskontrolle

An den Banden der rRNA kann die Qualität der RNA mittels Geldokumentationssystem kontrolliert werden. Das Verhältnis der Intensität der 18s zur 28s rRNA-Bande sollte ca. 1:2 betragen. Die Abbildung zeigt exemplarisch an fünf Proben die Durchführung des Kontrollschritts. Bei den ersten beiden Banden wurde polypöses Gewebe verwendet, es zeigen sich keine detektierbaren Banden, daher wurden diese beiden Proben nicht weiter verwendet. In Bande 3,4 und 5 präsentieren sich die 18s und 28s Banden im gewünschten Verhältnis zueinander und wurden für die qRT-PCR verwendet.

Insgesamt wurden 29 Proben für die qRT-PCR verwendet und ausgewertet. Darunter vier Proben von Patienten mit CRSsNP ohne Allergie, zwei Proben von Patienten mit CRSsNP mit Allergie, neun Proben von Patienten mit CRSwNP ohne Allergie und fünf Proben von Patienten mit CRSwNP mit Allergie sowie neun Kontrollproben.

CRHR1 und *CRHR2* konnten auf mRNA Ebene im Zielgewebe nachgewiesen werden. Die Genexpression des *MC2R* konnte in den Vorversuchen nicht gezeigt werden und wird in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt.

4.4.2 CRHR1

In der genaueren Betrachtung der Expressionsrate von *CRHR1* in den jeweiligen Gruppen (s. Abb. 24) zeigt sich eine Erhöhung ohne Signifikanz von CRSwNP mit Allergie verglichen mit der Kontrollgruppe. Die übrigen Gruppen weisen, ebenfalls ohne Signifikanz (s. Tab. 13), eine tendenziell erniedrigte Expressionsrate auf. CRSwNP ohne Allergie hat eine ungefähr gleich hohe Expressionsrate.

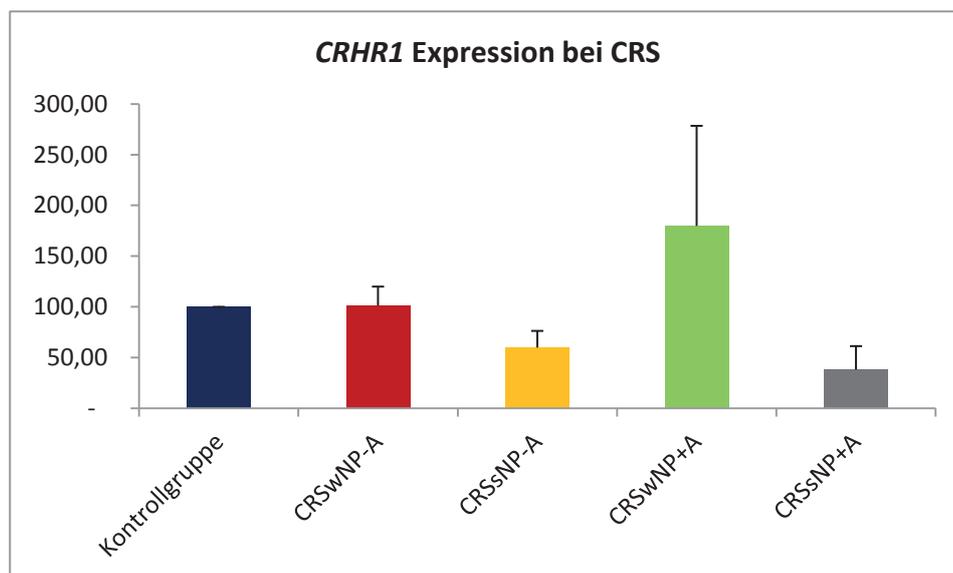


Abb. 24: Expressionsunterschiede von *CRHR1* in den abgebildeten Gruppen in Bezug auf die Kontrollgruppe

CRS-Gruppe vs. Kontrolle	p-Wert
CRSwNP-A vs. Kontrolle	ns
CRSsNP-A vs. Kontrolle	ns
CRSwNP+A vs. Kontrolle	ns
CRSsNP+A vs. Kontrolle	ns

Tabelle 13: Ausprägung der Expressionsrate von *CRHR1* in den einzelnen CRS-Gruppen ohne signifikanten Unterschied

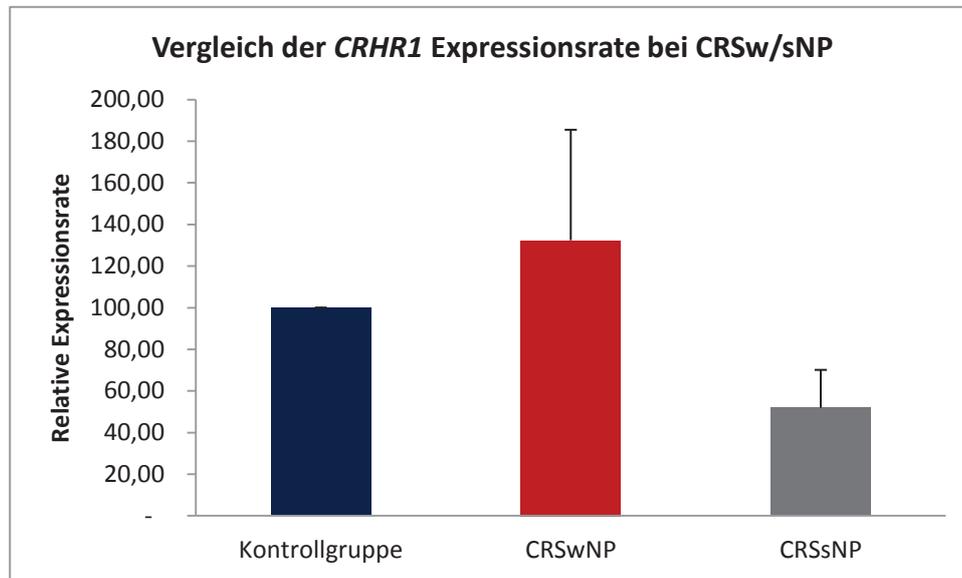


Abb. 25: Expressionsunterschiede von *CRHR1* bei CRSwNP im Vergleich zu CRSsNP in Bezug auf die Kontrollgruppe

Abb. 25 zeigt die Expressionsunterschiede von *CRHR1* bei CRSwNP (n=14) im Vergleich zu CRSsNP (n=6) und zur Kontrollgruppe (n=9). Dabei wurden alle Proben, die NP aufwiesen, mit denen ohne NP, unabhängig vom Vorhandensein von Allergien, verglichen. Es zeigt sich eine gering höhere Expressionsrate von CRSwNP (MW 132,37) sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber der CRSsNP-Gruppe (MW 51,92). Auch hier konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden.

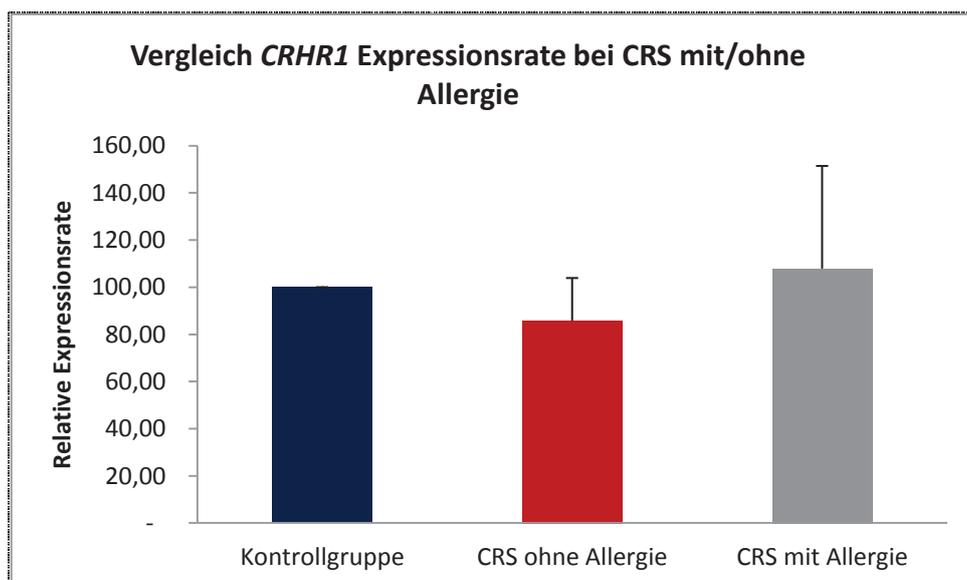


Abb. 26: Expressionsunterschiede von *CRHR1* bei CRS mit Allergie im Vergleich zu CRS ohne Allergie in Bezug auf die Kontrollgruppe

Um zu klären, ob der Faktor Allergie einen Unterschied bei der Ausprägung von *CRHR1* ausmacht, wurde CRS mit Allergie (n=7) in Bezug auf CRS ohne Allergie (n=13) und auf die Kontrollgruppe (n=9) untersucht (s. Abb. 26). Das Vorkommen von NP war unabhängig davon. Es zeigten sich hier nur geringfügige Unterschiede mit keinen nennenswerten Tendenzen.

Außerdem wurde geprüft, ob der Schweregrad der CRS, der anhand des *Lund-Scores* ermittelt wurde, einen Einfluss auf die Expressionsrate von *CRHR1* hat. Dabei wurde ein Wert > 10 als schwer und entsprechend ein Wert ≤ 10 als leicht ausgeprägte CRS gewertet. Dabei ergab sich eine jeweilige Gruppenstärke von 9 Proben bei einem *Lund-Score* ≤ 10 und 8 Proben bei einem Wert > 10 . Wie aus Abb. 27 ersichtlich ist, zeigen sich keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der *CRHR1* Expression.

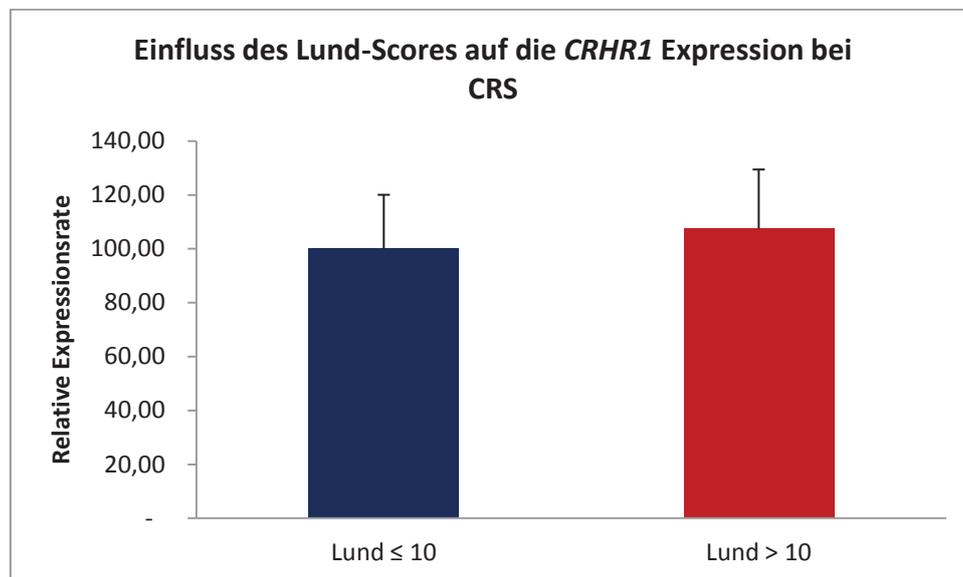


Abb. 27: Einfluss des *Lund-Scores* auf die *CRHR1* Expression bei CRS in Bezug auf die *CRHR1* Expression bei einem *Lund-Score* ≤ 10

4.4.3 CRHR2

Abb. 28 zeigt eine Übersicht über die Expressionsunterschiede von *CRHR2* in den verschiedenen Krankheitsentitäten bezogen auf die Kontrollgruppe. Dabei zeigt sich eine signifikante Erhöhung der *CRHR2* Ausprägung bei CRSwNP mit Allergie gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,022$).

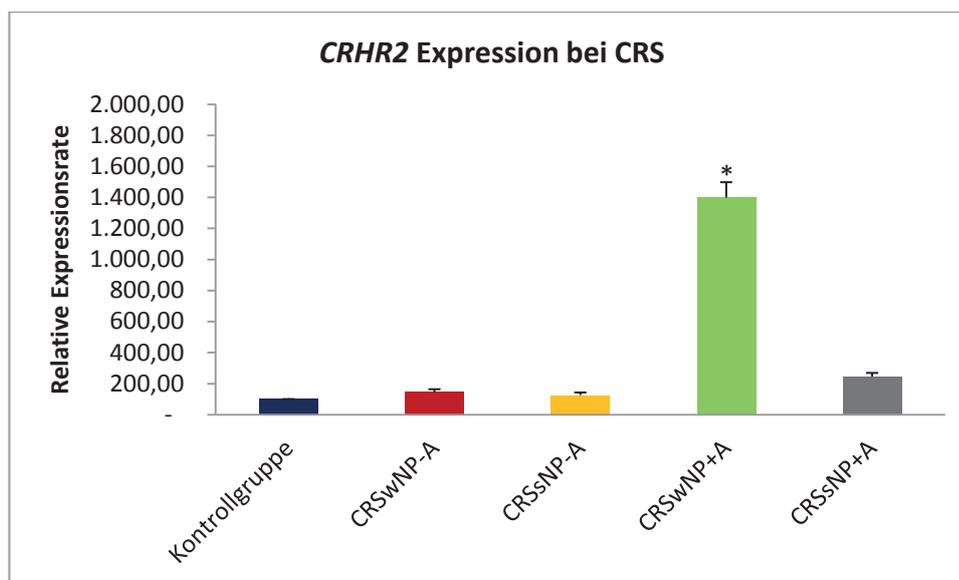


Abb. 28: Expressionsunterschiede von *CRHR2* in den abgebildeten Gruppen in Bezug auf die Kontrollgruppe

Bei CRSsNP mit Allergie zeigt die *CRHR2* Expression eine tendenzielle aber nicht signifikante Erhöhung. Die übrigen Gruppen weisen keine wesentlichen Tendenzen auf (s. Tab. 14).

CRS-Gruppe vs. Kontrolle	p-Wert
CRSwNP-A	ns
CRSsNP-A	ns
CRSwNP+A	0,022
CRSsNP+A	ns

Tabelle 14: Ausprägung der Expressionsrate von *CRHR1* in den einzelnen CRS-Gruppen

Aufgrund der auffällig hohen *CRHR2* Werte bei CRSwNP mit Allergie, wurden die Variablen NP und Allergie detailliert untersucht. Dabei zeigte sich bei CRSwNP unabhängig vom Vorhandensein einer Allergie eine 3-fach erhöhte *CRHR2* Expression

(MW 299,42) gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abb. 29). Patienten ohne NP weisen nur einen geringfügig erhöhten Wert auf.

Bei CRS mit Allergie wurde mit einer siebenfach erhöhten Expressionsrate (MW 722,54) im Vergleich zu der Kontrollgruppe der größte Unterschied nachgewiesen (s. Abb. 30). Es fand sich keine nennenswerte Differenz zwischen CRS ohne Allergie und der Kontrollgruppe.

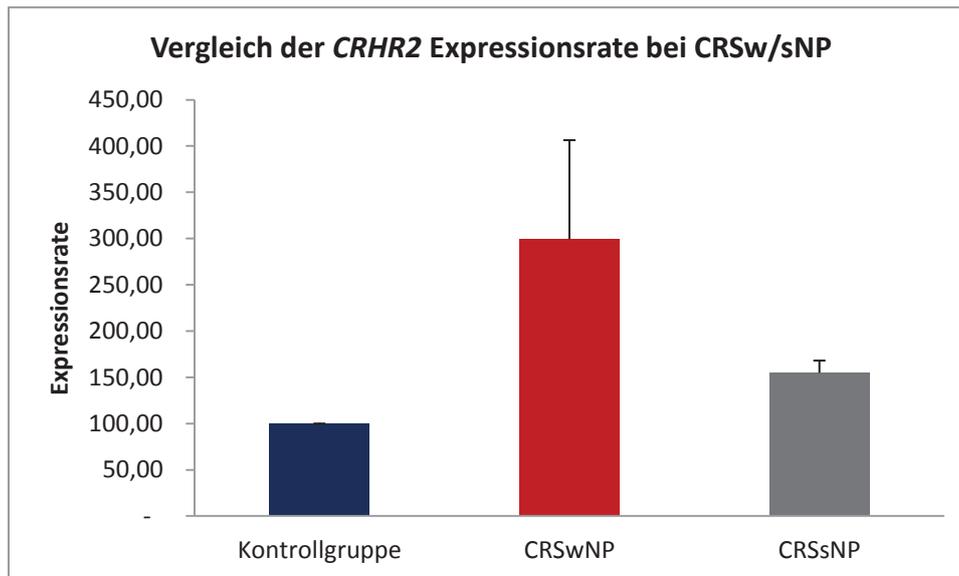


Abb. 29: Expressionsunterschiede von *CRHR2* bei CRSwNP im Vergleich zu CRSsNP in Bezug auf die Kontrollgruppe

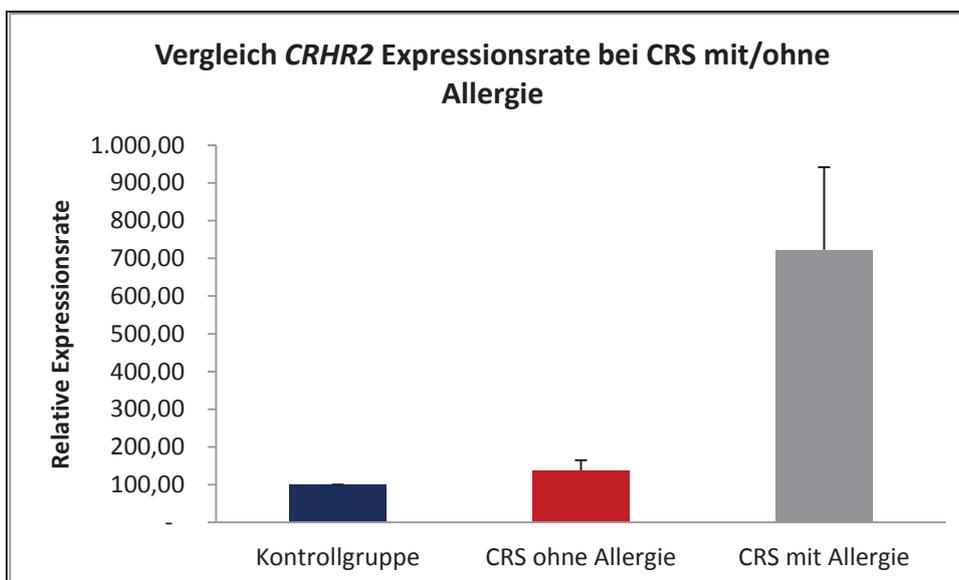


Abb. 30: Expressionsunterschiede von *CRHR2* bei CRS mit Allergie im Vergleich zu CRS ohne Allergie in Bezug auf die Kontrollgruppe

Es wurde ebenfalls geprüft, ob der Schweregrad der CRS (*Lund-Score* s.o.) einen Einfluss auf die Expressionsrate von *CRHR2* hat. Hier wurden dieselben Gruppenstärken

verglichen wie bei *CRHR1*. Wie aus Abb. 31 ersichtlich ist, sind auch hier keine relevanten Expressionsunterschiede vorhanden.

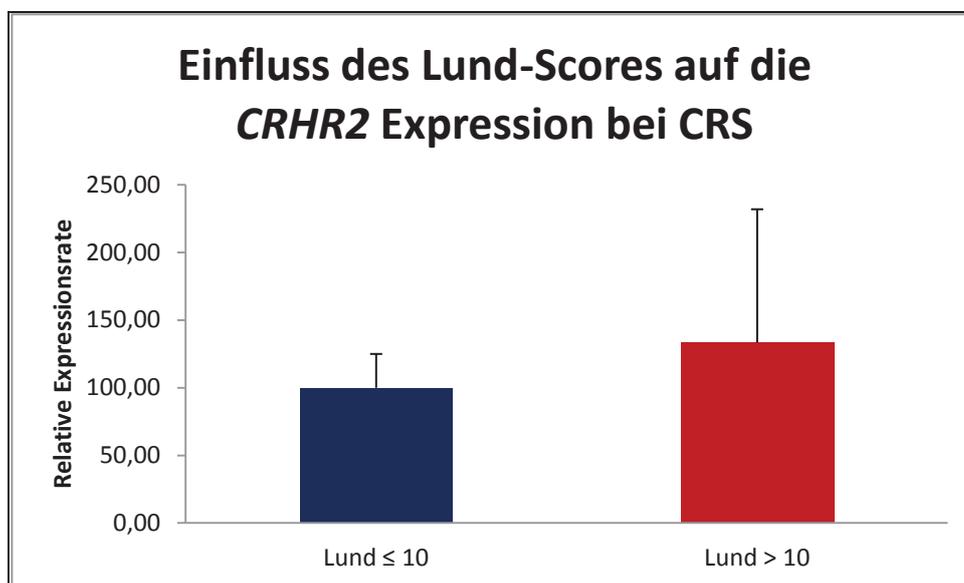


Abb. 31: Einfluss des *Lund-Scores* auf die *CRHR2* Expression bei CRS in Bezug auf die *CRHR2* Expression bei einem *Lund-Score* ≤ 10

5 Diskussion

5.1 Ergebniskritik

In der vorgelegten Arbeit konnten sowohl die Lokalisation von CRHR1 und CRHR2 in der NSH als auch entsprechende Expressionsunterschiede, gemäß der Zielsetzung, nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch kein Hinweis auf das Vorhandensein des MC2R in der menschlichen NSH. In Übereinstimmung mit den Vorarbeiten von Kim *et al.* konnten CRHR1 und CRHR2 in nahezu allen Proben immunhistochemisch an vaskulären Endothelien dargestellt werden (Kim *et al.*, 2007). Zusätzlich zu den vaskulären Endothelien wurden in dieser Arbeit CRHR1 und CRHR2 an serösen und mukösen Drüsenepithelien detektiert. In beiden Fällen war das Färbeergebnis bei CRSsNP mit Allergie sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber CRSsNP ohne Allergie tendentiell verstärkt. Bei CRSwNP kam ebenfalls ein stärkeres Anfärbeverhalten an Gefäßendothelien bei Gewebeproben von Patienten mit CRSwNP mit Allergie gegenüber der Kontrollgruppe und der Proben von Patienten mit CRSwNP ohne Allergie zum Vorschein.

Entsprechende Ergebnisse konnten auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR nachgewiesen werden. Auch hier scheint das zusätzliche Vorhandensein einer allergischen Entzündungsreaktion entscheidend für die Expressionsrate von *CRHR2* zu sein. Der erfolgreiche Rezeptornachweis auf mRNA-Ebene stellt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen CRSwNP und CRSsNP ohne Allergie dar. Ob NP vorhanden oder nicht vorhanden waren, hatte keinen Einfluss auf die Expressionsrate. Bei Patienten mit CRSwNP mit Allergie hingegen konnte eine gesteigerte Expressionsrate beider Rezeptoren nachgewiesen werden. Hierbei zeigte der Unterschied bei *CRHR2* eine statistisch deutliche Signifikanz. Auch in der Gruppe CRSsNP mit Allergie konnte bei *CRHR2* eine Expressionserhöhung mittels qPCR nachgewiesen werden. Dabei ist die mit n=2 geringe Gruppenstärke bei CRSsNP mit Allergie in Betracht zu ziehen, welche keine statistische Signifikanz zulässt. Bei separater Betrachtung, ob der Faktor Allergie die *CRHR1* bzw. *CRHR2* Expression beeinflusst, zeigte sich ausschließlich bei *CRHR2* ein signifikanter Unterschied. Kim *et al.* konnten mittels *Reverse-Transkriptase-PCR* signifikante Unterschiede auch für *CRHR1* demonstrieren und beide Rezeptoren auf Proteinebene mittels WB nachweisen. Letzteres ist in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen nicht möglich gewesen. Es zeigte sich jedoch eine hohe Kreuzreaktivität, der von Kim *et*

al. verwendeten Antikörper, was die Spezifität für die jeweiligen Rezeptoren in Frage stellt. Dennoch ist bei der Zusammenfassung beider Arbeiten erkennbar, dass ein Zusammenhang zwischen Allergie und der Expression von CRHR abzuleiten ist. Die Bedeutung hiervon kann auf Grundlage der dargestellten Ergebnisse noch nicht abschließend geklärt werden, sodass im folgenden Abschnitt weiter darauf eingegangen wird.

5.1.1 CRH und UCN als Modulatoren bei inflammatorischen Prozessen

CRH, UCN und den entsprechenden Rezeptoren CRHR1/2 werden eine immunmodulierende Rolle zugeschrieben. Dabei werden sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte beschrieben (s. K. 1.3.2), wobei eine dosisabhängige Wirkung angenommen wird (Baigent, 2001). So wird vermutet, dass in der frühen Entzündungsphase pro-inflammatorische Prozesse durch hohe CRH/UCN-Konzentrationen und in der späten Entzündungsphase anti-inflammatorische Prozesse durch niedrige CRH/UCN-Konzentrationen begünstigt werden (Jessop *et al.*, 1995; Baigent, 2001). Es ist bislang nicht geklärt, ob die peripheren Immunreaktionen hauptsächlich durch CRHR1, CRHR2 oder durch beide Rezeptoren ausgelöst werden (Baigent, 2001).

Die pro-inflammatorischen Effekte von CRH und UCN werden v.a. auf die Aktivierung von Mastzellen zurückgeführt (Trianti-Dimoleni *et al.*, 2010). Mastzellen sind ubiquitär im Körper vorhanden. Insbesondere sind sie im Bindegewebe, an Gefäßen und Lymphgewebe lokalisiert. Sie sind nicht nur an der Pathophysiologie allergischer Reaktionen, sondern auch an einer Vielzahl immunologischer, sowie an stressinduzierten inflammatorischen Prozessen beteiligt (Theoharides and Kalogeromitros, 2006). Bei letzteren erfolgt die Aktivierung nicht über den IgE-Rezeptor FcεRI, sondern über CRH-Rezeptoren. Bereits in den 1990er Jahren wurde an Ratten nachgewiesen, dass sowohl Crh als auch Ucn über Crhr1 zu einer Mastzelldegranulation führen können (Singh *et al.*, 1999; Theoharides *et al.*, 1998). Cao *et al.* konnten erstmals an humanen Mastzellen die Expression von CRHR zeigen und so beweisen, dass CRH und UCN einen direkten Einfluss auf Mastzellen haben (Cao *et al.*, 2005). Zudem weisen mehrere Studien darauf hin, dass insbesondere entzündliche Prozesse wie beispielweise Arthritis, durch stressinduziert freigesetztes CRH bzw. UCN über eine Signalkaskade exazerbieren. Dieser Vorgang ist durch CRH-Rezeptoren auf Mastzellen getriggert (Singh, 1999; Järvikallio *et al.*, 2003; McEvoy, 2001). In der Haut kommt es nach Aktivierung der Mastzellen durch

CRH bzw. UCN zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität (Theoharides, 1998; Crompton, 2003), die bei Ratten durch einen Crh-Antagonisten inhibiert werden konnte. Eine Studie von Kempuraj *et al.* hat erwiesen, dass Mastzellen nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine selbst CRH bzw. UCN sezernieren. Das weist auf eine bidirektionale Beziehung zwischen Mastzellen und CRH bzw. UCN bei stressgetriggerten entzündlichen Prozessen hin (Kempuraj *et al.*, 2004).

Bei entzündlichen Hauterkrankungen, wie z.B. Psoriasis, kann akuter Stress einen erneuten Schub auslösen oder zur Exazerbation führen (Harvima *et al.*, 1993; Fortune *et al.*, 2005). Theoharides *et al.* konnten zeigen, dass Psoriasis mit einem erhöhten Serum-CRH und gleichzeitig erniedrigter *CRHRI*-Expression in geschädigter Haut assoziiert ist (Tagen *et al.*, 2007). Psoriasis ist charakterisiert durch Keratinozytenproliferation, Mastzellakkumulation und -aktivierung (Ozdamar *et al.*, 1996; Harvima, 2008). Dabei sind Mastzellen insbesondere in geschädigten Hautarealen erhöht (Ozdamar *et al.*, 1996).

Ob diese Mechanismen auf die NSH zu übertragen sind, ist unklar, da die aktuelle Studienlage keine Rückschlüsse diesbezüglich erlaubt. So konnte nicht in allen Studien eine erhöhte Mastzellkonzentration bei CRSwNP gegenüber CRSsNP und Kontrollgruppen nachgewiesen werden, doch wird angenommen, dass Mastzellen in CRSwNP eine erhöhte Aktivität zeigen (Fokkens *et al.*, 2012; Ruhno, 1990; Patou *et al.*, 2009). Zum jetzigen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass Mastzellen bei dieser Erkrankung durch Aktivierung des FcεRI-Rezeptors proinflammatorische Zytokine und Mediatoren freisetzen (Hamilos *et al.*, 1995; Pawankar, 2003). Bisher sind keine Studien über einen möglichen Zusammenhang zwischen CRH- bzw. UCN-Sekretion und der Aktivierung von Mastzellen bei CRS vorhanden.

Cao *et al.* haben zeigen können, dass die Aktivierung von Mastzellen durch CRH nicht zu einer Sezernierung von Histamin, Tryptase, IL-6, IL-8, und TNF-alpha, sondern zu einer Freisetzung von VEGF führt (Cao *et al.*, 2005). VEGF selbst ist für die Angiogenese, sowohl physiologisch bei der Embryogenese als auch pathologisch bei Tumoren, bedeutend (Ferrara, 2003). Zudem spielt VEGF eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen. So konnte in Hautproben von Psoriasispatienten eine erhöhte VEGF-Expression nachgewiesen werden (Detmar, 1994). Außerdem führt VEGF zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und kann so eine Ödembildung fördern. In einer Studie von Alysandratos konnte gezeigt werden, dass das Neuropeptid Neurotensin die Degranulation von humanen Mastzellen auslöst und die CRH induzierte Ausschüttung von VEGF signifikant erhöht (Alysandratos *et al.*, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das

proinflammatorische Zytokin IL-33 die VEGF-Sekretion aus Mastzellen steigern kann (Theoharides *et al.*, 2010). Zudem wird IL-33 auch von Mastzellen selbst exprimiert und kann die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, -6 und -13 sowie TNF-alpha induzieren (Blom und Poulsen, 2012).

Auch bei CRSwNP konnte in NP-Gewebe sowohl eine *VEGF*- als auch eine *VEGF*-Rezeptor-Expression nachgewiesen werden (Wittekindt, 2002; Bobic, 2014). Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen *VEGF*-Expression, Ödembildung und *IL-5*-Expression in polypösem Gewebe (Bobic, 2014). Es wird davon ausgegangen, dass VEGF ein wichtiger Faktor für die epitheliale Hyperplasie und die Ödembildung bei NP spielt (Lee, 2009; Gosepath, 2005).

In dieser Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Expressionsunterschied von *CRHR1* und *CRHR2* in der NSH von Patienten mit CRSwNP gegenüber CRSsNP und der Kontrollgruppe gezeigt werden. Damit bleibt ein möglicher Einfluss der Rezeptoren auf die Pathogenese dieser Erkrankung weiterhin unklar. Dennoch sind die Erkenntnisse über CRH bzw. UCN und CRHR in Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen in anderen Organsystemen so interessant, dass insbesondere im Hinblick auf die Ergebnisse der vorgelegten Studie ein weiterer Erkenntnisgewinn angestrebt werden sollte. Auch wenn die Ergebnisse aus anderen Organsystemen stammen und somit nicht unbedingt auf die NSH übertragen werden können, kann auf Grund der dargestellten Erkenntnisse über Mastzellen und VEGF in Bezug auf CRS vermutet werden, dass auch hier ein neuroendokriner Zusammenhang besteht und dass CRH bzw. UCN Einfluss auf die Mastzellfunktion in der NSH nehmen können. Daher wären weitere zellbiologische und auch klinische Untersuchungen wichtig, um die genaue Signalkaskade und Wirkungsweise zu verstehen.

5.1.2 CRH und UCN als Modulatoren bei AR

Psychischer Stress kann immunologisch u.a. eine T_H2 -Immunantwort fördern und so zu einer Exazerbation einer allergischen Entzündungsreaktion führen. In einer Studie von Kimata *et al.* wurde gezeigt, dass durch Videospiele ausgelöster Stress bei Patienten mit atopischer Dermatitis erhöhte Serumwerte von u.a. Substanz P auftraten. Zudem konnten *in vitro* erhöhte IgE-Werte mit erhöhten IL-4, -10 und -13 Konzentrationen und erniedrigten IFN-gamma und IL-12 Konzentrationen nachgewiesen werden (Kimata, 2003). Das Neuropeptid SP kann die Aktivierung von Mastzellen und deren Sezernierung

von pro- inflammatorischen Zytokinen verstärken (Azzolina *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass Mastzellen nicht nur die allergische Entzündungsreaktion auslösen, sondern darüber hinaus auch neuroendokrine Funktionen aufweisen und mit der HHN-Achse interagieren. Es konnte an Hunden gezeigt werden, dass im Hirn lokalisierte Mastzellen nach intracerebroventriculärer und intravenöser Antigenprovokation durch Histamin- und Crh-Freisetzung die HHN-Achse aktivieren konnten. Das führte zu einer erhöhten Kortisolausschüttung, die die allergische Reaktion minimieren soll (Matsumoto *et al.*, 2001). Auch hier wird eine bidirektionale Funktion angenommen, da in Rattenhirnen eine Mastzelldegranulation mittels Crh induziert werden kann (Theoharides *et al.*, 1995).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch IL-33, das von Mastzellen sezerniert wird, im Serum von Patienten mit atopischen Erkrankungen erhöht ist. Allerdings konnten bei Patienten mit AR oder ohne AR keine erhöhten IL-33 Konzentrationen in der Nasenlavage nach nasaler Provokation detektiert werden (Baumann *et al.*, 2013).

In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass nach nasalem Provokationstest die CRH- und Cortisol-Plasmaspiegel bei Allergikern steigen. Es wird daher vermutet, dass die AR die HHN-Achse aktivieren kann (Kalogeromitros *et al.*, 2007).

Generell kann hinreichend davon ausgegangen werden, dass neuroimmunologische sowie neuroendokrine Faktoren die allergische Entzündungsreaktion regulieren und dass psychischer Stress diese verstärkt (Montoro *et al.*, 2009). Allerdings sind kaum Studien aus der menschlichen NSH zu dieser Thematik vorhanden. Bisher konnten nur Kim *et al.* in einer Untersuchung eine erhöhte Expression von UCN und CRHR1/2 in der NSH bei Allergikern gegenüber Gesunden nachweisen. Sowohl in gesundem als auch in allergischem Gewebe konnte das Neuropeptid UCN an vaskulären Endothelien sinusoidaler Gefäße gezeigt werden, die u.a. für das Anschwellen der NSH verantwortlich sind (Kim *et al.*, 2007). Bei Allergikern wurde UCN zusätzlich an den oberflächlichen Gefäßen der Lamina propria exprimiert. Schon andere Studien haben gezeigt, dass UCN vasodilatierende Wirkungen besitzt und an endothelialen Zellen lokalisiert ist (Huang *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2004; Honjo *et al.*, 2006). Daher gehen Kim *et al.* davon aus, dass UCN und CRHR1/2 lokale autokrine sowie parakrine inflammatorische Effekte aufweisen. Zudem soll die durch UCN getriggerte erhöhte vaskuläre Permeabilität zum Anschwellen der NSH und somit zu nasaler Obstruktion führen. Klinisch bewiesen sind diese Hypothesen bislang nicht.

In dieser Arbeit konnte, in Übereinstimmung mit den Daten von Kim *et al.*, in allergischem Gewebe eine erhöhte Expression von *CRHR* an Gefäßendothelien gezeigt werden. Zudem wurden *CRHR1* und *CRHR2* vermehrt an serösen und mukösen Drüsenepithelien detektiert. Welche Wirkung von ihnen ausgeht, kann auf Grundlagen der Ergebnisse nur gemutmaßt werden. Neben der Vasodilatation könnte es zur Aktivierung der nasalen Drüsen kommen, durch die die Rhinorrhö bei AR bedingt wird.

In dieser Arbeit konnte für die *CRHR2*-Expression ein signifikanter Unterschied in allergischem Gewebe nachgewiesen werden. Da *UCN3* eine hohe Bindungsaffinität zu *CRHR2* aufweist, könnten die möglichen Effekte, wie Vasodilatation und vermehrte vaskuläre Permeabilität, über diesen Signalweg gesteuert werden. Allerdings haben Kim *et al.* lediglich die *UCN*- und nicht die *CRH*-Expression untersucht. So können keine genaueren Aussagen über eine mögliche Interaktion zwischen *CRH* und *CRHR1/2* getroffen werden.

Bei der allergischen Entzündungsreaktion spielen Mastzellen eine entscheidende Rolle. Die Interaktion zwischen *CRH* und Mastzellen wurde bereits oben eingehend diskutiert. Ähnlich wie bei den oben beschriebenen nicht-allergischen entzündlichen Reaktionen könnten Mastzellen über die Sezernierung von *VEGF* zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität bei der AR führen. Sowohl aus den Ergebnissen dieser Arbeit als auch bei Kim *et al.* können keine Rückschlüsse auf die Zelltypisierung der Rezeptorexpression gezogen werden. So könnte die erhöhte Expression der Rezeptoren durch Mastzellen bedingt sein, die in allergischem Gewebe eine erhöhte Aktivität aufweisen. Einschränkend muss diskutiert werden, dass der Signalweg zur Mastzellaktivierung nur über *CRHR1* nachgewiesen wurde, die Expressionsunterschiede in dieser Arbeit nur für *CRHR2*, aber nicht für *CRHR1* signifikant waren. Daher ist es wichtig, in zellbiologischen Untersuchungen die exakte Expressionslokalisation und den Signalweg zu erheben.

5.1.3 Periphere HHN-Achse

Die NSH wird vergleichbar mit der Haut oft physikalischem, chemischem, und biologischem Stress ausgesetzt und muss dementsprechend Schutzmechanismen entwickeln, die sie vor den einwirkenden Stressoren schützen. In der Haut sind der Einfluss von Stress und die Wirkung von CRH/UCN, CRHR sowie anderen Mediatoren bisher am besten untersucht. Es wird eine periphere HHN-Achse in der Haut beschrieben, die lokal agiert und stressgetriggerte Prozesse reguliert (Slominski *et al.*, 2012). Slominski *et al.* konnten alle mitwirkenden Faktoren der zentralen HHN-Achse, u.a. CRH, CRHR und ACTH sowie MC2R, in der Haut von Nagetieren und Menschen detektieren. Die Aktivierung der peripheren HHN-Achse führt zu einer lokalen Produktion und Ausschüttung von Kortisol in Keratinozyten, Melanozyten und Fibroblasten (Slominski *et al.*, 2012). Dabei wird davon ausgegangen, dass die funktionale Hierarchie der peripheren HHN-Achse der zentralen HHN-Achse gleicht. Es wird postuliert, dass die lokalen Mechanismen protektiv gegen umweltbedingte Stressoren wirken. Außerdem wird vermutet, dass die kutane HHN-Achse pathologischen Veränderungen in der Haut entgegenwirkt und dass die kutane Steroidproduktion lokale sowie systemische Immunprozesse regulieren kann (Slominski *et al.*, 2012). Eine Dysregulation dieses Mechanismus kann zu entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen der Haut führen (Slominski *et al.*, 2013). Ein ähnliches System wurde in Lungen von Ratten beschrieben und es konnte eine lokale Steroidproduktion gezeigt werden. Interessanterweise konnte in allergischem Lungengewebe keine Steroidproduktion nachgewiesen werden. Die Autoren gehen davon aus, dass die allergiebedingte T_H2 getriggerte Immunantwort die Steroidsynthese hemmt und so u.a. die Auslösung von Asthma fördert (Hostettler *et al.*, 2012). Ob in der menschlichen Lunge ebenfalls eine periphere HHN-Achse besteht, wurde bislang nicht untersucht. Auch in der Nebenniere, dem eigentlichen Erfolgsorgan der klassischen HHN-Achse, existiert ein lokales, autonomes CRH-ACTH-Kortisol System (Willenberg *et al.*, 2000).

In diesem Zusammenhang kann vermutet werden, dass die in dieser Arbeit detektierten Rezeptoren ebenfalls zu einem lokalen System gehören, das auf umweltbedingte Stressoren regulierend einwirkt. Denn die Haut und die NSH müssen vergleichbare Aufgaben bewältigen und sind Umwelteinflüssen ähnlich stark exponiert. Vergleichbares gilt auch für die unteren Atemwege. In der NSH fehlen hingegen Daten über eine lokale Steroidproduktion, auch die Studienlage zur lokalen CRH bzw. UCN Sezernierung ist

nicht ausreichend. Zudem konnte in dieser Arbeit der MC2R in den Gewebeproben nicht nachgewiesen werden. Dies spricht allerdings gegen eine autonome HHN-Achse in der Nase, sondern vielmehr für eine lokale Beeinflussung der Regulation von beispielsweise Angiogenese und Gefäßpermeabilität. Ähnlich wie im Gastrointestinaltrakt, in dem CRHR1, CRHR2 und ihre Liganden CRH, UCN1, 2 und 3 ohne Hinweis auf MC2R nachgewiesen wurden.

Daher sollten weitere Untersuchungen erfolgen, um die vorgelegten Ergebnisse zu bestätigen oder aber eine lokale CRH- bzw. UCN-vermittelte Steroidproduktion zu zeigen. Die aktuelle Datenlage spricht allerdings eher gegen eine periphere HHN-Achse in der Nase.

Generell wird die Interaktion zwischen Stress, Nerven- und Immunsystem weiter untersucht werden. Bisher konnte in mehreren Studien im Bronchialsystem von Mäusen und Menschen gezeigt werden, dass der Einfluss von chronischem Stress, im Gegensatz zu akutem Stress, zu einer Wirkungsminderung bzw. -aufhebung von Kortisol führt. Die Autoren gehen aus diesem Grund von einer Kortikosteroidresistenz bei Entzündungsreaktionen unter chronischem Stress aus und dass das regulatorische System zwischen HHN-Achse und Immunsystem gestört ist (Forsythe, 2004; Bailey, 2009; Liu, 2002). Allerdings können diese Erkenntnisse aus dem Bronchialsystem nicht unbedingt auf NSH übertragen werden und es bedarf diesbezüglich weiterer Untersuchungen.

5.2 Allgemeine Methodenkritik

5.2.1 Probanden

Das Probandenkollektiv (n=49) wurde mittels ausführlicher klinischer Anamnese und HNO-ärztlicher Untersuchung einschließlich Allergiediagnostik generiert. Die Gruppenstärke der fünf Patientenkohorten ist unterschiedlich groß. Ein Grund für die hohe Fallzahlvariation liegt darin, dass das Aufkommen und die Verteilung der jeweiligen Patientengruppen im Rahmen des Untersuchungszeitraums nicht beeinflussbar sind. Zudem sind die Untersuchungen an einem Universitätsklinikum durchgeführt worden. Das bedeutet das Patientenaufkommen ist in der Regel höher und die Krankheitsverläufe sind meist komplexer (prolongierte Krankheitsverläufen, ausgeprägte Entzündungen und Polypen).

Ein weiterer Faktor ist, dass obwohl die CRSsNP die häufigste Form der CRS ist (Fokkens *et al.*, 2012) deutlich weniger Patienten mit CRSsNP als mit CRSwNP hospitalisiert werden. Das spiegelt sich auch in unserem Patientenkollektiv wieder.

Die demografischen Charakteristika, wie Alter und Geschlecht, korrelieren mit den Daten der aktuellen Literatur. So hatten beispielsweise wesentlich mehr Männer eine CRSwNP als Frauen.

Kritisch anzumerken ist, dass 47% der Patienten, die unter CRS litten, leitliniengerecht mit topischen Glukokortikoiden vorbehandelt wurden. Entsprechend dem hormonellen Regelkreis kann dadurch die Expression von CRHR1 und CRHR2 beeinflusst werden.

Gleichauf ist der erhobene *Lund Score* von der Kortisontherapie tangiert. Da Kortison eine antiinflammatorische Wirkung hat, wird entsprechend auch die Verlegung der NNH gemindert. Nasenpolypen können unter topischer Glukokortikoidgabe anschwellen, allerdings nicht komplett. Insbesondere bei ausgeprägter Polyposis nasi besteht nur ein geringfügiger Nutzen (Mygind *et al.*, 1975). Dieser Faktor und der generell krankheitstypisch höhere *Lund-Score* bei Patienten mit CRSwNP sind eine mögliche Erklärung, warum der *Lund-Score* in den einzelnen Patientengruppen stark variiert. Zudem wurde nicht bei jedem Patienten eine CT der NNH angefertigt und somit auch kein *Lund-Score* erhoben.

Bei der Auswahl der Kontrollgruppe konnte eine CRS sowie eine atopische Grunderkrankung ausgeschlossen werden, allerdings hatten die Patienten eine nachgewiesene NAB auf Grund einer Nasenmuschelhyperplasie. Dementsprechend liegt bei diesen Patienten ebenfalls eine Veränderung der NSH vor. Dieser Kritikpunkt wurde in Kauf genommen, da eine operative Probenentnahme bei gesunden Probanden aus ethischen Gründen nicht vertretbar ist.

Zusammenfassend konnte durch die verwendeten Ein- und Ausschlusskriterien ein homogenes Probandenkollektiv generiert werden, dass sich hauptsächlich in den Merkmalen CRSsNP, CRSwNP sowie Allergie und *Lund-Score* (s. Tab. 12) unterscheidet.

5.2.2 Probenentnahme

Bei allen 49 Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, konnte eine entsprechende operative Probenentnahme erfolgen. Die Proben wurden direkt im OP methodenspezifisch entweder in 4%igem Formaldehyd eingebettet oder in Stickstoff schockgefroren. Die operativen Eingriffe (FESS/Septorhinoplastik) und die dabei erfolgten Probenentnahmen wurden von verschiedenen Operateuren zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Die Proben sollten mindestens 0,3 cm groß sein und NM-Gewebe enthalten. Allerdings wurde auf Grund von intraoperativen und individuellen Unterschieden nicht immer ausschließlich NM-Gewebe, sondern bei 8 Patienten zusätzlich NSH-Gewebe entnommen. Bei 9 Patienten konnte ausschließlich NSH-Gewebe gewonnen werden. Das NSH-Gewebe war im Vergleich zum NM-Gewebe deutlich kleiner. Das hatte bei 6 Proben zur Folge, dass diese Gewebeproben für die einzelnen Methoden nicht mehr verwertbar waren. Weiterhin konnten von 12 Patienten ausschließlich und von 10 Patienten zusätzlich polypöses Gewebe entnommen werden.

Weiterhin ist zu beachten, dass auch die Zeiten, wie schnell die Proben in flüssigen Stickstoff schockgefroren wurden, variierten. So kam es bei 4 Proben, die u.a. für die qRT-PCR bestimmt waren und aus denen zunächst RNA extrahiert werden sollte, durch zu lange Liegezeiten zu einer starken Beeinträchtigung der Qualität. Dieser Sachverhalt ist den ubiquitär vorkommenden RNasen, die RNA sehr schnell abbauen, geschuldet. Durch das Einfrieren können die RNasen gehemmt werden und sind nur durch spezielle RNase freie Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf der Arbeitsfläche zu eliminieren (Blumberg, 1987). Bei Proben, die länger gelagert werden, erhöht sich die Gefahr einer Kontamination mit RNasen.

Insgesamt konnte genügend Probenmaterial gesammelt werden, um die jeweiligen Methoden anzuwenden.

5.2.3 Immunhistochemie

Für die IHC wurden im Vorfeld Paraffinschnitte hergestellt, die für die dargestellten Untersuchungen geeignet waren. Paraffinpräparate bieten den Vorteil gegenüber Kryostatpräparaten, dass die morphologische Gewebestruktur meist gut erhalten bleibt. Ein Nachteil ist, dass die Antigene in manchen Fällen beschädigt werden. Die größte Herausforderung bei der Herstellung der Paraffinpräparate ist die optimale Fixierung. So kann eine zu lange Fixierungszeit u.a. dazu führen, dass die Epitope durch die Vernetzung des Fixierungsmittels von den AK nicht mehr erkannt werden können. Eine zu kurze Fixierungszeit hingegen hat zur Folge, dass die Morphologie des Gewebes stark beeinträchtigt werden kann (Bourne, 1997). In dieser Arbeit wurde versucht gemäß Protokoll die Proben aufzubereiten. Dies war aus technischen Gründen nicht immer möglich und die Proben, die zu lange in Formalin fixiert waren, hatten oftmals keine ausreichend gute Qualität und wurden entsprechend verworfen.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde für CRHR1 ein monoklonaler und für CRHR2 sowie für MC2R ein polyklonaler AK verwendet. Polyklonale AK interagieren mit unterschiedlichen Epitopen des Antigens. So sind sie im Vergleich zu monoklonalen AK in der Lage, auch nach Zerstörung einzelner Epitope das Antigen nachzuweisen. Allerdings verringert sich dadurch ihre Spezifität gegenüber monoklonalen AK, die nur an einem Epitop binden (Naish *et al.*, 1989).

Zudem ist anzumerken, dass die Sensitivität und Spezifität der Methode durch beispielsweise eine hohe Hintergrundfärbung, geringe AK-Spezifität und fehlerhafte Durchführung stark beeinträchtigt werden können. Die Sensitivität kann durch Antigenerhaltung, vermehrte Markerenzymkonzentration sowie durch geringe Hintergrundfärbung optimiert werden. Die in dieser Arbeit angewandte ABC-Methode gehört zu den sensitivsten Nachweismethoden (Hsu *et al.*, 1981). Ebenso ist die AK-Spezifität ein wichtiger Faktor. Die verwendeten AK für IHC wurden nicht separat auf Spezifität und mögliche Kreuzreaktivität überprüft, da das Herstellerangebot insbesondere für CRHR1 und CRHR2 gering ist. Die jeweiligen AK wurden an passenden Positivgeweben ausgetestet. Bei CRHR1 und CRHR2 zeigten sich gute Färbeergebnisse, hingegen wies MC2R bereits im Positivgewebe eine unspezifische Hintergrundfärbung auf. Auch die mitgeführte Negativkontrolle zeigte eine Braunfärbung der Zellkerne. Deshalb wurden die Färbeergebnisse nur mit Vorbehalt gewertet.

Zu einer erhöhten Hintergrundaktivität führt zum Einen eine unzureichend geblockte, endogene Peroxidaseaktivität, welche durch entsprechenden Einsatz von Wasserstoffperoxid gehemmt wurde. Zum Anderen können unspezifische Bindungsstellen ein Grund für eine Hintergrundfärbung darstellen, die durch Blockierung mittels Normalserum verhindert wurden (Bourne, 1997).

Insgesamt ist die Ergebnisqualität auch bei sorgsamer Durchführung Schwankungen unterlegen. Aus diesem Grund sollte der jeweilige Färbevorgang in einem Durchgang durchgeführt werden. Dies konnte aus technischen Gründen nicht für alle Gewebeproben erbracht werden.

Als Kritikpunkt ist die Auswertungsmethode zu sehen. Die nur qualitativ und nicht quantitativ durchgeführte Beurteilung der Präparate zeigt zwar die dokumentierten Ergebnisse, allerdings oblagen die Bilder lediglich einer subjektiven Kontrolle. Eine objektive Beurteilung und Quantifizierung der Resultate fehlt und kann somit nur als visuelle Ergänzung der qRT-PCR Ergebnisse gewertet werden. Die Wertigkeit der Methodik liegt allerdings darin, die unterschiedliche Morphologie und das jeweilige Verteilungsmuster von CRHR1, CRHR2 und MC2-R in der humanen NSH zu erkennen, was in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

5.2.4 qRT-PCR

Die qRT-PCR ist eine etablierte Messmethode. Als Vorteil ist die hohe Sensibilität zu nennen (Bustin, 2009). Der genaue Ablauf und die Funktionsweise wurden bereits im Kapitel 3.4.5 ausführlich beschrieben.

Die Ergebniseffizienz der qRT-PCR wird durch systemische und methodische Faktoren stark beeinflusst. Durch mehrere Vorversuche, bei denen die jeweiligen Konzentrationsverhältnisse ausgetestet und der Versuchsablauf optimiert wurde, sollten die folgend beschriebenden Fehlerquellen verringert werden. Methodische Fehler entstehen gehäuft bei der Probenaufbereitung. Um diese zu vermeiden, wurde zunächst die RNA-Extraktion mittels *DNase*-Verdau optimiert. Die Reinheit der RNA wurde sowohl durch die im NanoDrop ermittelten 260/280 nm und 260/230 nm Quotienten als auch durch Gel-Elektrophorese überprüft. Eine überlegene Überprüfung ist mittels *Bioanalyzing* und der Vergabe einer *RNA Integrity Number* (RIN) gewährleistet, die jedoch nicht verfügbar waren (Bustin, 2009). Die cDNA-Qualität wurde mit Hilfe einer PCR auf mögliche

Kontamination geprüft. Nur wenn die entsprechenden Kontrollen erfolgreich waren, wurden die Produkte für die weiteren Versuchsschritte verwendet.

Um die Streuung der Daten möglichst klein zu halten, wurden ein Triplet pro Probe gemessen. Zusätzlich ist als Qualitätskontrolle bei jedem Lauf eine Negativkontrolle mitgeführt worden. Als einzige endogene Kontrolle wurde GAPDH, das anhand der aktuellen Literaturempfehlungen ausgesucht wurde, verwendet. Die Validität des HKG wurde in mehreren Studien geprüft. Zwar variierte die Expressionsrate von GAPDH in verschiedenen Gewebearten, aber innerhalb einer Gewebeart blieb sie konstant (Barber, 2005). Optimal wäre der Einsatz von mehr als einem HKG, was aus strukturellen Gründen nicht umsetzbar war (Bustin, 2009). Insgesamt wurde der qRT-PCR-Lauf drei Mal wiederholt. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Gene zu erhöhen und methodische Fehler zu verringern, wurde eine 384er Reaktionsplatte verwendet.

Generell ist das Problem bei qRT-PCR als Messmethode darin zu sehen, dass der gemessene RNA-Gehalt lediglich als statistisches Korrelat der tatsächlichen Rezeptorexpression genutzt werden kann. Doch können erhebliche Schwankungen zur exakten Proteinausprägung vorkommen, da von mRNA Ebene zur Proteinebene mehrere intrazelluläre Prozesse ablaufen, die die Genexpression beeinflussen.

5.2.5 Western Blot

Das WB-Verfahren wurde 1979 erstmals beschrieben und stellt seitdem eine etablierte Analysemethode zur qualitativen und semi-quantitativen Bestimmung von Proteinen dar (Renart *et al.*, 1979). Allerdings ist diese Methode auf Grund des relativ großen Aufwandes anfällig für systemische und methodische Fehler. Durch Vorversuche und Kontrollschritte während des Verfahrens können diese minimiert werden. Zudem wurden alle Arbeitsschritte nach einem festen Protokoll durchgeführt.

Auch beim WB entstehen methodische Fehler häufig bereits bei der Probengewinnung und –aufbereitung. Zudem wurde der Umgang mit aus Gewebe gewonnenen Proteinen in dieser Arbeit erstmals etabliert. Um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis ausgeführt. Damit immer dieselbe Konzentration an Gesamtprotein eingesetzt werden konnte, wurde mittels BCA-Assay die jeweilige Proteinkonzentration gemessen und entsprechend verdünnt. Ein Problem besteht allerdings darin, dass das Verhältnis des Zielproteins zum Gesamtprotein in den einzelnen Proben nicht konstant gehalten werden kann.

Das genaue Mischungsverhältnis von Ziel- und Gesamtprotein in der NSH zu bestimmen, bei unvollständiger Studienlage, gestaltete sich komplex. Das wiederum führte konkret zu dem Problem, dass entweder zu wenig oder zu viel Gesamtprotein geladen wurde. Wenn zu wenig Protein vorhanden war, konnte das Zielprotein vom AK nicht detektiert und keine Banden sichtbar gemacht werden. Wurde zu viel Protein geladen, wurde die Membran überladen und mögliche Banden durch den Proteinüberschuss überlagert.

Um AK zu erhalten, die jeweils spezifisch für CRHR1 oder CRHR2 waren, wurde eine Sequenzanalyse (s. Kapitel 3.3.6.3) durchgeführt. Dadurch ergab sich das Problem, dass lediglich AK vorhanden waren, die bisher nicht für WB ausgetestet wurden. Auf dieser Grundlage können die frustrierten Versuche der Proteinquantifizierung erklärt werden.

Um CRHR1 und CRHR2 trotzdem auf Proteinebene nachweisen zu können, könnte eine Immunpräzipitation durchgeführt werden. Durch diese Methode kann mit Hilfe eines AK ein bestimmtes Antigen aus einem Proteingemisch konzentriert werden (Kaboord und Perr, 2008). Dabei könnten zwei Ansätze verfolgt werden. Zum einen könnte mittels einem einzelnen AK, der sowohl für CRHR1 als auch CRHR2 spezifisch ist, beide Rezeptoren aus dem Proteingemisch isoliert und diese in einem darauf folgenden WB-Verfahren analysiert und semiquantitativ bestimmt werden. Dies hätte zum Vorteil, dass beide Rezeptoren zueinander ins Verhältnis gesetzt werden könnten und somit vergleichbar wären. Allerdings gibt es für diese Methodik bislang keinen etablierten AK, sodass dies zurückgestellt wurde. Eine andere Möglichkeit wäre, direkt mittels eines jeweils spezifischen AK für CRHR1 und CRHR2 beide Rezeptoren separat zu konzentrieren. Mit dieser Methode könnte allerdings nur eine Aussage getroffen werden, ob das Zielprotein vorhanden ist oder nicht. Denn unterschiedliche AK weisen meist verschiedene Bindungsaffinitäten auf und die gewonnenen Proteinkonzentrationen der jeweiligen Rezeptoren können nicht quantifiziert werden. Daher kam diese Methodik nicht in Betracht, da mit der IHC der qualitative Nachweis der CRH-Rezeptoren auf Proteinebene bereits gelungen war.

5.3 Schlussfolgerung

Der Einfluss von psychischem Stress auf das Immunsystem ist ein zum heutigen Tage nicht vollends verstandener, hochgradig komplexer Vorgang. Bekannt ist, dass neuroimmunologische und neuroendokrinologische Prozesse eine entscheidende Rolle spielen und auf endo- und exogene Stressoren regulierend wirken. Akuter Stress setzt protektive Mechanismen in Gang und wirkt vor allem anti-inflammatorisch und immunsupprimierend. Der Organismus versucht mit Hilfe dieser Mechanismen das Gleichgewicht wiederherzustellen und den Stressoren entgegen zu wirken. Wird diese Homöostase konstant gestört, können die Schutzmechanismen nicht mehr ausreichend greifen. Chronischer Stress wirkt sich dementsprechend negativ auf die Immunkompetenz eines Organismus aus und inflammatorische Prozesse können ausgelöst und pathologisch verstärkt werden.

In mehreren Studien ist gezeigt worden, dass CRH, UCN und CRHR1 sowie CRHR2 eine entscheidende Rolle bei der Regulation von inflammatorischen Prozessen spielen. Allerdings konnten die Wirkungsweise und die genauen Signalkaskaden der einzelnen Faktoren noch nicht gänzlich aufgeschlüsselt werden. So kann bisher keine klare Trennlinie zwischen lokalen und systemischen Mechanismen gezogen werden. Auf Grundlage der vorgelegten Arbeit und fehlendem MC2-R Nachweis, ist von einem lokalen Regulationsmechanismus auszugehen.

In Bezug auf CRS konnten einige mögliche Zusammenhänge aufgezeigt werden. So könnte insbesondere die Aktivierung der Mastzellen durch CRH und die dadurch erfolgte VEGF-Sezernierung eine denkbare Rolle spielen. Würde sich eine Beziehung bestätigen, wiese dies mögliche neue Therapieansätze auf. So wäre ein Einsatz von CRH-Inhibitoren, die bereits im Tiermodell eingesetzt worden sind, denkbar (Theoharides, 1998). Auch sollte eine mögliche Kortisonresistenz bei Patienten mit CRS in Betracht gezogen werden. Durch chronischen Stress könnten die regulatorischen Effekte der HHN-Achse gestört und so die anti-inflammatorische Wirkung von Kortison aufgehoben werden. Ähnliche Aspekte gelten bezüglich der Auslösung und Exazerbation von Allergien. Chronischer Stress scheint bei AR ein pathophysiologischer Faktor zu sein, der verstärkend auf den allergischen Entzündungsprozess wirkt. Hierzu passen die dargebotenen Ergebnisse, die zeigen, dass insbesondere bei allergischer Entzündung der NSH vermehrt *CRHR2* exprimiert wird und auch in den immunhistochemischen Färbungen eine stärkere Färbung der Gefäßendothelien und Drüsenepithelien gezeigt werden. Außerdem könnte sich auch bei der AR eine Kortisonresistenz entwickeln und Kortison *non-responder* erklären.

Hinzuzufügen ist, dass die meisten Studien zu dieser Thematik entweder aus anderen Organen oder aus Tierversuchen stammen und somit die Übertragbarkeit der Abläufe auf die NSH nicht sicher gegeben ist. Dennoch können im Hinblick auf die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur Parallelen zu Arbeiten in anderen Organsystemen und anderen Spezies zeigen. So ist alleine die Tatsache, dass die Rezeptoren in der NSH nachgewiesen werden konnten, ein Hinweis darauf, dass sie eine Rolle in der peripheren Stressregulation einnehmen. Allerdings fehlen aktuell Daten, die eine valide Aussage über die genauen funktionellen Abläufe und Effekte von peripherem CRH, UCN und den dazugehörigen Rezeptoren möglich machen. Momentan basieren die hier aufgeführten Argumente ausschließlich auf Vermutungen, die weitere Untersuchungen notwendig machen.

Dabei sollte mittels zellbiologischen Untersuchungen an NSH ermittelt werden, welche Zelltypen CRHR1 und CRHR2 exprimieren und welche Bedingungen die Expressionsrate beeinflussen. Weiterhin sollte darauf geachtet werden, dass allergisches und inflammatorisches Gewebe bzw. daraus gewonnene Zellen separat betrachtet werden. Nur so kann eine differenzierte Aussage über die jeweilige Rolle der Rezeptoren in den jeweiligen Krankheitsbildern getroffen werden. Auch CRH und die verschiedenen UCN sollten in weitere zellbiologische Untersuchungen miteinbezogen werden, damit die lokalen Effekte auf den Organismus besser nachvollzogen werden können. Ziel sollte es zukünftig sein, die Prozesskaskaden sukzessive molekularbiologisch zu verstehen und dadurch neue Therapieansätze zu generieren.

7 Literaturverzeichnis

- Agnello D, Bertini R, Sacco S, Meazza C, Villa P, Ghezzi P. Corticosteroid-independent inhibition of tumor necrosis factor production by the neuropeptide urocortin. *Am. J. Physiol.* 1998;275:E757-62.
- Alysandratos K, Asadi S, Angelidou A, Zhang B, Sismanopoulos N, Yang H, Critchfield A, Theoharides TC. Neurotensin and CRH interactions augment human mast cell activation. *PloS one* 2012;7:e48934.
- Aumüller G, Wolff W. *Duale Reihe Anatomie*. 2nd edn. Stuttgart: Thieme, 2010.
- Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N. Substance P induces TNF- α and IL-6 production through NF κ B in peritoneal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2003;1643:75–83.
- Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001;107:607–614.
- Bachert C, Wagenmann M, Hauser U, Rudack C. IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997;99:837–842.
- Baigent SM. Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 2001;22:809–820.
- Bailey M. Social stress enhances allergen-induced airway inflammation in mice and inhibits corticosteroid responsiveness of cytokine production. *The journal of immunology* 2009;182:7888–7896.
- Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004;44:525–557.
- Baraniuk JN. Pathogenesis of allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997;99:S763-72.
- Barber R. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics* 2005;21:389–395.
- Baumann R, Rabaszowski M, Stenin I, Tilgner L, Gaertner-Akerboom M, Scheckenbach K, Wiltfang J, Chaker A, Schipper J, Wagenmann M. Nasal levels of soluble IL-33R ST2 and IL-16 in allergic rhinitis: inverse correlation trends with disease severity. *Clinical and experimental allergy journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2013;43:1134–1143.
- Beasley R. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet* 1998;351:1225–1232.

- Benninghoff A, Christ B. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. München u.a.: Elsevier, Urban & Fischer, 2008.
- Bernstein IL. *Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter*. [Rochester, Minn.]: American College of Allergy, Asthma, & Immunology, 2008.
- Bhattacharyya N. The economic burden and symptom manifestations of chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2003;17:27–32.
- Bliss EL, Sandberg AA, Nelson DH, Eik-Nes K. The Normal Levels Of 17-Hydroxycorticosteroids in the peripheral blood of man 1. *J Clin Invest* 1953;32:818–823.
- Blom L, Poulsen LK. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2012;189:4331–4337.
- Blumberg DD. Creating a ribonuclease-free environment. *Methods Enzymol* 1987;152:20–24.
- Bobic S|LW. Vascular endothelial growth factor receptor 1 expression in nasal polyp tissue. *Allergy* 2014;69:237–245.
- Bourne JA. *Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden*. 3rd edn. Hamburg: DAKA Diagnostika, 1997.
- Bousquet J, Khaltayev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Baena-Cagnani CE, Canonica GW, van Weel C, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63 Suppl 86:8–160.
- Bousquet J, Lockey R, Malling H. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases A WHO position paper. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998;102:558–562.
- Bustin S. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 2009;55:611–622.
- Cao J, Papadopoulou N, Kempuraj D, Boucher WS, Sugimoto K, Cetrulo CL, Theoharides TC. Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 2005;174:7665–7675.
- Chalmers DT, Lovenberg TW, Souza EB de. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J. Neurosci.* 1995;15:6340–6350.

- Chee L, Graham SM, Carothers DG, Ballas ZK. Immune dysfunction in refractory sinusitis in a tertiary care setting. *Laryngoscope* 2001;111:233–235.
- Chen Y, Dales R, Lin M. The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians. *Laryngoscope* 2003;113:1199–1205.
- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 1992;267:1244–1252.
- Coker HA, Durham SR, Gould HJ. Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients. *J. Immunol.* 2003;171:5602–5610.
- Crompton RMR|. Corticotropin-Releasing Hormone Causes Vasodilation in Human Skin via Mast Cell-Dependent Pathways. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003;88:5427–5432.
- Dautzenberg FM, Hauger RL. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends in Pharmacological Sciences* 2002;23:71–77.
- Desjardins P, Hansen JB, Allen M. Microvolume Protein Concentration Determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *J Vis Exp* 2009.
- Detmar MFPTWF. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *The Journal of experimental medicine* 1994;180:1141–1146.
- Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl* 1993;3:S30-7.
- Drake-Lee AB, McLaughlan P. Clinical symptoms, free histamine and IgE in patients with nasal polyposis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1982;69:268–271.
- Dreborg S. Histamine reactivity of the skin. *Allergy* 2001;56:359–364.
- Dreborg S, Frew A. Position Paper: Allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993;48:49–54.
- Dykewicz MS, Hamilos DL. Rhinitis and sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125:S103-15.
- Ebbens FA, Georgalas C, Luiten S, van Drunen CM, Badia L, Scadding GK, Hellings PW, Jorissen M, Mullol J, Cardesin A, et al. The effect of topical amphotericin B on inflammatory markers in patients with chronic rhinosinusitis: a multicenter randomized controlled study. *Laryngoscope* 2009;119:401–408.
- Emanuel IA, Shah SB. Chronic rhinosinusitis: allergy and sinus computed tomography relationships. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;123:687–691.

- Ewan PW, Coote D. Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy* 1990;45:22–29.
- Ferrara N. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 2003;9:669–676.
- Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Real-time Polymerase Chain Reaction* 2006;27:126–139.
- Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, Cohen N, Cervin A, Douglas R, Gevaert P, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2012;50:1–12.
- Foreman A, Boase S, Psaltis A, Wormald P. Role of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2012;12:127–135.
- Forsythe PD. Opposing Effects of Short- and Long-term Stress on Airway Inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004;169:220–226.
- Fortune DG, Richards HL, Griffiths CEM. Psychologic factors in psoriasis: consequences, mechanisms, and interventions. *Dermatol Clin* 2005;23:681–694.
- Georgitis JW, Matthews BL, Stone B. Chronic sinusitis: characterization of cellular influx and inflammatory mediators in sinus lavage fluid. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995;106:416–421.
- Gerlinger I, Fittler A, Fónai F, Patzkó A, Mayer A, Botz L. Postoperative application of amphotericin B nasal spray in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis, with a review of the antifungal therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266:847–855.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 2001;25:386–401.
- Gosepath J. New immunohistologic findings on the differential role of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in nasal polyposis. *American journal of rhinology* 2005;19:111.
- Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D, Smurthwaite L. The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:579–628.
- Grammatopoulos DK, Chrousos GP. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002;13:436–444.
- Gupta S, Aslakson E, Gurbaxani BM, Vernon SD. Inclusion of the glucocorticoid receptor in a hypothalamic pituitary adrenal axis model reveals bistability. *Theor Biol Med Model* 2007;4:8.

- Hamilos DL, Leung DY, Huston DP, Kamil A, Wood R, Hamid Q. GM-CSF, IL-5 and RANTES immunoreactivity and mRNA expression in chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis (NP). *Clin. Exp. Allergy* 1998;28:1145–1152.
- Hamilos DL, Leung DY, Wood R, Cunningham L, Bean DK, Yasruel Z, Schotman E, Hamid Q. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus nonallergic chronic sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995;96:537–544.
- Harvima I. Is there a role for mast cells in psoriasis? *Archives of dermatological research* 2008;300:461–478.
- Harvima IT, Viinamäki H, Naukkarinen A, Paukkonen K, Neittaanmäki H, Harvima RJ, Horsmanheimo M. Association of cutaneous mast cells and sensory nerves with psychic stress in psoriasis. *Psychother Psychosom* 1993;60:168–176.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986–994.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 2003;24:151–180.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10:413–417.
- Hinriksdóttir I, Melén I. Allergic rhinitis and upper respiratory tract infections. *Acta Otolaryngol Suppl* 1994;515:30–32.
- Honjo T, Inoue N, Shiraki R, Kobayashi S, Otsui K, Takahashi M, Hirata K, Kawashima S, Yokozaki H, Yokoyama M. Endothelial urocortin has potent antioxidative properties and is upregulated by inflammatory cytokines and pitavastatin. *J. Vasc. Res.* 2006;43:131–138.
- Hostettler N, Bianchi P, Gennari-Moser C, Kassahn D, Schoonjans K, Corazza N, Brunner T. Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation. *Allergy* 2012;67:227–234.
- Houser SM, Keen KJ. The role of allergy and smoking in chronic rhinosinusitis and polyposis. *Laryngoscope* 2008;118:1521–1527.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1981;29:577–580.

- Huang Y, Chan FL, Lau C, Tsang S, He G, Chen Z, Yao X. Urocortin-induced endothelium-dependent relaxation of rat coronary artery: role of nitric oxide and K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 2002;135:1467–1476.
- Irwin M, Hauger RL, Jones L, Provencio M, Britton KT. Sympathetic nervous system mediates central corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:101–107.
- Järvikallio A, Harvima IT, Naukkarinen A. Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch. Dermatol. Res.* 2003;295:2–7.
- Jessop DS, Renshaw D, Lightman SL, Harbuz MS. Changes in ACTH and beta-endorphin immunoreactivity in immune tissues during a chronic inflammatory stress are not correlated with changes in corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin. *Journal of neuroimmunology* 1995;60:29–35.
- Jones NS. CT of the paranasal sinuses: a review of the correlation with clinical, surgical and histopathological findings. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2002;27:11–17.
- Kaboord B, Perr M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.* 2008;424:349–364.
- Kalogeromitros D, Syrigou EKI, Makris M, Kempuraj D, Stavrianeas NG, Vasiadi M, Theoharides TC. Nasal provocation of patients with allergic rhinitis and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2007;98:269–273.
- Karlsson G, Holmberg K. Does allergic rhinitis predispose to sinusitis? *Acta Otolaryngol Suppl* 1994;515:26-8; discussion 29.
- Kempuraj D, Papadopoulou NG, Lytinas M, Huang M, Kandere-Grzybowska K, Madhappan B, Boucher W, Christodoulou S, Athanassiou A, Theoharides TC. Corticotropin-releasing hormone and its structurally related urocortin are synthesized and secreted by human mast cells. *Endocrinology* 2004;145:43–48.
- Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, Grammer LC, Schleimer RP. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol* 2008;22:549–559.
- Kim TH, Lee SH, Lee HM, Lee SH, Lee SW, Kim WJ, Park SJ, Kim YS, Choe H, Hwang HY, et al. Over-expression of neuropeptide urocortin and its receptors in human allergic nasal mucosa. *Laryngoscope* 2007;117:1513–1518.
- Kimata H. Enhancement of allergic skin wheal responses in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome by playing video games or by a frequently ringing mobile phone. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003;33:513–517.

- Klimek L, Bachert C, Wagenmann M, Ring J, Pfaar O. MP29-02 (Dymista®) “ Eine neue Behandlungsoption für die allergische Rhinitis. *AL* 2014;37:55–68.
- Kohno M, Kawahito Y, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Yamada R, Inoue KI, Kusaka Y, Kubo T, Elenkov IJ, Chrousos GP, et al. Urocortin expression in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: relation to inflammatory activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:4344–4352.
- Lau C, Chan YC, Yao X, Chan FL, Chen Z, Huang Y. Nickel inhibits urocortin-induced relaxation in the rat pulmonary artery. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;488:169–172.
- Lee H. Vascular endothelial growth factor drives autocrine epithelial cell proliferation and survival in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009;180:1056–1067.
- Lenarz T, Boenninghaus H. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde: Mit 6 Tabellen ; [mit Fallquiz]*. 14th edn. Berlin: Springer, 2012.
- Leonard BE. The HPA and immune axes in stress: The involvement of the serotonergic system. *European Psychiatry* 2005;20:S302-S306.
- Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arca M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1213–1220.
- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, et al. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98:7570–7575.
- Liang K, Su M, Shiao J, Tseng H, Hsin C, Lin J, Jiang R. Amphotericin B irrigation for the treatment of chronic rhinosinusitis without nasal polyps: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Am J Rhinol* 2008;22:52–58.
- Lim M, Lew-Gor S, Darby Y, Brookes N, Scadding G, Lund VJ. The relationship between subjective assessment instruments in chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 2007;45:144–147.
- Liu L. School Examinations Enhance Airway Inflammation to Antigen Challenge. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;165:1062–1067.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001;25:402–408.
- Lund VJ, Kennedy DW. Staging for rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;117:S35-40.

- Malm L, van Gerth Wijk R, Bachert C. Guidelines for nasal provocations with aspects on nasal patency, airflow, and airflow resistance. International Committee on Objective Assessment of the Nasal Airways, International Rhinologic Society. *Rhinology* 2000;38:1–6.
- Marshall GD, Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav. Immun.* 1998;12:297–307.
- Matsumoto I, Inoue Y, Shimada T, Aikawa T. Brain Mast Cells Act as an Immune Gate to the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Dogs. *The Journal of experimental medicine* 2001;194:71–78.
- McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology* 2001;13:534–540.
- McEvoy. Corticotropin-releasing hormone signaling in synovial tissue from patients with early inflammatory arthritis is mediated by the type 1 α corticotropin-releasing hormone receptor. *Arthritis & rheumatism* 2001;44:1761–1767.
- McEwen. Protection and Damage from Acute and Chronic Stress: Allostasis and Allostatic Overload and Relevance to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004;1032:1–7.
- Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA, Bachert C, Baraniuk J, Baroody FM, Benninger MS, et al. Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004;114:155–212.
- Mirza N, Kroger H, Doty RL. *Influence of age on the 'nasal cycle'*. *Laryngoscope* 1997 Jan; 107(1):62-6.
- Montoro J, Mullol J, Jáuregui I, Dávila I, Ferrer M, Bartra J, del Cuvillo A, Sastre J, Valero A. Stress and allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009;19 Suppl 1:40–47.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998;24:954-8, 960, 962.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263–273.
- Mygind N, Pedersen CB, Prytz S, Sorensen H. Treatment of nasal polyps with intranasal beclomethasone dipropionate aerosol. *Clin Allergy* 1975;5:159–164.
- Naclerio R, Rosenwasser L. Allergic rhinitis: current and future treatments. *Clinical and experimental allergy reviews* 2002;2:137–147.

- Naish SJ, Boenisch T, Mally M. *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*. Carpinteria: Dako Corp, 1989.
- Nozu T, Martinez V, Rivier J, Taché Y. Peripheral urocortin delays gastric emptying: role of CRF receptor 2. *Am. J. Physiol.* 1999;276:G867-74.
- Ozdamar SO, Seçkin D, Kandemir B, Turanlı AY. Mast cells in psoriasis. *Dermatology (Basel)* 1996;192:190.
- Patou J, Holtappels G, Affleck K, Gevaert P, Perez-Novo C, van Cauwenberge P, Bachert C. Enhanced release of IgE-dependent early phase mediators from nasal polyp tissue. *J Inflamm (Lond)* 2009;6:11.
- Pawankar R. Nasal polyposis: an update: editorial review. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:1–6.
- Pawankar R, Nonaka M. Inflammatory mechanisms and remodeling in chronic rhinosinusitis and nasal polyps. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007;7:202–208.
- Pleis JR, Lucas JW, Ward BW. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2008. *Vital Health Stat 10* 2009;1–157.
- Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18:195–200.
- Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, Kern EB, Congdon DJ, Adolphson CR, Springett MJ, Gleich GJ, Kita H. Striking deposition of toxic eosinophil major basic protein in mucus: implications for chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005a;116:362–369.
- Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA, Roberts GD. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin. Proc.* 1999;74:877–884.
- Ponikau JU, Sherris DA, Weaver A, Kita H. Treatment of chronic rhinosinusitis with intranasal amphotericin B: a randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005b;115:125–131.
- Rassow J. *Biochemie: 50 Tabellen*. Stuttgart: Thieme, 2006.
- Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:3116–3120.
- Renz H. *In-vitro-Allergiediagnostik: Leitlinie*. Retrieved 01 August 2015. from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/061-017_S1_In-vitro-Allergiediagnostik_08-2009_08-2014.pdf, 2010.

- Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, et al. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98:2843–2848.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154–160.
- Ruhn J. The increased number of epithelial mast cells in nasal polyps and adjacent turbinates is not allergy-dependent. *Allergy* 1990;45:370–374.
- Sánchez MM, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR. Autoradiographic and in situ hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in nonhuman primate brain. *J. Comp. Neurol.* 1999;408:365–377.
- Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, Torii A, Kawakami M, Sasano H. Urocortin 1 in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:5352–5361.
- Scadding GK, Durham SR, Mirakian R, et al. BSACI guidelines for the management of rhinosinusitis and nasal polyposis. *Clin. Exp. Allergy* 2008; 38: 260–75. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02889.x.
- Seiberling KA, Conley DB, Tripathi A, Grammer LC, Shuh L, Haines GK, Schleimer R, Kern RC. Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of staphylococcal exotoxins in nasal polyps. *Laryngoscope* 2005a;115:1580–1585.
- Seiberling KA, Grammer L, Kern RC. Chronic rhinosinusitis and superantigens. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2005b;38:1215-36, ix.
- Selye H. Stress and the General Adaptation Syndrome*. *Br Med J* 1950;1:1383–1392.
- Shejbal D, Vagić D, Stevanović S, Koić E, Kalogjera L. Impact of posttraumatic stress disorder on sinonasal symptoms and quality of life in patients with chronic rhinosinusitis. *Patient Prefer Adherence* 2012;6:847–852.
- Singh L. Acute Immobilization Stress Triggers Skin Mast Cell Degranulation via Corticotropin Releasing Hormone, Neurotensin, and Substance P: A Link to Neurogenic Skin Disorders. *Brain, behavior, and immunity* 1999;13:225–239.
- Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Seretakis D, Green M, Theoharides TC. Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotropin-releasing hormone receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999;288:1349–1356.
- Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, Manna PR, Skobowiat C, Zmijewski M, Li W, Janjetovic Z, Postlethwaite A, Zouboulis CC, et al. Steroidogenesis in the skin:

- Implications for local immune functions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2013;137:107–123.
- Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2012;212:v, vii, 1-115.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76–85.
- Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 118: 773-86; quiz 787-8.
doi:10.1016/j.jaci.2006.07.024.
- Stuck, B., Rhinosinusitis guidelines--unabridged version: S2 guidelines from the German Society of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery. Vol. 60. 2012.
- Suzuki R, Furuno T, McKay DM, Wolvers D, Teshima R, Nakanishi M, Bienenstock J. Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P. *J. Immunol.* 1999;163:2410–2415.
- Tagen M, Stiles L, Kalogeromitros D, Gregoriou S, Kempuraj D, Makris M, Donelan J, Vasiadi M, Staurianean NG, Theoharides TC. Skin corticotropin-releasing hormone receptor expression in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127:1789–1791.
- Tan BK, Chandra RK, Pollak J, et al. Incidence and associated premorbid diagnoses of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013.
doi:10.1016/j.jaci.2013.02.002
- Teixeira PJZ, Porto L, Kristensen CH, Santos AH, Menna-Barreto SS, Do Prado-Lima, Pedro Antˆnio Schmidt. Post-traumatic stress symptoms and exacerbations in COPD patients. *COPD* 2015;12:90–95.
- Terrier G, Baumann RP, Pidoux JM, Chaux-de-Fonds L. Endoscopic and histopathological observations of chronic maxillary sinusitis. *Rhinology* 1976;14:129–132.
- Theoharides TC, Kalogeromitros D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;1088:78–99.
- Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Webster E, Chrousos G. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology* 1998;139:403–413.

- Theoharides TC, Spanos C, Pang X, Alferes L, Ligris K, Letourneau R, Rozniecki JJ, Webster E, Chrousos GP. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. *Endocrinology* 1995;136:5745–5750.
- Theoharides TC, Zhang B, Kempuraj D, Tagen M, Vasiadi M, Angelidou A, Alysandratos K, Kalogeromitros D, Asadi S, Stavrianeas N, et al. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107:4448–4453.
- Theoharides TS. Corticotropin-Releasing Hormone Induces Skin Mast Cell Degranulation and Increased Vascular Permeability, A Possible Explanation for Its Proinflammatory Effects¹. *Endocrinology* 1998;139:403–413.
- Tieu DD, Kern RC, Schleimer RP. Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;124:37–42.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 1979;76:4350–4354.
- Trianti-Dimoleni V, Mastorakos G, Nezi M. *Corticotropin Releasing Hormone And The Immune/Inflammatory Response*: MDText.com, Inc, 2010.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981;213:1394–1397.
- van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, Ruyck N de, Cuvelier C, van Cauwenberge P, Bachert C. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;124:253-9, 259.e1-2.
- van Cauwenberge P, Belder T de, Vermeiren J, Kaplan A. Global Resources in Allergy (GLORIA): allergic rhinitis and allergic conjunctivitis. *Clinical & Experimental Allergy Reviews* 2003;3:46–50.
- van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, Tomassen P, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;128:728–732.
- van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J. Comp. Neurol.* 2000;428:191–212.
- van Zele T, Claeys S, Gevaert P, van Maele G, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy* 2006;61:1280–1289.

- van Zele T, Gevaert P, Watelet J, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, van Cauwenberge P, Bachert C. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004;114:981–983.
- Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, Paepe A de, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3 (7)
- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 1995;378:287–292.
- Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Lelias J, Kaghad M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Letters* 1993;335:1–5.
- Wagenmann M. Prognostische und pathophysiologische Faktoren der chronischen Nasennebenhöhlenentzündung 2002.
- Wang T, Yang Q, Li P, Liu X, Zhang G. [Clinical analysis of chronic rhinosinusitis in children]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2010;24:489–492.
- Watelet JB, Bachert C, Claeys C, van Cauwenberge P. Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis. *Allergy* 2004;59:54–60.
- Willenberg HS, Bornstein SR, Hiroi N, Path G, Goretzki PE, Scherbaum WA, Chrousos GP. Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type I antagonist on human adrenal function. *Molecular psychiatry* 2000;5:137–141.
- Wittekindt C. Immunohistochemical expression of VEGF and VEGF receptors in nasal polyps as compared to normal turbinate mucosa. *European archives of oto-rhino-laryngology* 2002;259:294.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-1, 134-8.
- Wright RJ, Finn P, Contreras JP, Cohen S, Wright RO, Staudenmayer J, Wand M, Perkins D, Weiss ST, Gold DR. Chronic caregiver stress and IgE expression, allergen-induced proliferation, and cytokine profiles in a birth cohort predisposed to atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004;113:1051–1057.
- Zhang N, van Zele T, Perez-Novo C, van Bruaene N, Holtappels G, DeRuyck N, van Cauwenberge P, Bachert C. Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008;122:961–968.

8 Danksagung

Mein herzliches Dankeschön geht an alle, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Privatdozent Dr. med. Martin Wagenmann, bedanken. Deine fachliche und vor allem auch moralische Unterstützung haben mich immer wieder angetrieben, mir Mut und Zuversicht vermittelt und waren eine herausragende Inspiration. Vielen Dank auch an Pascal Werminghaus, der mich in die Methodik eingewiesen und mich bei den Experimenten unterstützt hat. Deine hervorragende Betreuung und die Tatsache, dass deine Tür immer für mich offen stand haben dazu geführt, dass ich eine große Leidenschaft für die Forschung entwickeln konnte. Ein großer Dank geht auch an Nadine Lottmann, die mir während der ganzen Zeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich immer wieder unterstützt und motiviert hat. Dafür kann ich Dir nicht genug danken. Ebenso möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Constanze Wiek, die ich bei Problemen jeder Art fragen konnte und mir stets geholfen hat. Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Mutter und meiner Familie bedanken, denn ohne sie wären dieses Studium und diese Arbeit niemals möglich gewesen. Danke, dass ihr mir immer in jeder Lebenslage zur Seite standet. Mein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. Jörg Schipper, der alle Gerätschaften zur Durchführung der Versuche zur Verfügung gestellt hat.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Ort, Datum

Sandra Ines Büter