



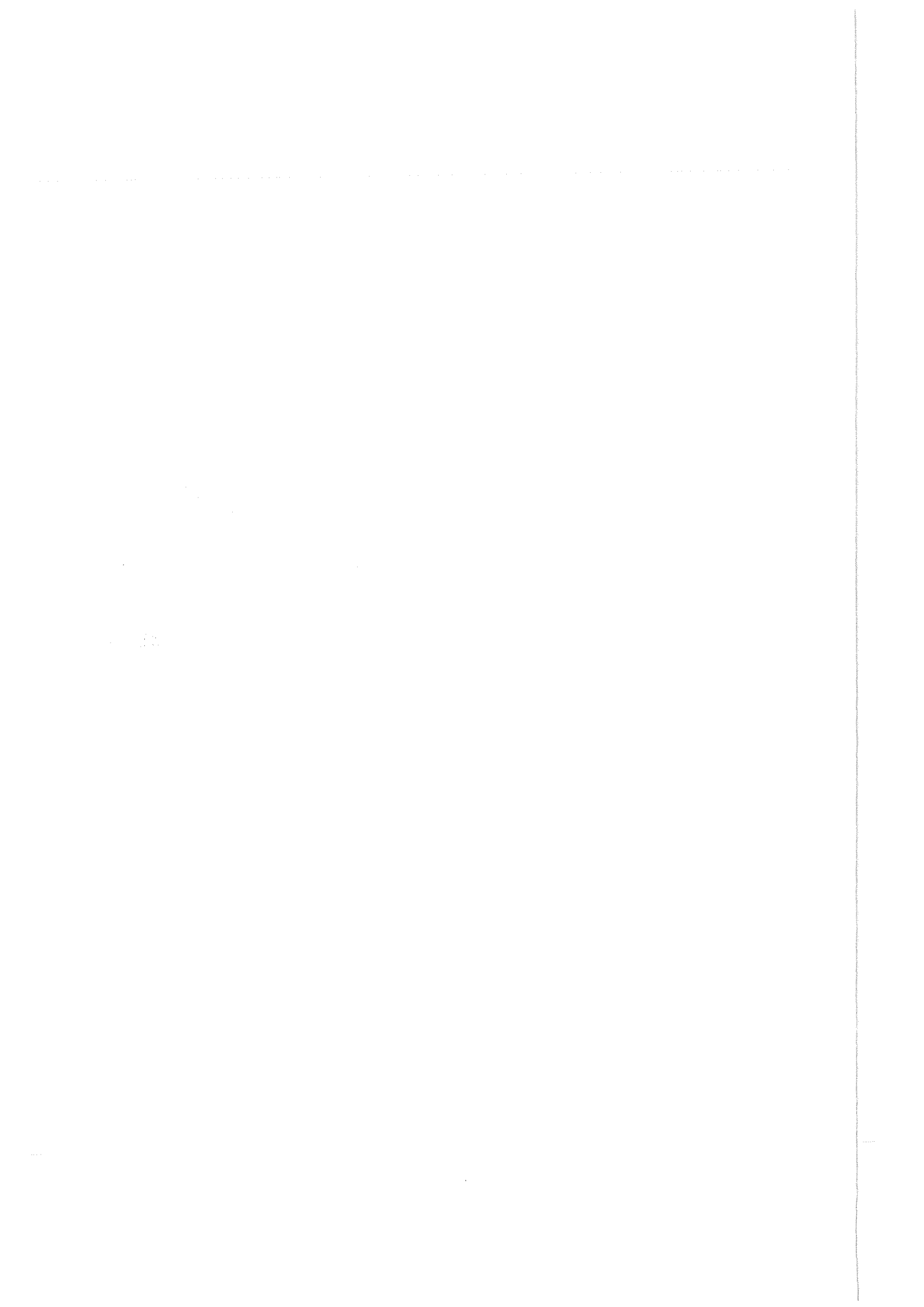
Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6113

***In vitro* Untersuchungen
zum Einfluß von NO₂ in
umweltrelevanter Konzentration
auf die Immunfunktionen von
Rinderalveolarmakrophagen**

V. Höcke
Institut für Toxikologie

Juli 1998



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6113

In vitro Untersuchungen zum Einfluß von NO₂ in
umweltrelevanter Konzentration auf die Immunfunktionen von
Rinderalveolarmakrophagen

Verena Höcke

Institut für Toxikologie

*von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität
Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1998

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor
Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe
Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)
ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Stickstoffdioxid (NO₂) ist ein Hauptbestandteil der Luftverschmutzung. Eine schädigende Wirkung übt NO₂ auf Zellen des Respirationstraktes aus. Der Alveolarmakrophage ist eine Zielzelle des Schadgases. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von NO₂ in umweltrelevanter Konzentration [0,2 ppm] auf Immunfunktionen von Rinderalveolarmakrophagen (RAM) untersucht. Hierzu wurde *in vitro* die Freisetzung folgender Entzündungsmediatoren nach Gasexposition bestimmt: Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Superoxid-anionenradikal (Superoxidanion), Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin E₂ (PGE₂).

Es konnte gezeigt werden, daß eine 2-stündige NO₂-Begasung keine Freisetzung der untersuchten Mediatoren bewirkt. Deutliche Effekte waren jedoch beobachtbar, wenn zusätzlich zur Gasexposition eine Stimulierung der Makrophagen erfolgte. In diesem Fall wurden nach NO₂-Exposition eine Reduktion der stimulierten-Superoxidanionen-Produktion und eine Erhöhung der stimulierten Sekretion von TNF- α , PGE₂ und NO im Vergleich zu luft-begasteten Zellen gemessen.

Die NO-Bildung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) wurde hierbei in Form von Nitrit ermittelt. Um zu klären, ob die erhöhte Nitritbildung nach NO₂-Exposition tatsächlich auf einer vermehrten endogenen NO-Synthese oder auf NO₂, welches während der Gasexposition in Lösung ging, beruhte, wurde zusätzlich die Expression der iNOS mRNA und die iNOS Proteinbildung untersucht. Die Expression der iNOS mRNA wurde mit RT-PCR bestimmt. LPS und IFN γ induzierten in RAM die Expression der iNOS mRNA. Eine Erhöhung der LPS- bzw. IFN γ -induzierten Expression der iNOS mRNA konnte nach NO₂-Exposition im Vergleich zu luft-begasteten RAM festgestellt werden. Eine erhöhte LPS-stimulierte iNOS Proteinbildung konnte nach NO₂-Begasung in RAW 264.7 Makrophagen nachgewiesen werden.

Zur Klärung des Effektes von NO₂ auf die endogene NO-Bildung wurden Faktoren, welche die NO-Biosynthese beeinflussen, näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Stimuli der iNOS und Natriumnitroprussid (SNP), 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) bzw. Nitrit die Expression der iNOS mRNA nicht beeinflussen. Dagegen bewirkte eine 24-stündige Vorinkubation mit SNP eine Reduktion der LPS-induzierten iNOS mRNA Expression. Außerdem konnte gezeigt werden, daß PGE₂ positiv modulierend auf die induzierte NO-Bildung wirkt.

Primäraktivierte Makrophagen wiesen ein anderes Reaktionsprofil nach NO₂-Exposition auf als nicht primäraktivierte RAM. Die Nitritbildung, die iNOS-mRNA Expression und die PGE₂-Freisetzung war in primäraktivierten RAM nach NO₂-Begasung gegenüber luft-begasteten supprimiert.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß NO₂ in einer niedrigen Konzentration die Immunfunktionen von Alveolarmakrophagen beeinflusst.

***In vitro* investigations on the influence of NO₂ in an environmental relevant concentration on the immunofunctions of bovine alveolar macrophages**

Nitrogen dioxide (NO₂) is a major component of air pollution. A damaging influence exerts NO₂ on the cells of the respiratory tract. Alveolar macrophages are one of the target cells of the noxious gas. In the present study the effect of NO₂ in an environmental relevant concentration [0.2 ppm] on immunofunctions of bovine alveolar macrophages (BAM) was investigated. To this the release of the following mediators of inflammation was determined after gas exposure: Tumor necrosis factor α (TNF- α), superoxide anion (superoxide), nitrogen monoxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂). The results demonstrated that a two hour NO₂-exposure caused no release of the examined mediators. However, clear effects were observed after gas exposure, when the macrophages were additionally stimulated. In that case a reduction of the stimulated-superoxide production and an increase of the stimulated release of TNF- α , PGE₂ and NO was measured after NO₂-exposure in comparison with the air-exposed cells.

The NO-production of the inducible NO-synthase (iNOS) was determined by measuring nitrite. In order to investigate whether the increased nitrite formation after NO₂-exposure stemmed from an actually raised endogenous NO-synthesis or from dissolved NO₂, the iNOS mRNA expression and the iNOS protein formation was additionally analysed. The expression of the iNOS mRNA was determined by RT-PCR. LPS and IFN γ induced the expression of the iNOS mRNA in BAM. An increase of the LPS- or IFN γ -stimulated expression of the iNOS mRNA was measured after NO₂-exposure in comparison to the air-treated BAM. The LPS-stimulated iNOS protein formation was increased after NO₂-exposure in RAW 264.7 macrophages.

To investigate the effect of NO₂ on the endogenous NO-formation factors which influence NO-biosynthesis were examined. The experiments showed that the concurrent treatment of the cells with stimuli of iNOS and sodiumnitroprussid (SNP), 3-morpholinosydnonim (SIN-1) or nitrite did not influence iNOS mRNA expression. However, a 24 hour preincubation with SNP caused a reduction of the LPS-induced iNOS mRNA expression. Besides this it was shown that PGE₂ modulated positively the induced NO-formation.

Activated BAM showed a different reaction profile after NO₂-exposure in contrast to non activated BAM. The nitrite formation, the iNOS mRNA expression and the release of PGE₂ was decreased in activated BAM after NO₂-exposure as compared to the air-exposed cells. In conclusion the data indicate that a low-level NO₂ concentration affects the immunofunctions of alveolar macrophages.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Zellkulturmedien und Zusätze	11
2.1.1 Zellkulturmedien	11
2.1.2 Zellkulturzusätze	12
2.2 Zellkultur	13
2.2.1 Gewinnung von Rinderalveolarmakrophagen	13
2.2.2 Kultur der RAM	14
2.2.3 Kultur der Wehi-Zellen	16
2.2.4 Kultur der RAW 264.7 Makrophagen	16
2.2.5 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	18
2.3 Exposition der Zellen in Gasphase	19
2.4 Untersuchungen zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren	21
2.4.1 Bestimmung von TNF- α	21
2.4.2 Bestimmung von Superoxidanionen	22
2.4.3 Bestimmung von Nitrit	23
2.4.4 Bestimmung von PGE ₂	24
2.5 Untersuchungen zur Expression der iNOS mRNA	24
2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA	25
2.5.2 RT-PCR	26
2.5.3 Quantifizierung des PCR-Produktes	28
2.6 Bestimmung der Identität des iNOS-PCR-Produktes	28
2.6.1 Markierung der Oligonukleotid-Sonde mit DIG	28
2.6.2 Hybridisierung	30
2.6.3 Detektion mit Anti-DIG-Antikörpern	30
2.6.4 Autoradiographie	31
2.7 Nachweis des iNOS-Proteins in RAW 264.7 Makrophagen	32
2.7.1 Proteinbestimmung	32
2.7.2 Herstellung von Ganzzellextrakten	32
2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	32
2.7.4 Immunzytochemischer Nachweis des iNOS-Proteins	33
2.8 Bezugsquellen	34
2.9 Datenauswertung	36

3 ERGEBNISSE	37
3.1 Wirkung von NO₂ auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren	38
3.1.1 TNF- α -Sekretion	38
3.1.2 PGE ₂ -Sekretion	39
3.1.3 Superoxidanionen-Produktion	42
3.1.4 NO-Bildung	43
3.2 Untersuchungen zur NO-Bildung in RAM	46
3.2.1 Charakterisierung der NO-Bildung in RAM	46
3.2.1.1 Nitritbildung nach Behandlung mit LPS und IFN γ	46
3.2.1.2 Wirkung der SOD auf die LPS-induzierte Nitritbildung	49
3.2.1.3 Wirkung von PGE ₂ auf die LPS- bzw. IFN γ -induzierte Nitritbildung	49
3.2.1.4 Wirkung von Indomethacin auf die LPS- bzw. IFN γ -induzierte Nitritbildung	51
3.2.2 Untersuchungen zur Expression der iNOS mRNA	53
3.2.2.1 Identität des iNOS-PCR-Produktes	53
3.2.2.2 LPS- und IFN γ -induzierte iNOS mRNA Expression	55
3.2.2.3 Wirkung von SNP, SIN-1 und Nitrit auf die Expression der iNOS mRNA	58
3.2.3 Einfluß von NO ₂ auf die LPS- bzw. IFN γ -induzierte iNOS mRNA Expression	62
3.3 Untersuchungen zur NO-Bildung in RAW 264.7 Makrophagen	65
3.3.1 Zeitverlauf der LPS-induzierten iNOS-Proteinbildung	66
3.3.2 Wirkung von NO ₂ auf die Bildung des iNOS-Proteins	67
4 DISKUSSION	69
5 LITERATURVERZEICHNIS	85

Abkürzungen

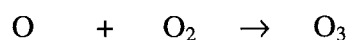
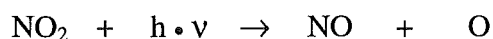
AM	Alveolarmakrophagen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
DIG	Digoxygenin
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
L-NMMA	L-N ^G -Monomethyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid
[NO]	Stickstoffmonoxid
[NO ₂]	Stickstoffdioxid
[O ₂ ⁻]	Superoxidanion
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ppm	<i>parts per million</i>
RAM	Rinderalveolarmakrophagen
rek.	rekombinant
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIN-1	3-Morpholinosydnonimin
SNP	Natriumnitroprussid
SOD	Superoxiddismutase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

In der vorliegenden Arbeit wurden in Übereinstimmung mit der allgemein üblichen Literatur die Radikale [·NO], [·NO₂] und [·O₂⁻] als NO, NO₂ und O₂⁻ bezeichnet.

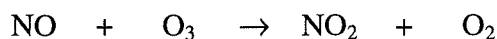
1 Einleitung

Der Gasaustausch zwischen Organismus und Umwelt wird durch die Atmung gewährleistet. Durch diesen Prozeß wird über die Atemwege molekularer Sauerstoff aus der Luft für den oxidativen Abbau von Nahrungsstoffen bereitgestellt und produziertes Kohlendioxid abgegeben. Die Atemwege stehen somit in ständigem Kontakt mit der Umgebungsluft. Der Mensch ist damit zwangsläufig einer Vielzahl von Luftverunreinigungen ausgesetzt, die natürlicherweise entstanden oder anthropogenen Ursprungs sind. Luftverunreinigungen können den Respirationstrakt schädigen und vorwiegend chronische, bei hohen Konzentrationen auch akute Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege verursachen (Barnes, 1994; Nowak *et al.*, 1992; Van Loveren *et al.*, 1995).

Die Hauptbestandteile der Luftverunreinigung sind Stickstoffoxide (NO_x), Schwefeldioxid (SO_2), Ozon (O_3) und staubförmige Schadstoffe, die als Aerosole oder Schwebstäube bezeichnet werden. Stickstoffoxide entstehen anthropogen fast ausschließlich bei Verbrennungsprozessen in Motoren und Feuerungsanlagen. Dabei wird überwiegend Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffdioxid (NO_2) emittiert. Die so gebildeten Stickstoffoxide unterliegen während des Transports in der Atmosphäre einer Reihe chemischer Umwandlungen und können dabei sekundäre Schadstoffe bilden. Hierzu zählt die lichtabhängige Ozonbildung in der Troposphäre. NO_2 gilt als Vorläufersubstanz des Ozons, da es durch Photolyse zu NO und atomarem Sauerstoff (O) zerfällt. Der atomare Sauerstoff reagiert mit Luftsauerstoff zu Ozon.



Aufgrund der schnellen Rückreaktion



entstehen nur dann höhere Ozonkonzentrationen, wenn NO durch andere Reaktionen aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Dies geschieht vor allem bei der Reaktion von NO mit Alkylperoxyradikalen, die lichtabhängig bei der Reaktion von Ozon mit Kohlenwasserstoffen entstehen (Elstner, 1990).

Stickstoffoxide spielen jedoch nicht nur bei der bodennahen Ozonbildung eine Rolle, sondern auch bei dem Abbau von Ozon in der Stratosphäre. Daneben tragen sie zu saurem Regen bei und führen zu einer Überdüngung der Böden.

Von den luftgetragenen Stickstoffoxiden, NO und NO₂, besitzt NO₂ eine umweltmedizinische Relevanz. Da NO an der Luft sehr rasch mit Sauerstoff reagiert unter Bildung von NO₂, NO₂ ist ein braunrotes, äußerst korrosives und charakteristisch riechendes Gas. Das Molekül hat auf seiner äußeren Elektronenhülle ein ungepaartes Elektron. Dadurch besitzt es die Eigenschaften eines Radikals.

In der Luft werden in Städten und ländlichen Gebieten NO₂-Konzentrationen zwischen 10-30 ppb [20-60 µg/m³] gemessen. In Ballungsgebieten können insbesondere durch ein hohes Verkehrsaufkommen Spitzenwerte bis zu 150 ppb [300 µg/m³] erreicht werden (Landesanstalt für Umweltschutz, Luftbericht 1996). Das Schadgas NO₂ hat im Gegensatz zu anderen Luftschadstoffen, wie z.B. Ozon oder SO₂, auch in der Innenluft eine Bedeutung. So können in Innenräumen durch den Betrieb von Gasöfen kurzfristig NO₂-Konzentrationen bis zu 550 ppb [1100 µg/m³] entstehen (Speizer *et al.*, 1980). Eine weitere Quelle für erhöhte NO₂-Konzentrationen in Innenräumen ist der Zigarettenrauch. Im Zigarettenrauch können NO₂-Konzentrationen höher als 50 ppm gemessen werden (Norman und Keith, 1965).

Die Konzentration von NO₂ in der Außen- und Innenluft wird durch mehrere Vorschriften und Empfehlungen geregelt. In der Technischen Anleitung (TA) Luft wird als Immissionswert für das Jahresmittel ein Wert von 40 ppb [80 µg/m³] festgelegt. In der Europäischen Union wird als 98% Wert (98-Perzentil) aller gemessenen Stundenwerte eines Jahres ein Wert von 100 ppb [200 µg/m³] vorgeschrieben (EG-Richtlinie 85/203/EWG, 1985). Der MAK-Wert legt die maximale Konzentration am Arbeitsplatz mit 5 ppm [10000 µg/m³] fest.

Die Wirkung von NO₂ auf den Organismus wird mit unterschiedlichen Methoden festgestellt. Man unterscheidet Untersuchungen zur Lungenfunktion am Menschen, zur biochemischen und zellulären Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavage und *in vitro* Tests, welche bei einzelnen Zelltypen u.a. die Freisetzung von Entzündungsmediatoren zum Nachweis haben.

Lungenfunktionstests geben Auskunft über Lungenvolumina, die Lungendehnbarkeit, den Atemwegwiderstand und die Effizienz des Gasaustausches. Eine Erhöhung des Atemwegwiderstandes wurde von Nieding und Mitarbeiter (von Nieding *et al.*, 1979; von Nieding und Wagner, 1979) in Übereinstimmung mit anderen Autoren (Islam und Ulmer, 1979) in einem Konzentrationsbereich von 5-8 ppm NO₂ für eine Kurz- (5 min) und eine Langzeitexposition (1-2 h) beobachtet. Geringfügig niedrigere Konzentrationen [2-4 ppm] führten zu keiner Änderung des Atemwegwiderstandes oder der Spirometrie (Linn *et al.*,

1985; Mohsenin, 1988). Nach Provokation mit Methacholin konnte Mohsenin (1988) eine Erhöhung der Atemwegsreaktivität feststellen. Im Konzentrationsbereich unter 1 ppm wurden keine signifikanten Effekte nach NO₂-Exposition in Bezug auf die menschliche Lungenfunktion nachgewiesen. Frampton und Mitarbeiter (1991) untersuchten die Wirkung einer 3-stündigen NO₂-Exposition mit 1,5 ppm und einer 3-stündigen Exposition mit NO₂ in einer Konzentration von 0,05 ppm inklusiv 3 mal 15 min Spitzenwerten von 2 ppm. Hierbei wurde eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes nach 3-stündiger Exposition mit 1,5 ppm nicht jedoch nach der Intervall-Exposition beobachtet. Es gibt Hinweise darauf, daß vorbelastete Menschen im Vergleich zu gesunden Menschen empfindlicher auf eine NO₂-Exposition reagieren, wenn die Atemwegsreaktivität und Lungenfunktion gemessen werden. So führte die Exposition von Patienten mit Asthma bronchiale mit NO₂ bereits in einer Konzentration von 0,1 ppm zu einer leichten Obstruktion der Atemwege und einer Zunahme der bronchialen Empfindlichkeit (Orehek *et al.*, 1976). Dieses Ergebnis wurde allerdings in nachfolgenden Studien mit niedrigen NO₂-Konzentrationen [0,1-0,25 ppm] nur teilweise bestätigt (Hazucha *et al.*, 1983; Jörres und Magnussen, 1991; Kleinmann *et al.*, 1983).

In Untersuchungen zur zellulären und biochemischen Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavage wurde eine Zunahme der Mastzellen und Lymphozyten nach Einatmung von 2,25-5,5 ppm NO₂ beobachtet (Sandström *et al.*, 1991). Eine signifikante Reduktion einer Lymphozytensubpopulation, der zytotoxischen T-Zellen, wurde nach wiederholter Exposition gegenüber 1,5 ppm NO₂ gemessen (Sandström *et al.*, 1992). In Tieren wurde nach Exposition mit NO₂ eine Erhöhung der Anzahl von Neutrophilen und Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage beobachtet (DeNicola *et al.*, 1981; Glasgow *et al.*, 1987; Gordon *et al.*, 1986). Eine Erhöhung der Anzahl von Neutrophilen wurde auch nach Exposition von gesunden Menschen mit NO₂ [2 ppm] für 4 h in Bronchialwaschungen festgestellt (Blomberg *et al.*, 1997). Nach Exposition gegenüber 3-4 ppm NO₂ wurde eine 40% Reduktion der Aktivität des α 1-Proteinase-Inhibitors, ein wichtiger Proteinase-Inhibitor in der Lunge, gemessen (Mohsenin und Gee, 1987). Der α 1-Proteinase-Inhibitor schützt die Lunge vor einem proteolytischen Abbau, besonders gegenüber der Elastase von Neutrophilen. Im Gegensatz dazu hatte die *in vitro* Exposition des α 1-Proteinase-Inhibitors mit hohen NO₂-Konzentrationen keinen Einfluß auf dessen inhibierende Kapazität gegenüber der Elastase (Mohsenin und Gee, 1987). In einer nachfolgenden Studie konnte gezeigt werden, daß die inhibierende Wirkung von NO₂ auf die Aktivität des α 1-Proteinase-Inhibitors nicht auf dem

direkten Einfluß des NO₂ beruht, sondern durch Lipidperoxidationsprodukte, die bei der NO₂-Exposition gebildet wurden, verursacht wird (Mohsenin, 1991). Mehrere Untersuchungen bestätigen die Initiierung einer Lipidperoxidation durch NO₂ (Pryor und Lightsey, 1981; Gallon und Pryor, 1993, 1994). Bei Alveolarmakrophagen der Ratte wurde nach NO₂-Exposition *in vitro* eine vermehrte Freisetzung von Aldehyden beobachtet, welche aus dem nicht enzymatischen Abbau von Lipidperoxidationsprodukten resultieren (Robison, 1995). Signifikante Unterschiede gegenüber luft-exponierten Zellen wurden nach 4-stündiger NO₂-Exposition mit einer Konzentration von 1 ppm und nach 1-stündiger Begasung mit 5 bzw. 20 ppm für einige der gemessenen Aldehyde festgestellt. In weiteren *in vitro* Untersuchungen wurde beobachtet, daß eine NO₂-Exposition die Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten beeinflusst und zwar in der Weise, daß niedrige Konzentrationen [1-5 ppm] den basalen Metabolismus nicht ändern, die stimulierte Freisetzung von Cyclo- und Lipoxygenaseprodukten jedoch signifikant verstärken. Begasung mit einer hohen NO₂-Konzentration [20 ppm] zeigte das gegenteilige Reaktionsprofil (Robison und Forman, 1993). Eine verminderte Bildung von Superoxidanionen wurde in Untersuchungen mit Rinderalveolarmakrophagen nach NO₂-Exposition [1,5 bzw. 3 ppm] gegenüber Luft-Begasung festgestellt (Lind, 1992).

Die hier genannten Daten zu *in vitro* Untersuchungen belegen, daß eine Begasung mit NO₂ die Freisetzung bestimmter Mediatoren beeinflusst und ein Mechanismus, möglicherweise der wichtigste, auf der Initiierung einer Lipidperoxidation beruht. Viele der *in vitro* Untersuchungen zur Wirkung von NO₂ wurden zwar mit einer niedrigen [1-5 ppm] NO₂-Konzentration durchgeführt, jedoch ist die Mehrzahl der Bevölkerung deutlich geringeren Konzentrationen ausgesetzt. Für die Abschätzung eines Gefahrenpotentials sind Untersuchungen zur Klärung des Wirkungsmechanismus des NO₂ in umweltrelevanten Konzentrationen notwendig.

Auf der Grundlage dieser Betrachtung wurde eine Studie erarbeitet, welche zum Ziel hatte die Wirkungsweise von umweltrelevanten NO₂-Konzentrationen in einem *in vitro* System auf bestimmte Immunfunktionen von Alveolarmakrophagen zu untersuchen. Makrophagen nehmen eine zentrale Rolle in der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr der Lunge ein. Als unspezifisch versteht man hierbei die Phagozytose und den damit verbundenen Abbau von körperfremden Material. Der Makrophage übernimmt spezifische immunologische Funktionen durch die Induktion einer Immunreaktion, welche durch die Kooperation von Makrophage und Lymphozyt das Zustandekommen einer zell-vermittelten und einer

antikörper-bildenden Immunität ermöglicht (Lohmann-Matthes, 1981). Als Untersuchungsmodell wurden für die vorliegende Arbeit Rinderalveolarmakrophagen (RAM) ausgewählt. Diese Zellen haben sich in vorhergehenden Studien u.a. zur Untersuchung der Effekte von Ozon bzw. von NO₂ [1,5-3 ppm] als geeignet erwiesen, eine Aussage über die Auswirkungen einer Gasexposition auf die Immunfunktionen von Makrophagen zu erhalten (Lind, 1993; Mosbach, 1994). Vergleichende Untersuchungen mit humanen Makrophagen zeigten, daß die Freisetzung einzelner Mediatoren bei Makrophagen von Mensch und Rind weitgehend übereinstimmte (Mosbach, 1994). Das heißt RAM reagieren in ähnlicher Weise wie humane Alveolarmakrophagen, so daß die Übertragung bestimmter Versuchsergebnisse auf humane Alveolarmakrophagen berechtigt erscheint. Zur Beschreibung einer möglichen Beeinträchtigung der Immunfunktion von RAM nach NO₂-Exposition wurde die Freisetzung folgender Parameter in dieser Arbeit untersucht:

Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)

Prostaglandin E₂ (PGE₂)

Superoxidanionenradikal (O₂⁻)

Stickstoffmonoxid (NO)

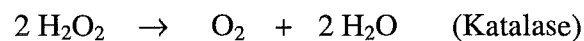
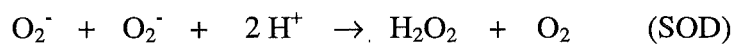
TNF- α wurde aufgrund seiner tumor-zerstörenden Wirkung entdeckt und auch danach benannt (griechisch *nekrosis*, absterben) (Old, 1987). Es ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, welches in erster Linie von aktivierten Makrophagen und Blutmonozyten freigesetzt wird. TNF- α nimmt neben seiner tumor-zerstörenden Wirkung auch eine zentrale Rolle bei der Regulation von Entzündungs- und Immunreaktionen ein. TNF- α wirkt autokrin auf Monozyten und induziert in unterschiedlichen Zelltypen (z.B. Endothelzellen, T- und B-Lymphozyten, Granulozyten) die Freisetzung weiterer Zytokine, so daß diese Zellen mit in das Entzündungsgeschehen eingreifen und daraus eine verstärkte Immunantwort resultiert (Old, 1988). Die TNF- α -induzierte Freisetzung mehrerer proinflammatorischer Zytokine wird zum Teil über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) gewährleistet. NF- κ B ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der nach Aktivierung im Zytosol der Zelle, an der Induktion und Regulation der Genexpression proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist. Eine NF- κ B-bindende Sequenz ist auch in der Promotorregion des TNF- α -Gens beschrieben worden (Collart *et al.*, 1990). TNF- α werden jedoch nicht nur positive regulierende Funktionen zugeschrieben. Hohe Konzentrationen an TNF- α können zum septischen Schock führen und außerdem weisen Studien daraufhin, daß

TNF- α zur Kachexie, einer ausgeprägten allgemeinen Auszehrung durch den Verlust von Fettpolstern und den Schwund von Muskelmasse, beitragen könnte (Old, 1988).

Lipidmediatoren, die sich von der Arachidonsäure ableiten, erfüllen physiologische (homöostatische) und pathophysiologische (proinflammatorische) Aufgaben. In den Atemwegen bestehen diese Aufgaben u.a. in der Modulation des Atemwegs- und vaskulären Tonus, der Zellproliferation, der Rekrutierung inflammatorischer Zellen und deren Aktivität, der Mukussekretion und der parasymphatischen und sensorischen Nervenfunktion (Belvisi *et al.*, 1997). Zu den Lipidmediatoren zählt Prostaglandin E₂. PGE₂ wird aus Arachidonsäure hergestellt. Diese Reaktion wird von der Cyclooxygenase (Cox) vermittelt, die sowohl konstitutiv (Cox-1) als auch induziert (Cox-2) in der Zelle vorliegen kann. Über das Zwischenprodukt Prostaglandin H₂ können auch andere Produkte wie PGI₂, PGF_{2 α} , PGD₂ und Thromboxan metabolisiert werden (Thien und Walters, 1995). Unter pathophysiologischen Bedingungen wird die Cox-2 in den Epithelzellen der Atemwege und den Alveolarmakrophagen induziert, was mit einer erhöhten Freisetzung an PGE₂ einhergeht. Stimuli für die Induktion der Cox-2 sind Lipopolysaccharid (LPS) und/oder bestimmte Zytokine wie Interleukin-1 β (Maier *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1994; O'Sullivan *et al.*, 1992). Stimuli der Cox-2, wie das LPS, führen auch zur Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). In der Literatur ist eine gegenseitige Beeinflussung der Synthese beider Produkte, NO bzw. PGE₂, beschrieben. Dabei wurden sowohl positiv modulierende als auch inhibierende Effekte von Prostanoiden (PGE₂, PGI₂) auf die induzierte NO-Bildung festgestellt (Gaillard *et al.*, 1992; Marotta *et al.*, 1992).

Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) während des *respiratory burst* durch Leukozyten (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und B-Lymphozyten) ist ein wichtiger Mechanismus der unspezifischen Immunabwehr. Unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies faßt man Sauerstoffradikale und nicht-radikalische reaktive Sauerstoffspezies zusammen. Hierzu zählen: das Superoxidanionenradikal (O₂⁻), das Hydroxylradikal (OH), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Perchlorsäure (HOCl). Superoxidanionenradikale werden in Leukozyten hauptsächlich von einer NADPH-Oxidase produziert. Bestimmte Stimuli, wie Phagozytose und Chemotaxis, induzieren die NADPH-Oxidase über einen rezeptor-vermittelten, andere Stimuli, wie z.B. Ca²⁺-Ionophoren, über einen rezeptor-unabhängigen Prozess (McPhail *et al.*, 1991). Die aktive NADPH-Oxidase ist ein membrangebundener Multienzym-Komplex, welcher aus dem heterodimeren

Cytochrom b_{558} und mindestens zwei zytosolischen Proteinen, p47-phox und p67-phox, besteht. ROS besitzen ein vielfältiges zytotoxisches Potential. Diese Zytotoxizität zeichnet sich u.a. durch die Initiierung einer Lipidperoxidation, Oxidation von Enzymen, welche Eisen-Schwefel-Zentren (4Fe-4S) besitzen, und der Schädigung der DNA aus. Neben diesem zytotoxischen Potential besitzen ROS eine Mediatorfunktion in der Immunantwort, die über eine Aktivierung von NF- κ B erfolgen kann (Schreck *et al.*, 1992). ROS können Mastzellen zur Histaminausschüttung aktivieren, Endothelzellen zur Freisetzung von plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) und in Alveolarmakrophagen den Arachidonsäuremetabolismus stimulieren (Lansing *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1988; Stendahl *et al.*, 1983; Taylor *et al.*, 1983). Die Zelle schützt sich vor dem Angriff der ROS durch die Ausstattung mehrerer antioxidativer Enzyme. Zu diesen gehören die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase und die Glutathionperoxidase. Sie katalysieren folgende Reaktionen:



Die SOD katalysiert die Disproportionierung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid können verschiedene Enzyme beitragen. In den Peroxisomen setzt die Katalase Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff um. Die zytosolische, selenhaltige Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid durch das Tripeptid Glutathion (GSH) (Harris, 1992). Die SOD ist ein intra- und extrazelluläres Enzym (Fridovich, 1995). Als extrazelluläres Enzym wird ihm seit der Entdeckung von Stickstoffmonoxid (NO), als endothelialen relaxierenden Faktor (EDRF), Neurotransmitter und Immunmediator, eine zusätzliche Rolle in der Bioverfügbarkeit von NO zugesprochen (Oury *et al.*, 1996). NO und Superoxidanionen reagieren in wässriger Lösung zu Peroxynitrit, welches u.a. auf Grund seiner erhöhten Stabilität über ein deutlich größeres toxisches Potential als Superoxidanionen bzw. NO verfügen soll (Beckmann und Koppenol, 1996). Da die extrazelluläre SOD die Konzentration an Superoxidanionen kontrolliert, könnte sie darüber entscheiden inwieweit NO eine Reaktion mit Superoxidanionen eingeht oder seine physiologische Aufgabe als EDRF, Neurotransmitter bzw. in der Immunabwehr als NO und nicht in Form von Peroxynitrit erfüllt.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein bedeutender biologischer Botenstoff in der zellulären Kommunikation und Abwehr. NO wird in lebenden Zellen aus der Oxidation des Guanidinostickstoffs von L-Arginin unter Bildung von L-Citrullin produziert. Die Reaktion wird durch die NO-Synthase katalysiert und ist von NADPH, FAD, FMN, Tetrahydrobiopterin, Calmodulin und Häm abhängig (Baek *et al.*, 1993; Marletta, 1993). Man unterscheidet drei Isoformen der NO-Synthase, zwei konstitutiv exprimierte, die endotheliale (ecNOS) und die neuronale NO-Synthase (ncNOS), und eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Xie und Nathan, 1994). Die Aktivität der konstitutiv-exprimierten NO-Synthasen ist im Gegensatz zu der induzierbaren von Ca^{2+} abhängig. Makrophagen exprimieren z.B. nach Behandlung mit LPS und/oder $IFN\gamma$ die iNOS. NO ist ein äußerst wirksames Makrophagenprodukt in der antimikrobiellen Abwehr, wie bei *Listeria monocytogenes* oder *Leishmania protozoa* Infektionen; es wirkt zytostatisch und in manchen Zellen zytolytisch (Hibbs *et al.*, 1990). Dieses toxische Potential erreicht NO durch seine inhibierende Wirkung auf diejenigen Enzyme, welche in ihren katalytischen Zentren nicht häm-gebundene Eisen-Schwefel-Verbindungen besitzen, wie die Ribonukleotid-Reduktase, die Aconitase und die Komplexe 1 und 2 der mitochondrialen Elektronentransportkette. An der Genexpression der iNOS sind Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und der Interferon regulatorische Faktor-1 (IRF-1) beteiligt (Kamijo *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1994).

Die Untersuchungen zur Wirkung von NO haben in den letzten 10 Jahren sprunghaft zugenommen und es zeichnete sich eine vielfältige Bedeutung von NO im Gesamtorganismus ab. Welche Rolle NO im akuten und chronisch entzündlichen Geschehen der Lunge einnimmt, ist noch nicht vollständig geklärt (Barnes und Belvisi, 1993; Gaston *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, daß Patienten mit Asthma bronchiale bzw. mit Bronchiektasen erhöhte NO-Konzentration in der Ausatemluft gegenüber Gesunden haben (Kharitonov *et al.*, 1994, 1995). Die ursächlichen Zusammenhänge hierfür sind nicht bekannt. Auch die Wirkung von Schadgasen auf die NO-Biosynthese in den Atemwegen ist noch nicht hinreichend untersucht.

Ziel der Arbeit:

Schadgase lösen eine Reihe von Lungenerkrankungen aus oder führen bei empfindlichen Menschen zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität. Eine medizinische Behandlung bzw. Prävention kann jedoch nur aussichtsreich erfolgen, wenn die genauen Mechanismen bekannt sind, wie diese Stoffe in den zellulären Stoffwechsel eingreifen. An gut charakterisierten Systemen muß daher versucht werden, diese Signalwege aufzuklären. In der vorliegenden Arbeit wurde der Bildung von Entzündungsmediatoren nach Exposition von Lungenzellen *in vitro* mit NO₂ in umweltrelevanter Konzentration besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Im Vordergrund stand dabei die Induktion der NO-Synthase. Hierbei sollten auch Faktoren, die die NO-Biosynthese beeinflussen, berücksichtigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturmedien und Zusätze

2.1.1 Zellkulturmedien

RAM

Aussaatmedium: RPMI 1640
P/S (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin)

Kulturmedium: RPMI 1640
P/S (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin)
2% fötales Kälberserum (FKS, 30 min hitzeinaktiviert bei 56°C)
In den Experimenten, in welchen ein Nitritnachweis vorgenommen wurde, wurde für die Inkubation der Zellen ein RPMI 1640-Medium ohne Phenolrot verwendet.

Wehi-Zellen

Kulturmedium: RPMI 1640
P/S (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin)
10% fötales Kälberserum (FKS, 30 min hitzeinaktiviert bei 56°C)
L-Glutamin (2 mM)

RAW Makrophagen

Kulturmedium: DMEM
P/S (100 u/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin)
10% fötales Kälberserum (FKS, 30 min hitzeinaktiviert bei 56°C)

2.1.2 Zellkulturzusätze

Folgende Substanzen wurden dem Medium für bestimmte Versuche ausgehend von einer Stammlösung zugesetzt:

Zusatz	Lösungsmittel	Konz. der Stammlsg.
Actinomycin D	0,9% NaCl	1 mg/ml
Indomethacin	DMSO	100 mM
LPS	0,9% NaCl	100 µg/ml
NaNO ₂	Kulturmedium	1 mM
PGE ₂	EtOH	1 mg/ml
TNF-α	PBS/1 mg/ml BSA	5000 U/ml
IFN _γ	20 mM Succinat/0,1 M NaCl 25 mg/ml Dextran/25 mg/ml Glyzin	10000 U/ml
L-NMMA	PBS	100 mM (sterilfiltriert)
SNP	Kulturmedium	1 mM (sterilfiltriert)
SIN-1	Kulturmedium	1 mM (sterilfiltriert)
Opsoniertes Zymosan	0,9%NaCl	10 mg/ml

Opsonierung von Zymosan

1 g Zymosan wurde in 100 ml 0,9% NaCl gelöst. Die Lösung wurde im Wasserbad für 1 h unter ständigem Rühren gekocht. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 2000 g. Das Sediment wurde einmal mit NaCl (0,9%) gewaschen und anschließend in 20 ml NaCl (0,9%) resuspendiert. Die Opsonierung wurde wie folgt durchgeführt: 1 Teil Zymosan wurde mit 3 Teilen FKS (20 ml Zymosan und 60 ml FKS) für 20 min unter mehrmaligem Rühren bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 2000 g für 15 min. Das Sediment wurde anschließend mit 0,9% NaCl gewaschen und danach in 100 ml 0,9% NaCl aufgenommen. Die so gewonnene Stammlösung hatte eine Konzentration von 10 mg/ml. Sie wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Gewinnung von Rinderalveolarmakrophagen

Die Alveolarmakrophagen wurden post mortem durch bronchoalveoläre Lavage aus den Rinderlungen (Städt. Schlachthof Karlsruhe) gewonnen. Nach Überprüfen der Lunge auf Bluteintritt, mechanische Unversehrtheit und deutlich sichtbare Emphyse wurde die Lunge mit Hilfe eines Schlauches über die Trachea mit je 3mal 3 Liter isotonischer Kochsalzlösung gefüllt. Nach kräftigem Massieren der Lunge wurde die Lavageflüssigkeit abgezogen, durch sterilen Verbandmull (amicus-Verbandmull, VM 20 DIN, 61630, Michalik) und Nylongaze mit 100 µm Maschenweite (Seidengazefabrik Eckert, Waldkirch) filtriert und anschließend 10 min mit 250 g bei 4°C zentrifugiert (Hettich Rotixa IRP, Rotor Nr. 5096). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden das Zellpellet in kalter NaCl (0,9%) resuspendiert und gewaschen (10 min, 250 g). Geringe Mengen an Erythrozyten, die sich auf dem Makrophagenpellet befanden, wurden mit Hilfe einer Transferpipette vorsichtig ab gespült und zusammen mit dem Überstand verworfen. Das Pellet wurde in kalter NaCl (0,9%) aufgenommen und auf 2 Zentrifugenröhrchen (Greiner) verteilt. Für die weitere Reinigung der Makrophagen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt: 20 ml Zellsuspension wurden mit je 15 ml Ficoll-Paque (Pharmacia) vorsichtig unterschichtet und 20 min (250 g, 4°C) zentrifugiert. Die Alveolarmakrophagen reicherten sich dabei an der Grenzschicht zwischen NaCl und Ficoll-Paque an. Sie wurden mit einer Pipette abgezogen und mit kalter NaCl (0,9%) gewaschen (10 min, 250 g, 4°C). Das Pellet wurde in 40 ml Aussaatmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl und die Vitalität (siehe 2.2.5.) bestimmt. Pro Rinderlunge konnten bis zu 10^9 Makrophagen gewonnen werden, die Vitalität lag in der Regel über 90%. Bevor die Zellen ausplattiert wurden, wurden zweimal 1 ml, der auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellten Zellsuspension, in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 250 g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl Lysispuffer (Puffer RLT, siehe 2.5.1.) resuspendiert. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung (RNA-Isolierung) bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2 Kultur der RAM

Inkubation in Mikrotiterplatten

Für die Experimente zur Nitritbildung wurden 2×10^5 RAM/Vertiefung nach Isolierung in Mikrotiterplatten (Primaria 96 Vertiefungen, Falcon) ausgesät. Nach 2 h wurde das Medium gewechselt und 200 μ l Kulturmedium zugeführt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgezogen und Kulturmedium mit den jeweiligen Substanzen (Stimuli bzw. Inhibitoren) auf die Zellen pipettiert. Nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten im Brutschrank wurde ein Aliquot des Mediums für die Nitritbestimmung verwendet. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen bestimmt (siehe 2.2.5).

Inkubation in Makroplatten

Für die Experimente zur Charakterisierung der iNOS mRNA Expression wurden 3×10^6 RAM/Vertiefung nach Isolierung in Makroplatten (Makroplatten 6 Vertiefungen, Greiner) ausgesät. Nach 2 h wurde das Medium gewechselt und Kulturmedium zugeführt. In Abhängigkeit der Versuchsbedingungen wurden sofort oder nach 24 die jeweiligen Stimuli zugesetzt. Nach Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgezogen, in ein Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert (5 min, 250 g, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Untersuchung auf Freisetzung von Entzündungsmediatoren bei -20°C bzw. -80°C (für die PGE₂-Bestimmung) aufbewahrt. Die Zellen wurden mit Lysispuffer (Puffer RLT) lysiert. Das Lysat wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C bis zur RNA-Isolierung aufbewahrt.

Inkubation in Luftp Kulturschalen

Für die Experimente mit Gasexposition wurden 3×10^6 Zellen/well nach Isolierung in Luftp Kulturschalen (Transwell-clear™, Costar) ausgesät. Hierbei handelt es sich um Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen. In diese Vertiefungen sind Schälchen eingesetzt, deren Böden aus einer Polyestermembran mit 0,4 μ m Porenweite bestehen. Diese Membranen haben keinen Kontakt zu den Vertiefungen der Zellkulturplatten. Auf die Membran wurde 1 ml der Zellsuspension und 1 ml Aussaatmedium in die Vertiefung pipettiert. Nach 2 h wurde das

Medium gewechselt und Kulturmedium zugeführt. Hierfür wurden jeweils 1,5 ml Medium oben auf die Membran und weitere 2,5 ml unterhalb der Membran in die Vertiefung pipettiert. Bis zur Gasexposition (1 Tag nach Isolierung der Zellen) wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Inhibitoren (L-NMMA, Indomethacin bzw. C11AG) wurden 20 min vor Gasexposition zu den Zellen gegeben und waren auch während der Gasexposition im Medium enthalten. Hierfür wurde das Medium aller Zellen abgesaugt und 2 ml Kulturmedium mit bzw. ohne Inhibitoren zugefügt. Vor Beginn der Gasexposition wurde das Medium abgezogen und 1 ml RPMI 1640 ohne FKS (Aussaatmedium) unter die Membran pipettiert. Dieses Medium wird im Text als Unterstand bezeichnet. Der Unterstand wurde nach Gasexposition abgezogen und bis zur Untersuchung auf Freisetzung von Entzündungsmediatoren bei -20°C bzw. -80°C (für die PGE_2 -Bestimmung) gelagert. Nach der Gasexposition wurden die Zellen entweder über einen bestimmten Zeitraum stimuliert oder sie wurden mit $500\ \mu\text{l}$ Lysispuffer (Puffer RLT) für die Bestimmung der Expression der iNOS mRNA behandelt (siehe 2.5.). Für die Behandlung der Zellen nach der Gasexposition wurden diese mit 2 ml Kulturmedium (1 ml auf die Membran und 1 ml unter die Membran) mit den entsprechenden stimulierenden Agenzien inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurde das Medium abgezogen, in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 250 g, 4°C). Nach Überführen des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß, wurde es bis zur weiteren Verwendung bei -20°C bzw. -80°C gelagert. Zu den Zellen wurde in Abhängigkeit der jeweiligen Versuchsbedingungen entweder $500\ \mu\text{l}$ Lysispuffer (Puffer RLT) oder $500\ \mu\text{l}$ Lämmli-Puffer für die Herstellung von Ganzzell-extrakten gegeben. Die Zellen wurden vorsichtig lysiert und das Lysat bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

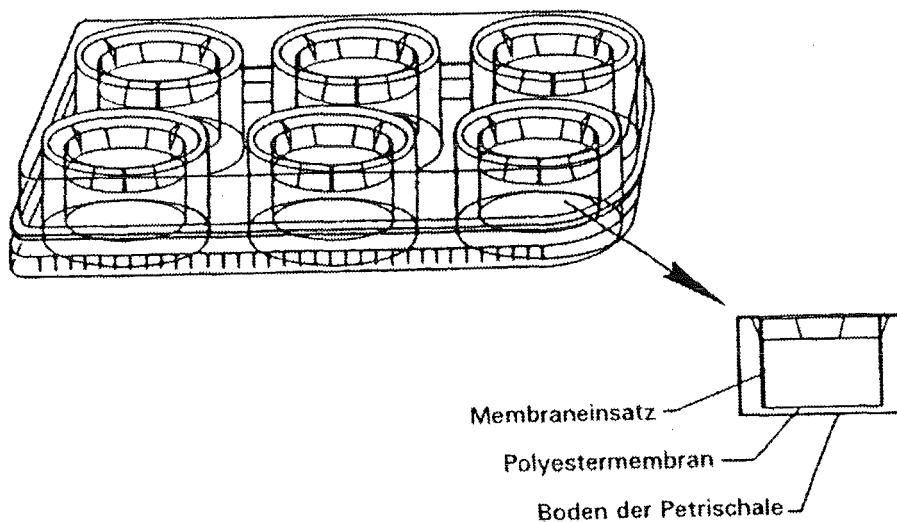


Abb. I: Petrischale für Gasphasenkultur

2.2.3 Kultur der Wehi-Zellen

Wehi-Zellen wachsen in Kultur als adhärenente Monolayer. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche kultiviert. Nach 3-4 Tagen, nachdem ein konfluent Monolayer ausgebildet war, wurden die Kulturen passagiert. Hierfür wurde das Medium abgezogen und zweimal mit je 5 ml einer 0,25%igen Trypsinlösung gewaschen. Beim zweiten Waschvorgang wurde ca. 1 ml dieser Lösung auf dem Zellrasen belassen. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in Kulturmedium aufgenommen und 10 min mit 250 g bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl und Vitalität wurden mit Hilfe der Trypanblau-Ausschluß-Methode (siehe 2.2.5.) bestimmt. Die Vitalität lag in jedem Fall über 95%. Für die neue Passage wurden 1x10⁶ Zellen mit 20 ml Kulturmedium in eine neue Kulturflasche überführt. Die Wehi-Zellen wurden maximal bis zur 17. Passage verwendet.

2.2.4 Kultur der RAW 264.7 Makrophagen

RAW 264.7 Makrophagen (*Macrophage, Abelson leukemia virus transformed, BALB/c, ATCC TIB 71*) sind eine Monozyten-Makrophagen Zelllinie der Maus. Sie wachsen in Kultur als adhärenente Monolayer und wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche kultiviert. In Abständen von 3-4 Tagen, nachdem ein konfluent Monolayer vorlag, wurden die Kulturen passagiert. Für die Passage wurde das Medium abgezogen und 5 ml frisches Medium zugeführt, so daß der Zellkulturflaschenboden mit Medium bedeckt war. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber (*Disposable Cell Scraper, Costar Kat. Nr. 3010*) vom Boden heruntergeschabt und mit 5 ml Medium in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt. Die folgende Zentrifugation wurde für 10 min bei 250 g durchgeführt. Das Sediment wurde in Kulturmedium aufgenommen, mit einem Aliquot der Zellsuspension wurde die Zellzahl und die Vitalität bestimmt (siehe 2.2.5.). Es wurde eine Zellzahl von 3,5x10⁶ Zellen/ml eingestellt und 1 ml davon mit 20 ml Kulturmedium in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Inkubation in Mikrotiterplatten

Für die Experimente zur Nitritbildung in RAW 264.7 Makrophagen wurden 1×10^5 RAW Makrophagen/Vertiefung in Mikrotiterplatten (Primaria 96 Vertiefungen, Falcon) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgezogen und Kulturmedium (200 μ l/Vertiefung) mit den jeweiligen Substanzen (Stimuli bzw. Inhibitoren) auf die Zellen pipettiert. Nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten im Brutschrank wurde ein Aliquot des Mediums für die Nitritbestimmung verwendet. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen bestimmt (siehe 2.2.5.).

Inkubation in Makroplatten

Für die Untersuchung zur iNOS Proteinbildung wurden 2×10^6 RAW Makrophagen/Vertiefung in Makroplatten (6 Vertiefungen, Greiner) ausgesät. Nach 4 h wurde das Medium gewechselt und 3 ml Kulturmedium, in Abhängigkeit der jeweiligen Inkubationszeiten mit LPS, zugeführt. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit heißem Probenpuffer (Laemmli-Puffer) lysiert und, wie unter 2.7.2. beschrieben, weiter behandelt.

Inkubation in Luftkulturschalen

Für die Experimente mit Gasexposition wurden 2×10^6 RAW Makrophagen/Vertiefung in Luftkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden im Brutschrank bis zum nächsten Tag in insgesamt 4 ml Kulturmedium (1,5 ml Medium oben auf der Membran und weitere 2,5 ml unterhalb der Membran) inkubiert. 20 min vor Beginn der Gasexposition wurden die Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren in insgesamt 2 ml Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgezogen und 1 ml DMEM ohne FKS, unter die Membran pipettiert. In diesem Medium (dem Unterstand) waren LPS und die jeweiligen Inhibitoren enthalten. Der Unterstand wurde nach Gasexposition abgezogen und bis zur Nitritbestimmung bei -20°C gelagert. Zu den Zellen wurde 500 μ l heißer Probenpuffer (Laemmli-Puffer) pipettiert und wie unter 2.7.2. beschrieben weiter behandelt.

2.2.5 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte nach der von Hanks und Wallace beschriebenen Trypanblau-Ausschluß-Methode (Hanks und Wallace, 1958). Trypanblau kann die Zellmembranen intakter Zellen nicht durchdringen und färbt daher nur tote Zellen blau an. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen einer 0,5%igen Trypanblaulösung (in 0,9% NaCl) gemischt. Ein Aliquot dieser Suspension wurde in eine Neubauerzählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop (Leitz Diaplan, Vergrößerung: 100fach) ausgezählt. Die Zahl der gefärbten und ungefärbten Zellen wurde bestimmt und die Vitalität berechnet.

MTT-Test

Zur Bestimmung der Vitalität von Zellen kultiviert in Mikrotiterplatten wurde der MTT-Test durchgeführt. MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid) wird von den Mitochondrien der noch lebenden Zellen durch eine succinat-abhängige Dehydrogenase in den blauen Farbstoff Formazan umgewandelt. Dieser wurde durch Lyse der Zellen mit einem Detergenz freigesetzt und photometrisch bei 550 nm bestimmt (*Microplate reader* ThermoMax, Molecular Devices). Für die Durchführung des Tests wurde das Medium der Mikrotiterplatte entfernt. Anschließend wurden 200 µl Kulturmedium und 20 µl einer MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) in jede Vertiefung pipettiert. Nach 2 h (4 h bei RAM) Inkubation im Brutschrank erhielt jede Vertiefung 60 µl einer SDS-Lösung (20% Natriumdodecylsulfat in 0,02 M HCl), die über Nacht die Lyse der Zellen bewirkte. Am nächsten Morgen wurde die Absorption der Platten im Mikrotiterplatten *Reader* bei 550 nm bestimmt. Je niedriger hierbei die gemessene Absorption war, desto weniger Formazan war von den Zellen gebildet worden, d.h. desto höher war die Zytotoxizität. Die Zytotoxizität wurde analog dem Wehi-Biotest (siehe 2.4.1.) berechnet.

2.3 Exposition der Zellen in Gasphase

Die Exposition der Zellen mit Gas wurde in Anlehnung an eine Methode von Voisin *et al.* (Voisin *et al.* 1977) in 2 speziell angefertigten Expositionskammern (Fa. Maton, Lille, Frankreich) durchgeführt. Diese Methode wurde in unserem Labor von Dr. Ines Lind (Lind, 1992) etabliert. Die Kultur der Zellen in Luftkulturschalen und die Gasexposition in der Voisin-Kammer ermöglichten annähernd physiologische Bedingungen, indem die Zellen direkten Kontakt mit dem Gas hatten.

Das Expositionssystem bestand aus einer Luftkammer, in der die Zellen mit synthetischer Luft, angereichert mit 5% CO₂, und einer NO₂-Kammer, in der die Zellen mit einer konstanten Konzentration an NO₂ [0,2 ppm] und 5% CO₂, inkubiert wurden. Zur Beschickung dieser Kammern mit den entsprechenden Gasgemischen wurde eine Gasmischanlage der Fa. Messer-Griesheim, Karlsruhe, eine Gasanlage verwendet.

Die Luftkammer war über einen Druckminderer und Durchflußmesser direkt mit der Gasflasche (synthetische Luft/5%CO₂) verbunden. Für die Begasung der NO₂-Kammer war eine Mischkugel, zur Anreicherung mit 5% CO₂, zwischengeschaltet. Der Druckminderer direkt an der Entnahmestelle senkte den schwankenden Vordruck des Leitungssystems auf 1 bar, und der Durchflußmesser gewährleistete einen konstanten Gasfluß von 0,5 l/min. Als Verbindungen wurden Silikonschläuche verwendet.

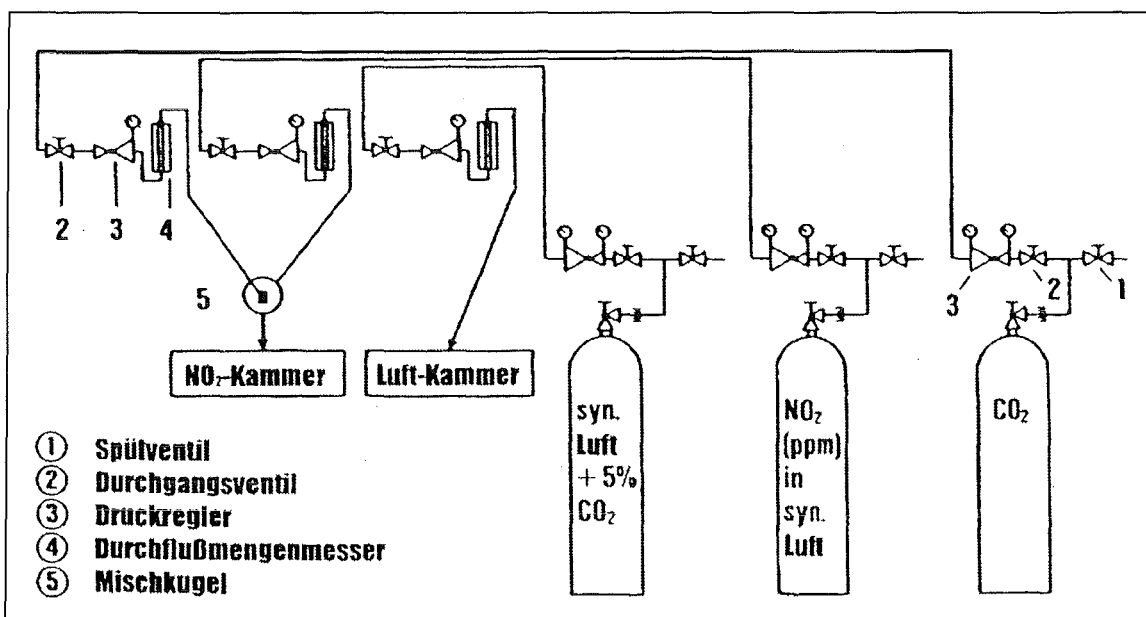


Abb. II: Begasungsanlage

Die Expositions-kammer bestand aus einer Außenkammer, die mit Wasser gefüllt war, das auf 37°C geheizt werden konnte. In diese Außenkammer war eine zweite Kammer eingesenkt, in der die eigentliche Gasexposition erfolgte. Diese Innenkammer besaß einen fest anschraubbaren Deckel, der bei der NO₂-Kammer, zur Verminderung von Gasverlusten durch Abreagieren an der Oberfläche, aus Teflon bestand. Vor einem Versuch wurden die Kammern eine Stunde erwärmt und begast. Dann wurde die Innenkammer mit Zellen beschickt und abgesenkt, so daß die Innenkammer mit Wasser umspült wurde. Auf der Oberseite der Innenkammer befand sich ein Ein- und Austrittsstutzen für das Gas, das durch das Seitenteil eines Lochblecheinsatzes in den eigentlichen Expositionsraum ein- und auf der gegenüberliegenden Seite wieder austrat, um dann über einen Teflonschlauch in die Außenluft zu gelangen. Der Boden des Innenkammereinsatzes diente als Standfläche für die Luftkulturschalen. Der Zwischenraum zwischen Boden der Innenkammer und Boden des Einsatzes wurde mit Wasser gefüllt, um eine genügend hohe Luftfeuchtigkeit für die Zellen zu gewähren.

Die NO₂-Konzentration des ein- und ausströmenden Gases wurde zu Beginn der Versuchsreihe freundlicherweise vom Institut für Meteorologie (IMK, Forschungszentrum Karlsruhe) mit einem NO_x-Analysator geprüft. Am Kammereingang wurde eine um 5% geringere Konzentration als die begaste NO₂-Konzentration gemessen. Am Kammerausgang wurden nach mehreren Meßreihen mit 2 bzw. 1-stündiger Vorbegasung NO₂-Konzentrationen zwischen 60 und 78 ppb gemessen.

Bestimmung der Vitalität nach Gasexposition

Zur Vitalitätsbestimmung wurde nach Gasexposition das Medium abgezogen und 1 ml einer mit NaCl (0,9%) 1:2 verdünnten Trypanblaulsg. (0,5% in NaCl) für 2 min auf die Zellen gegeben. Die Farblösung wurde abgezogen und die Zellen vorsichtig zweimal mit NaCl (0,9%) gewaschen. An vier zufällig gewählten Stellen wurden die gefärbten und ungefärbten Zellen unter dem Inversmikroskop (Leitz Fluovert, Vergrößerung: 100fach) ausgezählt und die Vitalität berechnet. Nach Gasexposition nahm die Vitalität um ca. 5% ab. Zwischen NO₂- und luft-begasten Proben konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

2.4 Untersuchungen zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren

2.4.1 Bestimmung von TNF- α

Der Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) wurde mit Hilfe eines Biotest bestimmt. Der Biotest basiert auf der zytotoxischen Wirkung von TNF- α auf Wehi-Zellen. Bei den Wehi-Zellen handelt es sich um eine TNF-sensitive Fibroblastenzelllinie der Maus. Der Subklon 164/13 wurde auf seine Sensitivität gegenüber TNF- α selektiert. Wir erhielten die Zellen freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Wendel, Institut für Biochemie und Pharmakologie der Universität Konstanz. In unserem Labor wurde der TNF-Biotest durch Matejka (1992) nach der Methode von Espevik und Nissen-Meyer (1986) eingeführt. Inkubation von Wehi-Zellen mit TNF-haltigem Medium führt auf Grund der zytotoxischen Wirkung des Zytokins zu einem Vitalitätsverlust, der in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear mit der TNF-Konzentration korreliert. Nach einer bestimmten Inkubationsdauer der Standardverdünnungen bzw. der zu untersuchenden Proben mit Wehi-Zellen, wurde MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid) zugesetzt, welches von den Mitochondrien der noch lebenden Zellen durch eine Succinat-abhängige Dehydrogenase in den blauen Farbstoff Formazan umgewandelt wurde. Dieser wurde durch Lyse der Zellen mit einem Detergenz freigesetzt und photometrisch bei 550 nm bestimmt (Mikrotiterplatten *Reader* Thermomax, Molecular Devices).

Für die Durchführung des TNF-Biotests wurden konfluente Wehi-Zellkulturen (siehe 2.2.3.) mit Trypsin behandelt und die Zellsuspension abzentrifugiert. Es wurde eine Zellzahl von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Aussaat der Zellen erfolgte in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, Primaria, Falcon) mit einer Dichte von 6×10^4 Zellen/Vertiefung (200 μ l). Anschließend wurden die Zellen, um wieder adhärent zu werden, für 5 h im Brutschrank inkubiert. Für die Bestimmung des TNF-Gehaltes wurde eine Standardreihe mit 9 verschiedenen Konzentrationen von rek. humanem (hr-) TNF- α hergestellt (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 1 pg/ml). Die Proben wurden ebenfalls seriell verdünnt (1:2, 1:4, 1:10, 1:40, 1:100), um hohe TNF- α -Konzentrationen, die nicht im linearen Bereich der Eichkurve (zwischen 1 und 50 pg/ml) lagen, durch eine Verdünnung zu erfassen. Die Verdünnungen von Standard und Proben erfolgte mit Wehi-Kulturmedium. Nach der Inkubation der Mikrotiterplatten wurden diese für 5 Minuten bei 250 g (Mikrotiterplattenrotor, Zentrifuge Hettich Rotixa) zentrifugiert und zur Entfernung des Mediums auf Zellstoff ausgeschlagen. Es

folgte die Zugabe der Standard- und Probenverdünnungen: die erste Reihe der Mikrotiterplatte wurde als Kontrollreihe geführt, sie enthielt pro Vertiefung 100 µl Kulturmedium. Die Kontrollreihe war das Maß für die maximale Farbstoffbildung bzw. Vitalität der Zellen. Die letzte Reihe der Mikrotiterplatte enthielt keine Zellen, in diese wurden 100 µl Medium pro Vertiefung pipettiert. Sie diente als Leerwert, dessen Mittelwert nach der photometrischen Messung von allen Werten abgezogen wurde. Jede Probe- bzw. Standardverdünnung wurde in einem vierfachen Ansatz vorgelegt, wobei pro Vertiefung 100 µl auf die Zellen pipettiert wurden. Anschließend wurde in alle Vertiefungen 1 µg Actinomycin D (100 µl) gegeben.

Nach 18 h Stunden Inkubation im Brutschrank wurden in jede Vertiefung 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺) pipettiert. Nach weiteren 4 h Inkubation im Brutschrank erhielt jede Vertiefung 60 µl SDS-Lösung (20% Natriumdodecylsulfat in 0,02 M HCl), die über Nacht zur Lyse der Zellen führte. Am nächsten Morgen wurde die Absorption im Mikrotiterplatten *Reader* bei 550 nm bestimmt. Je niedriger die gemessene Absorption ist, desto weniger Formazan wurde von den Zellen gebildet, d.h. desto höher war die Zytotoxizität bzw. der TNF-α-Gehalt der Proben. Die Zytotoxizität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{\text{Absorption Kontrolle} - \text{Absorption Probe}}{\text{Absorption Kontrolle}} \times 100$$

Zur Quantifizierung des TNF-α-Gehaltes wurde die Zytotoxizität der Standardverdünnungen in Abhängigkeit von der TNF-α-Konzentration aufgetragen. Über eine lineare Regression im Bereich zwischen 0 und 50 pg TNF-α/ml konnten die TNF-α-Gehalte der Proben berechnet werden.

2.4.2 Bestimmung von Superoxidanionen

Die Messung der Superoxidanionen erfolgte nach der Methode von Johnston (1981). In Übereinstimmung mit der allgemein üblichen Nomenklatur wird im Text das Superoxidanionenradikal als Superoxidanion bezeichnet. Das Meßprinzip beruht auf der reversiblen Reduktion von Cytochrom c. Cytochrom c besitzt ein zentrales Eisen (Fe)-Atom, das im reduzierten und oxidierten Zustand vorliegen kann. Das reduzierte Cytochrom c besitzt je eine alpha- und beta-Bande. Das Absorptionsmaximum der alpha-Bande liegt bei einer

Wellenlänge von 550 nm und kann spektralphotometrisch bestimmt werden. Die Oxidation von Cytochrom c führt zu einem Verschwinden der alpha-Bande. In der Reaktionslösung liegt das Cytochrom c im oxidierten Zustand vor. Werden in der Reaktionslösung Radikale, die das Cytochrom c reduzieren können, von den Zellen freigesetzt, so kann die Menge der sezernierten Radikale über die Messung der Absorption bei 550 nm und mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten berechnet werden. Die Reduktion von Cytochrom c ist keine spezifische Reaktion von Superoxidanionen. Die für den Test notwendige Spezifität wird durch den Zusatz von Superoxiddismutase (SOD) erlangt. Superoxidanionen sind das einzige bekannte Substrat für die SOD. Der Test wird mit und ohne SOD durchgeführt. Nur die durch SOD hemmbare Reduktion von Cytochrom c wird anschließend in die Berechnung miteinbezogen. Die Inkubationszeit der Reaktionslösung auf den Zellen betrug 90 min.

Die Reaktionslösung wurde mit HBSS (pH 7,4), Cytochrom c (80 μ M im Ansatz, Stammlsg.: 1,2 mM in HBSS) und den jeweiligen Stimuli, ops. Zymosan [1 mg/ml] bzw. LPS [10 μ g/ml], in einem Volumen von 1,5 ml hergestellt. Ein paralleler Ansatz wurde unter Zusatz von SOD (120 U/ml im Ansatz, Stammlsg.: 4400 U/ml in HBSS) angefertigt. 1,5 ml der Reaktionslösung wurden auf die Zellen pipettiert. Nach 90 min Inkubationszeit im Brutschrank wurde die Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt, abzentrifugiert (5 min, 250 g, RT) und anschließend die Absorption im Photometer (Beckmann, DU[®]-65 Spektrophotometer) bei 550 nm bestimmt.

2.4.3 Bestimmung von Nitrit

Der Nachweis von Nitrit erfolgte photometrisch mit Hilfe eines Farbreagens (Grießreagens) (Green *et al.*, 1982). Nitrit reagiert mit 4-Aminobenzolsulfonamid in Gegenwart von Orthophosphorsäure bei einem pH-Wert von 1,9 zu einem Diazoniumsalz, das mit dem gleichzeitig zugesetzten N-(1-Naphthyl)-1,2-diaminoethan-dihydrochlorid einen rosa Farbstoff bildet. Die Extinktion des Farbstoffes wurde bei 550 nm gemessen. Das Grießreagens setzte sich wie folgt zusammen: 1% 4-Aminobenzolsulfonamid, 2% Orthophosphorsäure, 0,1% N-(1-Naphthyl)-1,2-diaminoethan-Dihydrochlorid. Für die Ermittlung des Nitrit-Gehaltes der Proben wurde eine Eichgerade mit NaNO₂ (1-50 μ M) als Standard angefertigt. 100 μ l der zu untersuchenden Probe bzw. des Standards wurden je viermal mit 100 μ l Grießreagens in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 10 Minuten

Inkubation bei RT wurde die Absorption gegen H₂O im Mikrotiterplatten *Reader* bei 550 nm bestimmt. Über die Daten der Regressionsgeraden der Standardreihe wurden die Nitrit-Gehalte der Proben ermittelt (Computerprogramm: softmax™ MWG Biotech).

2.4.4 Bestimmung von PGE₂

PGE₂ wurde mittels ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) der Firmen Cayman Chemical (PGE₂ *Enzyme Immunoassay* Kit, Kat.Nr.514010) und R&D Systems (PGE₂ *Immunoassay*, Kat.Nr. DE0100) bestimmt. Beide ELISA beruhen auf einem ähnlichen Prinzip und wurden hinsichtlich der Datenvergleichbarkeit überprüft. Es handelt sich um kompetitive ELISA, d.h. PGE₂ konkurriert mit einem PGE₂-Acetylcholinesterase Konjugat bzw. mit einem PGE₂-alkalische Phosphatase Konjugat um die Bindung an eine limitierte Menge eines PGE₂ Monoklonalen Antikörpers. Der Antikörper-PGE₂-Komplex bindet an die Oberfläche der Mikrotiterplatte, welche mit einem Ziege-Anti-Maus Polyklonalen Antikörper beschichtet ist. Ungebundene Reagentien werden ausgewaschen und die Zugabe einer Substratlösung ermöglicht die Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität (Acetylcholinesterase bzw. alkalische Phosphatase). Das Produkt der enzymatischen Reaktion absorbiert bei 405 nm (bzw. mit Wellenlängenkorrektur zwischen 600 und 690 nm). Die Absorption ist proportional zu der gebundenen Menge an PGE₂-Konjugat und umgekehrt proportional zu der Menge an freiem PGE₂ in den Proben. Zur Bestimmung des PGE₂-Gehaltes der Proben wurde eine PGE₂ Eichgerade erstellt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines 4-Parameter-Kurven-Fit (Computerprogramm: Softmax™, Molecular Devices).

2.5 Untersuchungen zur Expression der iNOS mRNA

Die Expression der iNOS mRNA wurde mit Hilfe der RT (reverse Transkription)-PCR (*Polymerase chain reaction*, Saiki, 1985) bestimmt. Mit dieser Methode ist es möglich quantitative Aussagen über die Transkription einzelner Gene zu machen. In einem ersten Schritt wird die gesamte zelluläre RNA in eine cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Für diese Reaktion wurde die aus Retroviren stammende reverse Transkriptase eingesetzt. Im zweiten Schritt wird ein Teilfragment einer spezifischen cDNA durch die PCR amplifiziert. Dazu werden durch Hitzebehandlung die doppelsträngige cDNA denaturiert. Die entstandenen

Einzelstränge werden mit zwei kurzen sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die die gesuchte Sequenz einrahmen und als Starter (*Primer*) der DNA-Synthese während der PCR dienen, hybridisiert und durch eine DNA-Polymerase verlängert. Mehrfaches Wiederholen der Schritte Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese führt zu einer exponentiellen Vermehrung der Sequenz. Nach der Amplifikation wird das Reaktionsprodukt analysiert. Dies kann entweder über Hybridisierung mit spezifischen Sonden, über die Größe der gelelektrophoretisch aufgetrennten Fragmente oder über eine direkte Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgen. Eine Identifizierung des PCR-Produktes erfolgte in dieser Arbeit über Hybridisierung mit einer iNOS-spezifischen, DIG (Digoxigenin)-markierten Sonde.

Für die quantitative Bestimmung des iNOS-PCR-Produktes wurde in einem separaten Ansatz die mRNA der GAPDH ko-amplifiziert. Beide PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden mit einer Ethidiumbromid-Färbung und durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die optischen Dichten des iNOS-PCR-Produktes wurden in Relation zu den optischen Dichten des GAPDH-PCR-Produktes bestimmt. Diese Form der Bestimmung ist semi-quantitativ, d.h. es können keine Aussagen über die absoluten Mengen des PCR-Produktes und der zu Grunde liegenden mRNA, sondern nur relative Konzentrationsangaben gemacht werden.

2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die zelluläre RNA wurde Säulen-chromatographisch mit Hilfe des RNeasy™ Mini kit der Fa. Qiagen isoliert. Mit Hilfe des Kits können RNA Moleküle die länger als 200 Nukleotide sind erfaßt werden. Nach Einstellen der notwendigen Konditionen bindet RNA an die Matrix der Säulen. Nach 3 Waschschritten kann die RNA mit H₂O eluiert werden.

Zu 1 ml Lysispuffer RLT wurde 10 µl β-Mercaptoethanol pipettiert. Der Waschpuffer RPE wurde mit 4 Volumen Ethanol verdünnt. Die Zellen wurden mit 500 µl Lysispuffer RLT lysiert. Zu dem Lysat wurden 500 µl 70% Ethanol pipettiert. Das Lysat wurde gut durchmischt und in 2 Schritten (jeweils 500 µl) auf eine RNeasy Säule pipettiert und für 15 sec bei 8000 g (Eppendorf-Zentrifuge 5471-R) abzentrifugiert. Der Unterstand wurde verworfen. Die Säule wurde anschließend einmal mit 700 µl Puffer RW1 und zweimal mit je 500 µl Puffer RPE gewaschen. Nach dem letzten Waschschriff wurde die Säule, zur Entfernung von

restlichem Ethanol, 2 min mit 14000 g zentrifugiert. Die RNA wurde mit zweimal 50 μl H_2O eluiert.

Der RNA-Gehalt wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung des RNA-Gehaltes von RAM wurde die RNA, ausgehend von unterschiedlichen Zellzahlen (1×10^6 , 5×10^6 und 1×10^7 Zellen), isoliert und deren Gehalt photometrisch bestimmt. Die Menge an RNA korrelierte dabei linear mit der Zellzahl. Bei 1×10^6 Zellen wurden ca. 2 μg RNA isoliert werden.

2.5.2 RT-PCR

reverse Transkription

Für die Synthese der cDNA wurde der RNA-Gehalt der Probe auf 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. 2 μl dieser Probe wurden in eisgekühlten PCR-Gefäßen (PCR-Tubes, Fa. Biozym und Fa. Roth) vorgelegt. 48 μl einer eiskalten Reaktionsmischung mit folgender Zusammensetzung wurden auf die RNA-Probe pipettiert:

Reaktionsmischung RT:

- 5 μl PCR-Puffer (10fach)
- 10 μl dNTP (5 mM, Pharmacia Kat.Nr.27-2035-01)
- 1,25 μl RNAsin (40 U/ μl , Serva Kat.Nr. N2511)
- 2,5 μl Random Hexamer (100 pmol/ μl , pd(N)₆rand, Pharmacia Kat.Nr.27-2166-01)
- 27,75 μl dH₂O (Sigma Kat.Nr. W4502)
- 1,5 μl M-MLV RT (200 U/ μl , Gibco Kat.Nr.28025-013)

Nach Zugabe der Reaktionsmischung wurden die PCR-Gefäße mit einem Deckel verschlossen und sofort in den Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc.) gestellt. Die Synthese erfolgte für 60 Minuten bei 39°C, anschließendes Erhitzen für 3 Minuten auf 94°C führt zur Denaturierung des Enzyms M-MLV RT. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf 4°C gekühlt.

PCR-Puffer:

Der PCR-Puffer wurde als 10fach-Konzentrat selbst hergestellt, die Einzelkomponenten autoklaviert bzw. sterilfiltriert (BSA-Lsg.). Zu 960 μl einer 1 M Tris-Base (Sigma Kat.Nr. T8524) wurden 40 μl einer 1 M Tris-HCL (Sigma Kat.Nr. T7149) Lösung pipettiert. Dabei stellt sich ein pH-Wert von 9,3 ein. Zu 800 μl dieses Tris-Mix werden gegeben:

4000	μl	1 M KCl (Sigma Kat.Nr.P9541)
240	μl	1 M MgCl_2 (Sigma Kat.Nr.1028)
800	μl	10 mg/ml BSA (ICN Kat.Nr.105033)
2160	μl	dH ₂ O (Sigma Kat.Nr.W4502)

Alle Reagentien sind *ultrapure* bzw. *molecular biology grade*. Die Komponenten wurden gemischt und in 100 μl Aliquots bei -80°C gelagert

Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation der spezifischen cDNA Sequenzen wurden 2 μl Aliquot der cDNA aus der RT-Reaktion in eisgekühlten PCR-Gefäßen vorgelegt. Anschließend wurden 48 μl einer eiskalten Reaktionsmischung mit folgender Zusammensetzung dazu pipettiert.

Reaktionsmischung PCR:

5	μl	PCR-Puffer (10fach)
0,5	μl	dNTP (5 mM)
2,0	μl	Primer-Mix (5 μM)
40,25	μl	dH ₂ O
0,25	μl	Taq (5 U/ μl , Taq DNA Polymerase, Life Technologies Kat.Nr.18038-042)

Die Reaktion wurde mit 94°C bzw. 92°C (1 min) gestartet um die DNA zu denaturieren. Die Hybridisierung der *Primer* mit der Zielsequenz erfolgte bei 56°C für 1 min und die Extension bei 72°C (2 min). Diese Abfolge wurde in insgesamt 30 Zyklen wiederholt. Abschließend wurde für 5 min die Temperatur von 72°C gehalten und danach bis zur Entnahme der Proben auf 4°C gekühlt.

Die Auswahl der iNOS- und hGAPDH *Primer*-Sequenz wurde von Adler *et al.* (1995) übernommen: *bovine* iNOS 354 Basenpaarfragment, *human* GAPDH 372 Basenpaarfragment. Die *Primer* wurden von der Firma Eurobio mit einer Länge von 20 Basenpaare hergestellt. Es wurden 10 μ M Lösungen hergestellt, aus denen *sense* und *antisense Primer* 1:2 verdünnt wurden (*Primer-Mix*, 5 μ M).

<i>Bovine</i> iNOS <i>Primer</i> :	<i>Sense</i>	5'-TAGAGGAACATCTGGCCAGG-3'
	<i>antisense</i>	5'-TGGCAGGGTCCCCTCTGATG-3'
<i>Human</i> GAPDH <i>Primer</i> :	<i>Sense</i>	5'-GAGATGATGACCCTTTTGGC-3'
	<i>antisense</i>	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'

2.5.3 Quantifizierung des PCR-Produktes

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Agarosegel (Life Technologies Kat.Nr.15510-027) mit 100 ml 1xTBE-Puffer (Life Technologies, 10xTBE Kat.Nr. 15581-036) und 5 μ l Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) gegossen. Das erkaltete Gel wurde in eine Elektrophorese-Apparatur (Model H5, Life Technologies Kat.Nr.21087-119) gestellt und die Kammer mit 1xTBE Puffer aufgefüllt. 20 μ l des PCR-Produktes wurden mit 4 μ l Ladepuffer (*loading buffer*: 80% v/v Glycerin (Sigma Kat.Nr.G5516) in 1xTBE-Puffer plus 0,4% Bromphenolblau) versetzt. Davon wurden je 12 μ l des iNOS-PCR-Produktes und je 24 μ l des GAPDH-PCR-Produktes in die Geltaschen pipettiert. Die Anlage wurde an der Spannungsquelle (*Electrophoresis power supply* EPS 200, Pharmacia Kat.Nr.19-0200-02) mit 120 V in Betrieb genommen. Nach 45 Minuten Laufzeit wurde die Gelelektrophorese abgestoppt. Die DNA-Banden wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Videokamera (DocuGel V, MWG Biotech) digital aufgenommen. Die optischen Dichten wurden mittels eines Computerprogramms ausgewertet (OneDScan, MWG Biotech).

2.6 Bestimmung der Identität des iNOS-PCR-Produktes

2.6.1 Markierung der Oligonukleotid-Sonde mit DIG

Für die Identifizierung wurde das iNOS-PCR-Produkt mit einer DIG-markierten iNOS-Sonde hybridisiert. Mit DIG (*DIG DNA Labeling Kit*, Fa. Boehringer Mannheim), einem Steroid-

happen, können Nucleinsäuren nicht-radioaktiv markiert werden. Das Prinzip dieser Nucleinsäuremarkierung beruht auf dem zufallsbedingtem Einbau von DIG-markiertem Desoxyuridintriphosphat (dUTP) durch Neusynthese des kompletären Nucleinsäurestranges. Die Synthese wird durch das große Fragment der Polymerase 1 (Klenow-Enzym) katalysiert. Die markierten Sonden werden zur Hybridisierung eingesetzt und können anschließend über eine Antikörper gekoppelte Enzymreaktion, in deren Verlauf ein chemilumineszierendes Produkt entsteht, nachgewiesen werden. Als Sonde wurde eine 128 Basenpaar umfassende Sequenz der Rind-iNOS-Sequenz (*Accession Nr:* U14640) eingesetzt. Von dieser Sequenz wurde eine 50 µmolare (50 pmol/µl entsprechend 2 µg/µl) Lösung in dH₂O angefertigt. Für die Markierungsreaktion wurden 2 µg dieser Sonde eingesetzt. Dazu wurde die Sonde zunächst durch 10 min Erhitzen in einem kochenden Wasserbad und rascher Abkühlung auf Eiswasser (1 min) denaturiert (Endvolumen 15 µl). Anschließend wurden auf Eis folgende Reagenzien zugegeben: 2 µl Hexanukleotidmix, 2 µl dNTP-Markierungsmix und 1 µl Klenow-Enzym. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde am nächsten Tag mit 2 µl EDTA (0,2 M) abgestoppt und die markierte DNA mit den folgenden Agenzien gefällt: 2,5 µl LiCl (4 M), 1,5 µl Glykogen (20 mg/ml) und 75 µl Ethanol. Die Fällung wurde 1 h bei -80°C durchgeführt. Anschließend wurde für 15 min bei 12000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand, indem sich nicht eingebaute Nucleotide und nicht eingebautes DIG-UTP befindet, wurde verworfen. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl TE aufgenommen. Die Markierungseffizienz wurde anhand einer DIG-markierten Kontroll-DNA (Standard) bestimmt. Von dem Standard und der markierten Probe wurde je eine Verdünnungsreihe angefertigt. 1 µl von jeder Konzentration wurde auf eine Nylonmembran aufgetragen und entsprechend dem Detektionsprotokoll (siehe 2.6.3.) nachgewiesen. Die Konzentration der markierten DNA-Sonde wurde durch Vergleich der Filmschwärzung mit der DIG-markierten Kontroll-DNA bestimmt. Die Markierungseffizienz für die iNOS-Sonde betrug 500 pg/µl.

iNOS Sonde (128 Basenpaare):

CCA-GCT-GAC-GGG-AGA-TGA-GCT-CAT-CTT-CGC-CAC-CAA-GCA-GGC-CTG-
GCG-CAA-CGC-CCC-CCG-CTG-CAT-CGG-AAG-GAT-CCA-GTG-GTC-GAA-CCT-
GCA-GGT-CTT-TGA-CGC-CCG-GAG-CTG-TTC-CAC-GGC-CCA-GG

2.6.2 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden PCR-Produkte mittels Southern-Blot vom Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Der Transfer der DNA wurde über Nacht durchgeführt, wobei 0,4 N NaOH als Fließmittel diente. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran thermisch fixiert (30 min, 120°C). Die Hybridisierung wurde in einem Ofen der Fa. Biometra in einer Glasröhre durchgeführt. Die Nylonmembran wurde zwischen 2 Nylonnetze gelegt, mit DIG-EASY Hyb-Lösung angefeuchtet, zusammengerollt und in eine Glasröhre gesteckt. Die Prähybridisierung wurde mit insgesamt 12 ml DIG-EASY Hyb-Lösung (fertige Hybridisierungslösung der Fa. Boehringer Mannheim) für 5 h bei 50°C durchgeführt. Für die eigentliche Hybridisierung wurde das Volumen der Hybridisierungslösung auf 3,5 ml reduziert und anschließend die markierte, denaturierte iNOS-Sonde zugegeben. Die Konzentration der Gensonde in der Hybridisierungslösung betrug 7 ng/ml. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 50°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgossen und die Nylonmembran folgendermaßen gewaschen: zweimal 5 min mit Waschlösung 1 (2x SSC, 0,1% SDS) bei Raumtemperatur und zweimal 15 min mit Waschlösung 2 bei 60°C (0,5x SSC, 0,1% SDS). Die Waschvorgänge wurden mit 50 ml Waschlösung in den Glasröhren im Hybridisierungsöfen durchgeführt.

Die hierzu benötigte SSC-Lösung wurde als 10x-Konzentrat mit DMPC-H₂O (dimethylpyrocarbonat-behandeltes H₂O) hergestellt:

10x SSC: 1,5 M NaCl
 150 mM NaCitrat
 pH 7,0

2.6.3 Detektion mit Anti-DIG-Antikörpern

Der Nachweis einer erfolgreichen Hybridisierung des iNOS-PCR-Produktes mit der markierten iNOS-spezifischen Sequenz wurde mit Anti-DIG-Antikörpern (*DIG Luminescent Detection Kit*, Fa. Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die Nylonmembran wurde im Hybridisierungsöfen für 5 min mit 50 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran aus der Glasröhre herausgenommen, in eine Wanne überführt und 30 min mit 50 ml 1%iger Blocklösung auf einem Taumelgerät äquilibriert. Dann wurden 5 µl Anti-DIG-Antikörper zu der Blocklösung pipettiert und weitere 30 min inkubiert. Es folgten

2 Waschschritte mit je 50 ml Waschpuffer für je 15 min. Anschließend wurde die Membran für 5 min mit 50 ml Detektionspuffer äquilibriert. Die Membran wurde gut abgetropft, auf Einschweißfolie gelegt und mit der Substratlösung (1:100 CDP-Star) beträufelt. Nach Verschweißen der Folie wurde direkt die Autoradiographie durchgeführt.

Hierzu benötigte Lösungen:

Stammlösungen: 1 M Maleinsäure, 3 M NaCl, 1 M Tris-Base, Tween 20

Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,5

Waschpuffer: Maleinsäurepuffer
0,3% Tween 20

1%ige Blocklösung: Maleinsäurepuffer
1% Blockreagenz

Detektionspuffer: 0,1 M Tris-Base
0,1 M NaCl
pH 9,5

2.6.4 Autoradiographie

Die Autoradiographie wurde mit einem Hyperfilm MP der Fa. Amersham durchgeführt. Das Produkt der Enzymreaktion mit CDP-Star zeigte nach 0,5-5 min ein deutliches Signal.

Die Entwickler- und Fixierlösungen wurden von der Fa. Siemens, Medizintechnik, bezogen.

2.7 Nachweis des iNOS-Proteins in RAW 264.7 Makrophagen

2.7.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem BIO-Rad-Protein Test (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Messung beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung des Farbstoffes an Protein. Als Eichstandard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

2.7.2 Herstellung von Ganzzellextrakten

RAW-Makrophagen wurden nach den entsprechenden Inkubationszeiten mit heißem Probenpuffer (Laemmli-Puffer: 160 mM TrisHCl (pH 6,8), 4% SDS, 22,8% Glycerin, 4%β-Mercaptoethanol, 0,08% Bromphenolblau) lysiert. Diese Extrakte wurden für dreimal 5 Sekunden beschallt (Branson W-250, Einstellung: *output control 1, duty cycle 60%*), um die DNA zu zerkleinern und konnten dann bei -20°C aufbewahrt werden.

2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die Trennung von Proteinen erfolgte durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Zur Trennung wurde ein 5%iges Sammelgel und ein 7,5%iges Trenngel verwendet. Hierfür wurden folgende Lösungen benötigt: 30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid (rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe); 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8); 20% SDS. Diese Lösungen wurden für je 20 ml Sammelgel bzw. Trenngel gemäß folgender Tabelle gemischt:

	<u>Bestandteile im</u>			
	<u>Sammelgel</u>		<u>Trenngel</u>	
	<u>Geldichte</u>			
	5%		7,5%	
rotiphorese Gel 30	3,4	ml	5	ml
0,5 M TrisHCl (pH 6,8)	5	ml	-	
1,5 M TrisHCl (pH 8,8)	-		5	ml
20% SDS	0,1	ml	0,1	ml
H ₂ O dest.	11,15	ml	9,57	ml
10% APS	0,2	ml	0,2	ml
TEMED	0,15	ml	0,03	ml

Die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) zur Gellösung erfolgte erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels. Nach Gießen des Trenngels in die vertikale Apparatur (Sigma) wurde die Oberfläche mit Isopropanol überschichtet und nach der Polymerisierung das Sammelgel zugegeben.

Der 10x-konzentrierte Laufpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1% SDS; pH 8,3. Unmittelbar vor der Beladung des Gels wurden die Proben für 5 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In die Geltaschen wurde ein Probenvolumen von 50 µl aufgetragen. Die Elektrophorese lief über Nacht bei einer konstanten Spannung zwischen 100 und 150 Volt. Als Kontrolle für das Auftragen konstanter Proteinmengen wurde das Gel nach dem Lauf mit einer Coomassie Färbelösung (0,2% SERVA Blau R in 50% Methanol; 7,5% Eisessig; Entfärbung in 50% Methanol; 7,5% Eisessig) nach Anleitung gefärbt.

2.7.4 Immunzytochemischer Nachweis des iNOS-Proteins

Nach dem Lauf wurden die Proteine aus dem Gel in einer Wet-Blotting Apparatur (Sigma) auf eine PVDF Membran (0,45 µM Porengröße, Millipore) übertragen. Vor der Verwendung wurde die Membran kurz in Methanol getränkt und dann mit Blotpuffer (25 µM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol) gespült. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran dauerte 4 h bei 350 mA und wurde im Kühlraum unter ständigem Rühren des Blotpuffers durchgeführt. Nach der Übertragung der Proteine wurde die Membran mit 10%iger

Trockenmilch in PBS mit 0,3% Tween 20 (PBS/T) für 15 min zur Absättigung unspezifischer Bindungen geblockt. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS/T gewaschen und mit dem primären Antikörper (1:2000 verdünnt, anti-iNOS Kaninchen, Biomol, Hamburg) in 5%iger Trockenmilch in PBS/T für 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit PBS/T 10 min gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, Amersham, Braunschweig) erfolgte in Verdünnung von 1:3000 in 5%iger Trockenmilch in PBS/T für weitere 60 min. Nach abschließendem Waschen der Membran, wurde der Nachweis der Proteine mit dem ECL-System (*enhanced chemoluminescence*, Amersham) durchgeführt. Hierfür wurden die Nachweislösungen nach Anleitung 1:2 gemischt und die Membran für 1 min damit benetzt. Auf die in Frischhaltefolie eingepackte Membran wurde schließlich ein spezieller Film (ECL-Hyperfilm, Amersham) aufgelegt und nach unterschiedlichen Filmexpositionszeiten die Autoradiographie durchgeführt.

2.8 Bezugsquellen

Actinomycin D	Sigma (Deisenhofen)
4-Aminobenzolsulfonamid	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Cytochrom c aus Pferde-Herzen	Sigma (Deisenhofen)
DMEM	Sigma (Deisenhofen)
DMPC	Sigma (Deisenhofen)
EDTA	Serva (Heidelberg)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
fötales Kälberserum	Bio Whittaker (Belgien)
H ₃ PO ₄	Merck (Darmstadt)
HBSS	Sigma (Deisenhofen)
Indomethacin	Sigma (Deisenhofen)
L-Glutamin	Life Technologies (Eggenstein)
L-NMMA	Alexis (Grünberg)

Lipopolysaccharid von <i>Salmonella abortus equi</i>	Sigma (Deisenhofen)
Maleinsäure	Roth (Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen)
MTT	Serva (Heidelberg)
N-(1-Naphthyl)-1,2-Diaminoethan-Dihydrochlorid	Sigma (Deisenhofen)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumnitrit	Merck (Darmstadt)
PBS	Life Technologies (Eggenstein)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies (Eggenstein)
PGE ₂	Calbiochem (Bad Soden)
rek. <i>human</i> TNF- α	Boehringer (Mannheim)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen)
RPMI 1640	Sigma (Deisenhofen)
SDS	Roth (Karlsruhe)
SIN-1	Alexis (Grünberg)
SNP	Alexis (Grünberg)
SOD aus Rinder-Erythrozyten	Sigma (Deisenhofen)
Stickstoffdioxid [0,2 ppm]	Messer Griesheim (Karlsruhe)
Synthetische Luft mit 5% CO ₂	Messer Griesheim (Karlsruhe)
TEMED	Sigma (Deisenhofen)
Tris-Base	Sigma (Deisenhofen)
Tris-HCl	Sigma (Deisenhofen)
Trypanblau	Serva (Heidelberg)
Trypsin	Life Technologies (Eggenstein)
Tween-20	Roth (Karlsruhe)
Zymosan von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma (Deisenhofen)

C11AG wurde freundlicherweise von Dr. Amtmann (DKFZ, Heidelberg) und rek. *bovines* IFN- γ von Dr. Steiger (CIBA GEIGY, Basel) zur Verfügung gestellt.

2.9 Datenauswertung

Die Auswertung der Daten zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und zur Nitritbildung erfolgte mit dem Computerprogramm softmaxTM (Molecular devices). In den Abbildungen wurden die Meßdaten als arithmetische Mittelwerte dargestellt. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

Eine statistische Signifikanzanalyse des Unterschiedes zweier Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Testes nach Student durchgeführt (Ehrenberg, 1986). Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde dann angenommen, wenn $p < 0.05$ war.

Die zur Expression der iNOS mRNA gewonnenen Meßergebnisse wurden in den Abbildungen als Intensität der optischen Dichte (IntOD) dargestellt. Diese wurden mit Hilfe des Computerprogramm OneDScan (MWG Biotech) berechnet.

3 Ergebnisse

Alveolarmakrophagen spielen eine zentrale Rolle im pulmonalen Abwehrsystem. Gewährleistet wird diese Funktion u.a. durch die Sekretion von Entzündungsmediatoren. Hierzu zählt die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$, PGE_2 , Superoxidanionen und NO. Zur Untersuchung der Wirkung von NO_2 [0,2 ppm] wurde die Sekretion dieser Mediatoren nach Gasexposition isolierter Makrophagen der Rinderlunge bestimmt. Diese Ergebnisse werden in den folgenden Abbildungen dargestellt. Nach Kulturnahme der RAM wurden Unterschiede im Grad der Aktivierung der Zellen gemessen. Das heißt einige Zellpopulationen wiesen ohne zusätzliche Stimulierung bereits eine Freisetzung an Mediatoren auf. Diese Zellen werden als „primäraktiviert“ bezeichnet. Ihre Reaktion auf das Schadgas NO_2 wurde getrennt von den Zellen ohne Primäraktivierung dargestellt. Auf die Gründe dieser Aktivierung wird in der Diskussion eingegangen.

Für die Experimente mit Gasexposition wurden die Zellen in Luftkulturschalen ausgesät (siehe 2.2.2.). Die Exposition der Zellen mit Gas wurde in Anlehnung an eine Methode von Voisin *et al.* (1977) in 2 Expositionskammern durchgeführt (siehe 2.3.).

Die Vitalität der Zellen wurde direkt nach Gasexposition bzw. nach anschließender Stimulierung mit Hilfe einer Trypanblaufärbung (siehe 2.2.5.) bestimmt. Zwischen luft- und NO_2 -exponierten Zellen konnten nach Gasexposition und nach Stimulierung keine Unterschiede festgestellt werden.

3.1 Wirkung von NO₂ auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren

3.1.1 TNF- α -Sekretion

TNF- α zählt wie Il-1 und Il-6 zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine. Diese Zytokine haben zum Teil überlappende Wirkungen und können sowohl die eigene Bildung als auch die Bildung anderer Mediatoren induzieren.

In RAM führt LPS zur Sekretion von TNF- α , wobei das Maximum der TNF- α mRNA Expression nach 3 h und das der Ausschüttung von TNF- α zwischen 5-8 h erreicht ist (Bienhoff *et al.*, 1995). Der Zeitverlauf der TNF- α -Sekretion wurde nach 1- und 2-stündiger Gasexposition gemessen. Die Quantifizierung des TNF- α -Gehaltes in den Kulturüberständen der RAM erfolgte mit einem Biotest (siehe 2.4.1.). Als Stimulus diente LPS in einer Konzentration von 1 μ g/ml. Abb. 1 zeigt die TNF- α -Sekretion nach 1-stündiger Begasung und anschließender Behandlung mit LPS bzw. Medium als Kontrolle. Während des untersuchten Zeitraumes (2-24 h) stellte sich eine maximale TNF- α -Sekretion zwischen 4 und 6 h ein. Dieser Wert nahm nach 24 h ab, war aber noch deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht. Nach 1-stündiger Gasexposition konnten keine Unterschiede zwischen luft- und NO₂-begasteten Zellen gemessen werden.

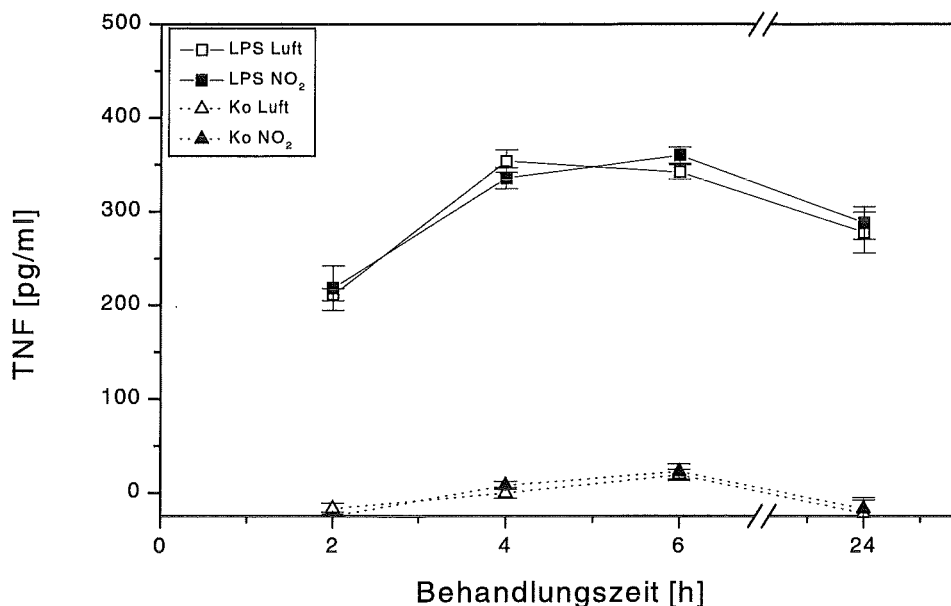


Abb. 1: Zeitverlauf der TNF- α -Sekretion nach 1-stündiger Gasexposition. RAM wurden für 1 h mit Luft bzw. NO₂ begast, bevor sie mit LPS [1 μ g/ml] oder Medium (Ko) für unterschiedliche Zeiten behandelt wurden. Der Gehalt an TNF- α [pg/ml] wurde in den Kulturüberständen bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 Versuchen.

In Abb. 2 ist der Zeitverlauf nach 2-stündiger Begasung dargestellt. Die längere NO₂-Exposition und anschließende Behandlung mit LPS führte im Vergleich zur Luftbegasung nach 2 und 4 h zu einer erhöhten Freisetzung von TNF- α . Die Kontrollen von luft- und NO₂-exponierten Zellen unterschieden sich nicht, d.h. ohne zusätzliche Stimulierung hatte eine NO₂-Exposition keinen Einfluß auf die TNF- α -Sekretion.

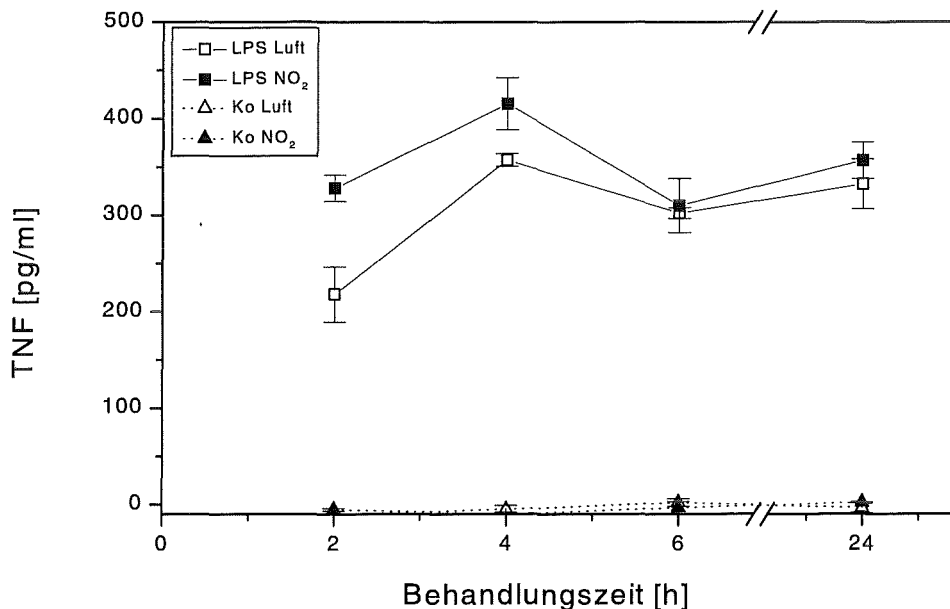


Abb. 2: Zeitverlauf der TNF- α -Sekretion nach 2-stündiger Gasexposition. RAM wurden für 2 h mit Luft bzw. NO₂ begast, bevor sie mit LPS [1 μ g/ml] oder Medium (Ko) für unterschiedliche Zeiten behandelt wurden. Der Gehalt an TNF- α [pg/ml] wurde in den Kulturüberständen bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 Versuchen.

3.1.2 PGE₂-Sekretion

PGE₂ wirkt modulierend auf eine Immunantwort. Neben dieser Funktion erfüllt es in den Atemwegen eine weitere wichtige Aufgabe: PGE₂ verursacht eine Bronchodilatation.

Der Einfluß von NO₂ auf die PGE₂-Freisetzung wurde nach 2-stündiger Gasexposition und anschließender Behandlung mit LPS bzw. IFN γ untersucht. Die PGE₂-Konzentration wurde direkt nach Begasung im Unterstand und im Kulturüberstand nach 5-stündiger Stimulierung bestimmt. Der Unterstand ist das Medium, welches sich während der Gasexposition unter den Zellen befand. Nach Gasexposition konnte in diesem Medium kein PGE₂ nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine 5-stündige Behandlung mit LPS bzw. IFN γ induzierte die Sekretion von PGE₂. In den NO₂-exponierten Zellen war der Gehalt an PGE₂ deutlich gegenüber den luft-exponierten RAM erhöht (Abb. 3,4). In einigen Experimenten wurde auch

ohne zusätzliche Stimulierung ein erhöhter PGE₂-Gehalt nach NO₂-Begasung und Behandlung mit Medium gemessen, sichtbar in Abb. 3.

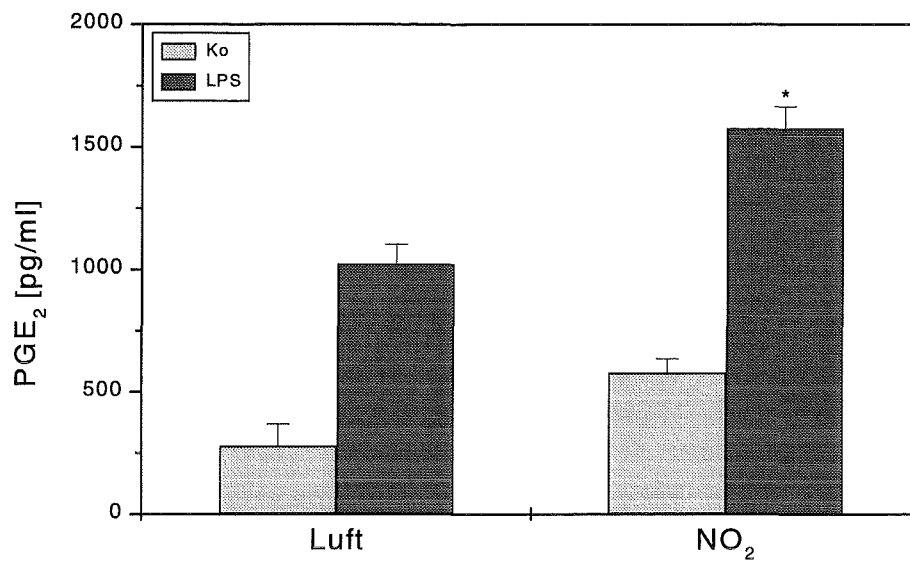


Abb. 3: Die PGE₂-Sekretion nach 2-stündiger Gasexposition und anschließender Stimulierung mit LPS. RAM wurden für 2 h mit Luft bzw. NO₂ begast, bevor sie mit LPS [1 μg/ml] oder Medium (Ko) für 5 h behandelt wurden. Der Gehalt an PGE₂ [pg/ml] wurde in den Kulturüberständen bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte ±Standardfehler von 3 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von LPS (luft-begast) für $p < 0.05$

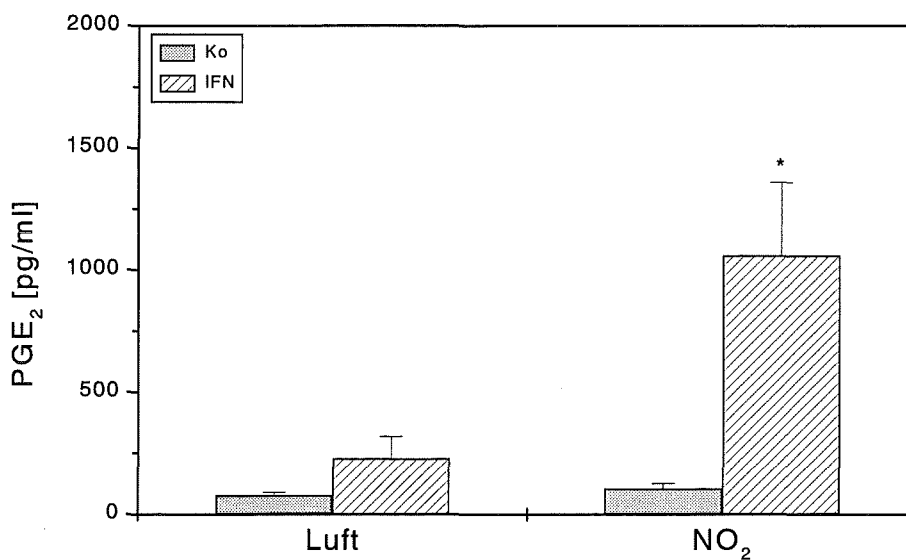


Abb. 4: Die PGE₂-Sekretion nach 2-stündiger Gasexposition und anschließender Stimulierung mit IFN γ . RAM wurden für 2 h mit Luft bzw. NO₂ begast, bevor sie mit IFN γ [50 U/ml] oder Medium (Ko) für 5 h behandelt wurden. Der Gehalt an PGE₂ [pg/ml] wurde in den Kulturüberständen bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte ±Standardfehler von 3 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von IFN γ (luft-begast) für $p < 0.05$

Primäraktivierte RAM

RAM mit Primäraktivierung bezüglich der PGE₂-Synthese reagierten auf die NO₂-Exposition mit einer verminderten Freisetzung an PGE₂ im Vergleich zur luft-behandelten Kontrolle (Abb. 5). Nach 2-stündiger Begasung und anschließender 5-stündiger Behandlung mit Medium wurde im Kulturüberstand der luft-begasten RAM ein erhöhter PGE₂-Gehalt gegenüber den NO₂-begasten Zellen gemessen. Die Stimulierung mit LPS führte zu keiner zusätzlichen Freisetzung an PGE₂ in den primäraktivierten RAM sowohl nach Luft- als auch NO₂-Exposition. Im Gegensatz dazu erhöhte eine Behandlung mit IFN γ den PGE₂-Gehalt in den Kulturüberständen der bereits aktivierten Zellen nach Luft-Begasung. Diese Erhöhung konnte in den NO₂-begasten primäraktivierten RAM nicht gemessen werden.

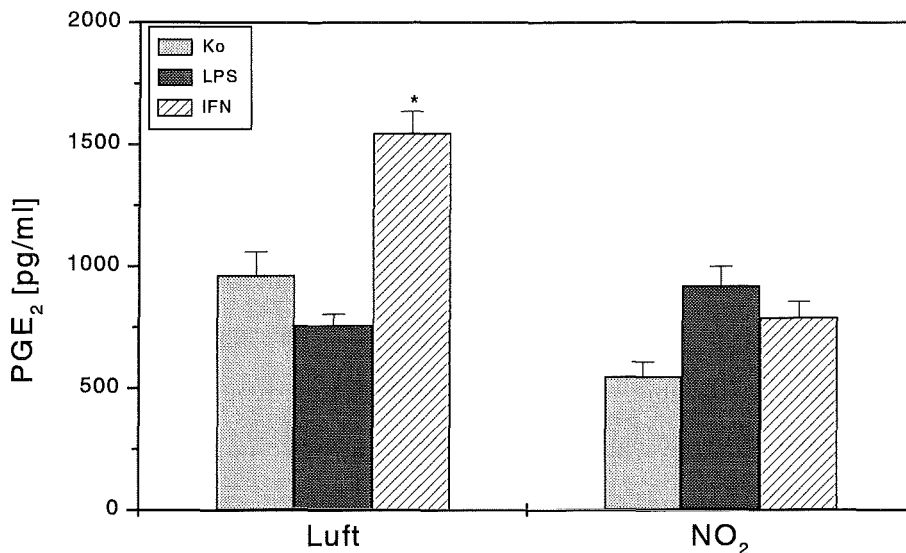


Abb. 5: Die PGE₂-Sekretion primäraktivierter RAM nach 2-stündiger Gasexposition und anschließender Stimulierung mit LPS bzw. IFN γ . RAM wurden für 2 h mit Luft bzw. NO₂ begast, bevor sie mit LPS [1 μ g/ml], IFN γ [50 U/ml] oder Medium (Ko) für 5 h behandelt wurden. Der Gehalt an PGE₂ [pg/ml] wurde in den Kulturüberständen bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 1 Versuch stellvertretend für 2 weitere unabhängig voneinander ausgeführte Experimente.

* steht für signifikant verschieden von IFN γ (NO₂-begast) für $p < 0.05$

3.1.3 Superoxidanionen-Produktion

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxidanionen, spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen durch Makrophagen. Die enzymatische Bildung von Superoxidanionen erfolgt in Makrophagen über die NADPH-Oxidase. Dieses membran-gebundene Flavoenzym wird u.a. während der Phagozytose induziert. Für Makrophagen ist Zymosan, ein Zellwandbestandteil von *Saccharomyces cerevisiae*, ein Phagozytosestimulus. Die Phagozytose von Zymosan durch Makrophagen kann durch sogenannte „Opsonine“ (griech.: *Opson* = Würze) erheblich gesteigert werden. Zu den Opsoninen gehören Antikörper und Komplementfaktoren wie C3b. Diese Substanzen lagern sich an die Oberfläche des Fremdkörpers an und erleichtern dadurch den Makrophagen die Phagozytose (Lohmann-Matthes, 1981).

Für die Untersuchung der Wirkung von NO_2 auf die Bildung von Superoxidanionen wurde ein Phagozytosestimulus, opsoniertes Zymosan, und LPS verwendet. Mit diesen Substanzen wurden die Zellen nach 2-stündiger Gasexposition für 90 min behandelt. Anschließend wurde die Freisetzung von Superoxidanionen bestimmt. Dies erfolgte durch die photometrische Messung der Reduktion von Cytochrom c in der Abwesenheit und Gegenwart der SOD (siehe 2.4.2.). Nach 90-minütiger Behandlung mit Zymosan wurden in den Kulturüberständen der luft-begasten Zellen ein erhöhter Gehalt an Superoxidanionen gemessen. Eine geringfügige Freisetzung an Superoxidanionen konnte auch in der luft-begasten Kontrolle nachgewiesen werden. Inkubation mit LPS induzierte während dieses Zeitraumes keine zusätzliche Bildung an Superoxidanionen. Eine vorangehende NO_2 -Exposition verminderte deutlich die zymosan-stimulierte Superoxidanionenproduktion (Abb. 6). Auch die nach Behandlung von Medium vorhandene Grundaktivität der Bildung von Superoxidanionen wurde durch eine NO_2 -Begasung auf ein Minimum reduziert.

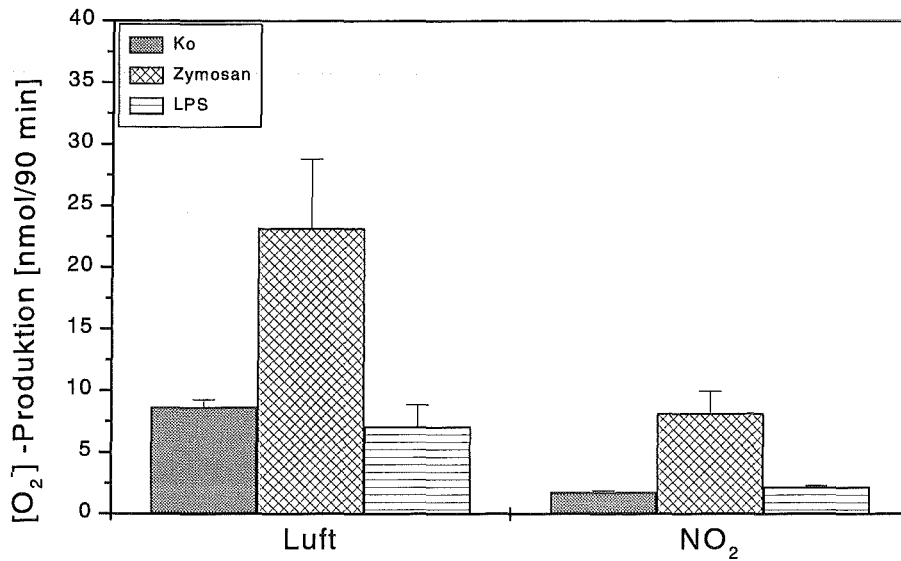


Abb. 6: Die Produktion von Superoxidanionen nach 2-stündiger Gasexposition und anschließender Stimulierung mit Zymosan bzw. LPS. RAM wurden für 2 h mit Luft bzw. NO₂ begast, bevor sie mit opsoniertem Zymosan [1 mg/ml], LPS [10 µg/ml] oder Medium (Ko) für 90 min behandelt wurden. Der Gehalt an Superoxidanionen [nmol/90 min] wurde in den Kulturüberständen bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte ±Standardfehler von 3 Versuchen.

3.1.4 NO-Bildung

Stickstoffmonoxid (NO) erfüllt neben seinen physiologischen Funktionen als Neurotransmitter und EDRF eine wichtige Aufgabe in der Abwehr von Mikroorganismen. Die NO-Biosynthese erfolgt in RAM über eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Bochsler *et al.*, 1996). Zu den typischen Stimuli der iNOS zählen LPS, IFN γ und TNF- α (Nussler und Billiar, 1993). Die NO-Bildung kann mit L-Arginin-Analoga, wie zB. L-N^G-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), gehemmt werden. Diese Substanzen konkurrieren mit dem natürlichen Substrat L-Arginin um die Bindung an der iNOS. NO ist eine hoch reaktive und instabile Verbindung mit einer kurzen Halbwertszeit. Aus diesem Grund basieren die meisten Meßmethoden zur Bestimmung von NO auf indirekten Techniken. Hierzu zählt die Bestimmung von Nitrit, einem stabilen Oxidationsprodukt.

Für die Untersuchung der Wirkung von NO₂ auf die NO-Biosynthese wurden RAM 2 h mit Luft bzw. NO₂ begast. Direkt nach Gasexposition wurde der Unterstand, das Medium welches sich während der Gasexposition unter den Zellen befand, abgezogen und für die Nitritbestimmung entsprechend aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen mit Medium, L-NMMA allein, LPS bzw. LPS in Kombination mit L-NMMA für unterschiedliche Zeiten

behandelt. Die Bestimmung der Nitritkonzentration erfolgte in den Kulturüberständen (siehe 2.4.3.). In Abb. 7 sind die Daten dieser Experimente zusammengefaßt. Nach 2-stündiger Begasung wurde in den Unterständen der luft-begasten Proben eine Konzentration von 1 μM Nitrit bestimmt. Diese Konzentration entspricht dem Medium Kontrollwert. In den NO_2 -begasten Proben wurde eine Konzentration von ca. 6 μM Nitrit gemessen. Dieser Gehalt an Nitrit ist nicht auf eine NO-Bildung durch die iNOS zurückzuführen, sondern beruht auf gelöstem NO_2 . Dies konnte durch Begasungsexperimente ohne Zellen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem reduzierte die Zugabe an L-NMMA vor der Begasung diese Nitritbildung nicht. Um die Induktion der NO-Synthese zu verdeutlichen wurde der Zeitverlauf der Nitritbildung bestimmt. Nach 4 und 6 h Inkubation mit LPS bzw. mit Medium wurden keine erhöhten Nitritwerte gemessen. Erst nach 24-stündiger Stimulierung mit LPS wurde eine Erhöhung der Nitritbildung festgestellt. Eine vorangehende NO_2 -Exposition erhöhte die LPS-stimulierte Nitritbildung im Vergleich zu luft-begasten RAM. Der Zusatz von L-NMMA reduzierte die LPS-stimulierte Nitritbildung auf das Niveau der luft- bzw. NO_2 -begasten und mit medium-behandelten RAM.

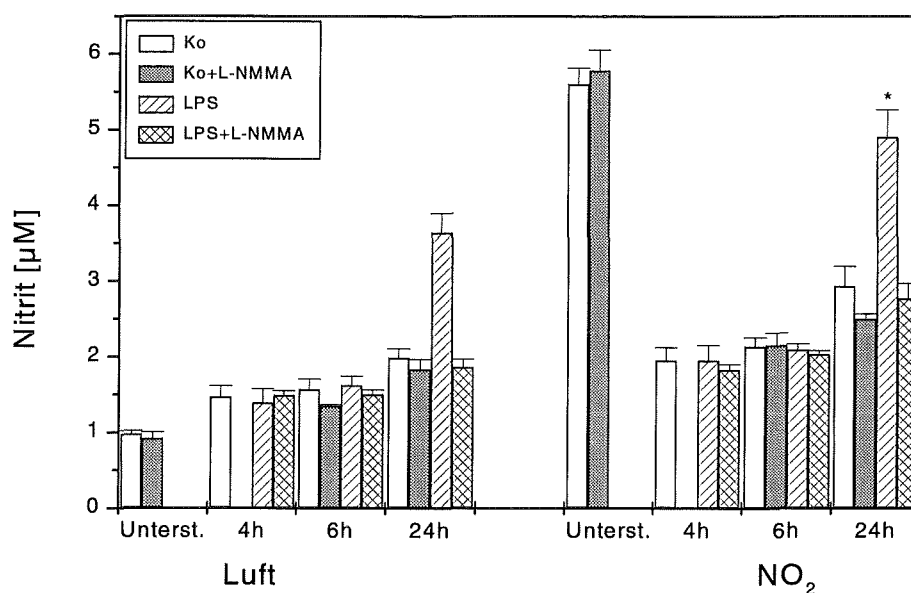


Abb. 7: Der Zeitverlauf der NO-Bildung nach Gasexposition. RAM wurden für 2 h mit Luft bzw. NO_2 begast in der Abwesenheit und Gegenwart von L-NMMA [1 mM]. Anschließend wurden die Zellen mit LPS [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$] +/- L-NMMA [1 mM] oder Medium (Ko) +/- L-NMMA [1 mM] behandelt. Die NO-Bildung wurde in Form von Nitrit [μM] direkt nach Gasexposition im Unterstand und nach unterschiedlichen Zeiten in den Kulturüberständen bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von LPS (luft-begast) für $p < 0.06$

Primäraktivierte RAM

Primäraktivierte RAM produzierten hohe Mengen an NO, gemessen als Nitrit, ohne zusätzlichen Stimulus. Sie zeigten nach NO₂-Begasung ein anderes Reaktionsprofil als nicht primäraktivierte Makrophagen (Abb. 8). Nach 2-stündiger Begasung wurden in den Unterständen der luft- und NO₂-exponierten Zellen bereits erhöhte Nitritwerte gemessen. Der Zusatz von L-NMMA reduzierte die Nitritbildung im Unterstand in den luft-begasten Proben vollständig, in den NO₂-begasten bis auf den Wert, welcher durch gelöstes NO₂ hervorgerufen wurde. Nach 10- und 24-stündiger Behandlung mit Medium wurde eine kontinuierliche Zunahme der Nitritbildung in den gasexponierten Zellen gemessen. Diese Zunahme der Nitritbildung war in den NO₂-begasten RAM vermindert im Vergleich zu den luft-behandelten Zellen. Nach 24 h wurde eine signifikante Reduktion der Nitritbildung gegenüber der Luftexposition von RAM festgestellt. Die Behandlung der primäraktivierten RAM mit LPS führte zu einer Reduktion der Nitritbildung. Dieser hemmende Effekt war in den luft- und NO₂-begasten Zellen gleichermaßen ausgeprägt. Der Zusatz von L-NMMA reduzierte in allen Ansätzen die Nitritbildung.

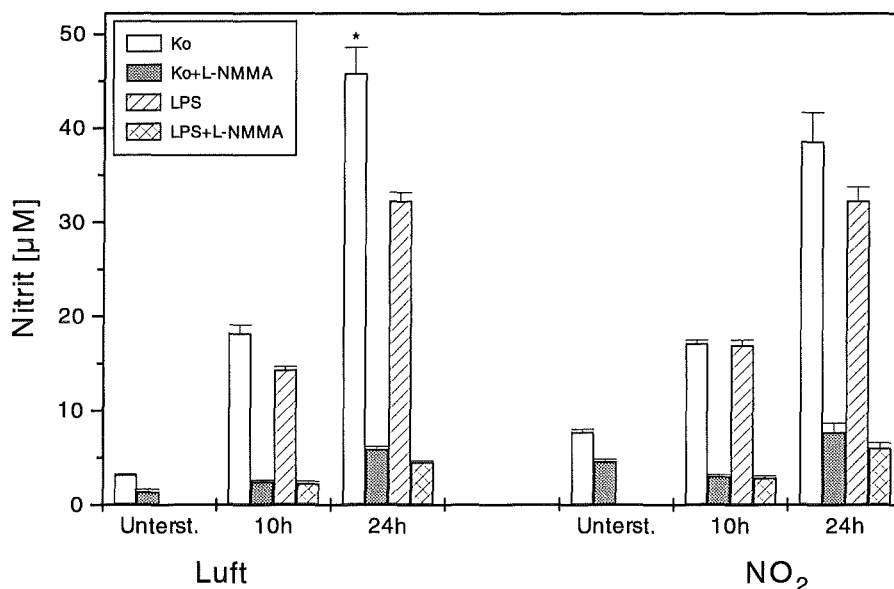


Abb. 8: Der Zeitverlauf der NO-Bildung primäraktivierter RAM nach Gasexposition. RAM wurden für 2 h mit Luft bzw. NO₂ begast in der Abwesenheit und Gegenwart von L-NMMA [1 mM]. Anschließend wurden die Zellen mit LPS [1 µg/ml] +/- L-NMMA [1 mM] oder Medium (Ko) +/- L-NMMA [1mM] behandelt. Die NO-Bildung wurde in Form von Nitrit [µM] direkt nach Gasexposition im Unterstand und nach unterschiedlichen Zeiten in den Kulturüberständen bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 1 Versuch stellvertretend für 2 weitere unabhängig voneinander ausgeführte Experimente.

* steht für signifikant verschieden von Ko (NO₂-begast) für $p < 0.05$

3.2 Untersuchungen zur NO-Bildung in RAM

3.2.1 Charakterisierung der NO-Bildung in RAM

Für die Untersuchung der Wirkungsmechanismen von NO_2 auf die NO-Bildung von RAM wurde eine Charakterisierung der NO-Bildung vorgenommen. Hierzu wurde die Nitritbildung und die Expression der iNOS mRNA nach Behandlung mit verschiedenen Stimuli und Inhibitoren der iNOS genauer betrachtet. Aus versuchstechnischen Gründen wurden diese Bestimmungen (Nitritbildung und Expression der iNOS mRNA) in unterschiedlichen Ansätzen vorgenommen (siehe 2.2.2.). In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse zur Nitritbildung und anschließend zur Expression der iNOS mRNA dargestellt.

3.2.1.1 Nitritbildung nach Behandlung mit LPS und $\text{IFN}\gamma$

LPS wurde in den Untersuchungen als Standardstimulus verwendet. Nach Behandlung von RAM sollte hierbei der Zeitverlauf der Nitritbildung verdeutlicht werden. In Abb. 9 sind die Ergebnisse nach Behandlung von RAM mit LPS aufgeführt. RAM wurden mit unterschiedlichen Konzentration von LPS über einen Zeitraum von 96 Stunden stimuliert. Nach 24 h wurden bereits erhöhte Nitritwerte gegenüber der Kontrolle gemessen. Der Gehalt an Nitrit nahm mit längerer Inkubationszeit kontinuierlich zu. Bereits nach 48 h konnten signifikante Unterschiede gegenüber den unbehandelten RAM gemessen werden.

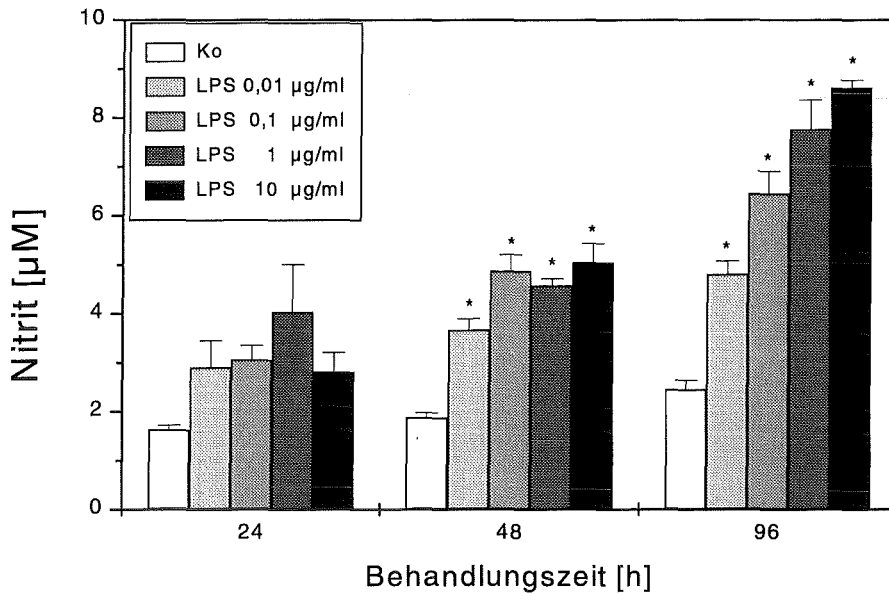


Abb. 9: Zeitverlauf der LPS-stimulierten Nitritbildung. RAM wurden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS [0,01-10 µg/ml] bzw. Medium (Ko) behandelt. Nach den angegebenen Zeiten wurde in den Kulturüberständen der Gehalt an Nitrit [µM] bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

Die IFN γ -induzierte Nitritbildung wurde nach 24 und 48 h bestimmt (Abb. 10). Nach Behandlung mit IFN γ wurde ebenso eine zeit- und konzentrationsabhängige Nitritbildung gemessen. IFN γ induzierte nach 24-stündiger Behandlungszeit im Vergleich mit LPS eine höhere Nitritbildung. Nach 48 h wurde eine weitere Steigerung dieser Werte beobachtet. Die Ergebnisse der Koinkubation von IFN γ und LPS sind in Abb. 11 dargestellt. Die zusätzliche Behandlung mit IFN γ verstärkte synergistisch nach 24 h die LPS-induzierte Nitritbildung. Nach längerer Behandlungszeit wurde ein erhöhter Nitritgehalt gegenüber der LPS-induzierten gemessen. Dieser Nitritgehalt war im Vergleich mit der IFN γ -induzierten vermindert.

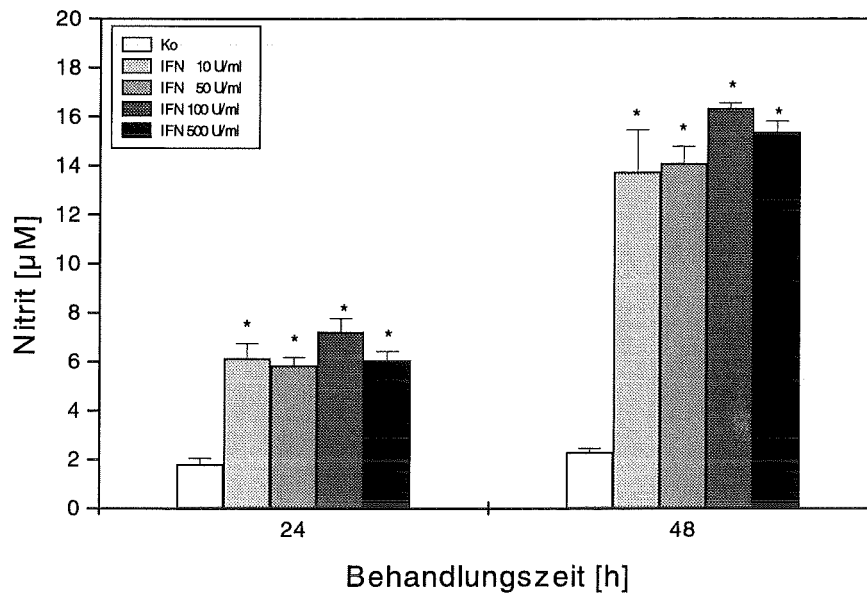


Abb. 10: Die IFN γ -stimulierte Nitritbildung. RAM wurden mit verschiedenen Konzentrationen an IFN γ [10-500 U/ml] bzw. Medium (Ko) behandelt. Nach den angegebenen Zeiten wurde in den Kulturüberständen der Gehalt an Nitrit [μ M] bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

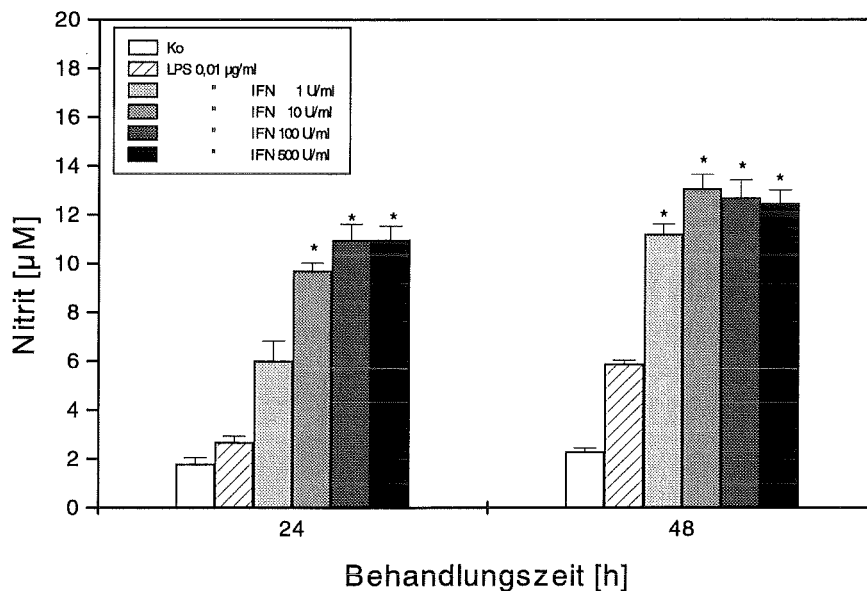


Abb. 11: Wirkung von IFN γ auf die LPS-stimulierte Nitritbildung. RAM wurden mit einer Konzentration an LPS [0,01 μ g/ml] und verschiedenen Konzentrationen an IFN γ [1-500 U/ml] bzw. Medium (Ko) behandelt. Nach den angegebenen Zeiten wurde in den Kulturüberständen der Gehalt an Nitrit [μ M] bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von LPS für $p < 0.05$

3.2.1.2 Wirkung der SOD auf die LPS-induzierte Nitritbildung

Die Superoxiddismutase (SOD) ist ein intra- und extrazelluläres Enzym. Die SOD katalysiert die Reaktion von Superoxidanionen in H_2O_2 . Das gebildete H_2O_2 , welches ebenso schädliche Auswirkungen auf lebende Zellen hat wie Superoxidanionen, wird durch die Reaktion der Katalase in H_2O abgebaut. In Abb. 12 sind die Ergebnisse zur Wirkung der SOD auf die Nitritbildung dargestellt. RAM wurden mit LPS [0,1 $\mu\text{g/ml}$] und verschiedenen SOD-Konzentrationen behandelt. Die Zugabe der SOD führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der LPS-induzierten Nitritbildung.

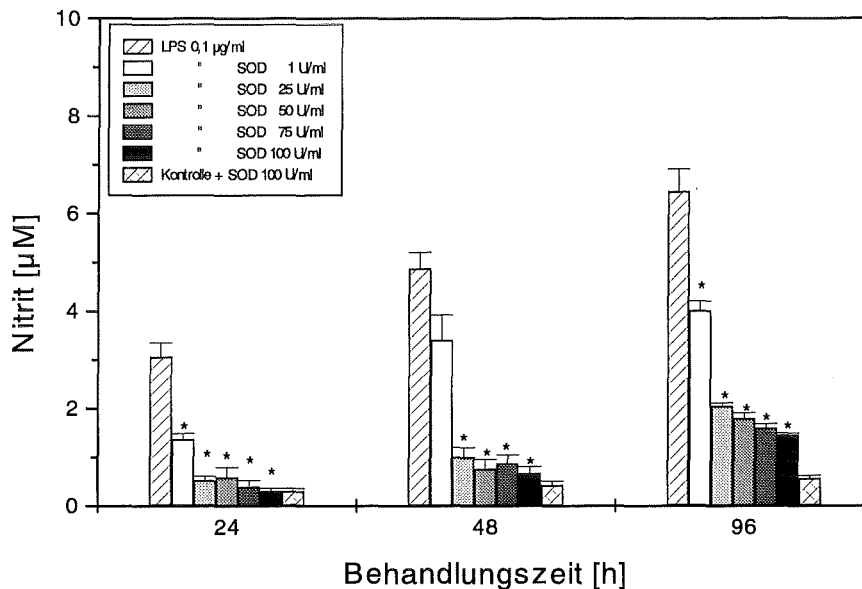


Abb. 12: Wirkung der SOD auf die LPS-stimulierte Nitritbildung. RAM wurden mit einer Konzentration an LPS [0,1 $\mu\text{g/ml}$] verschiedenen Konzentrationen an SOD [1-100 U/ml] behandelt. Nach den angegebenen Zeiten wurde in den Kulturüberständen der Gehalt an Nitrit [μM] bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von LPS für $p < 0.05$

3.2.1.3 Wirkung von PGE_2 auf die LPS- bzw. $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Nitritbildung

In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß PGE_2 modulierend auf die induzierte NO-Bildung wirkt (Gaillard *et al.*, 1992; Marotta *et al.*, 1992). Dabei wurden sowohl positiv als auch negativ modulierende Effekte, jedoch keine Induktion der NO-Bildung durch PGE_2 allein beschrieben. Welchen Einfluß PGE_2 auf die NO-Bildung von RAM hat, ist in den folgenden Abbildungen dargestellt.

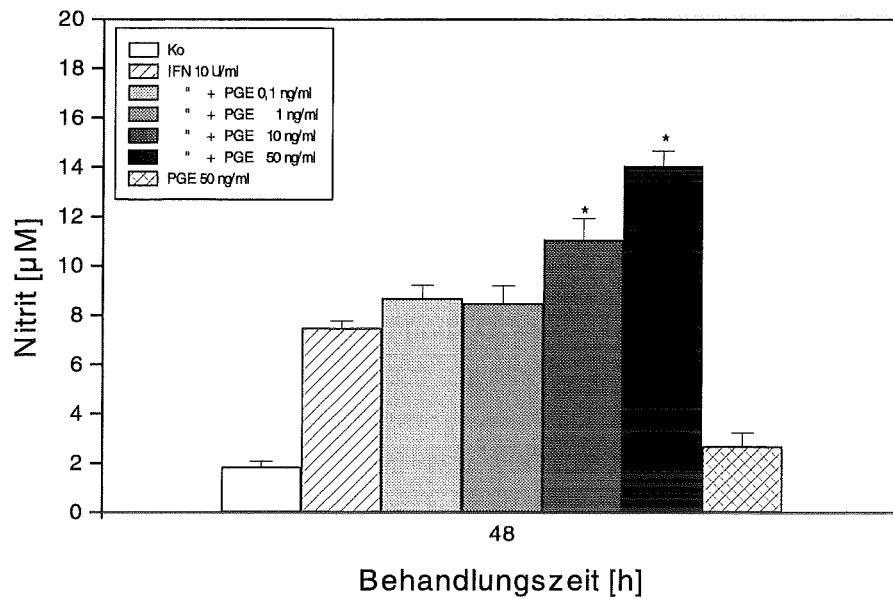


Abb. 13: Wirkung von PGE₂ auf die IFN γ -stimulierte Nitritbildung. RAM wurden mit einer Konzentration an IFN γ [10 U/ml] und verschiedenen Konzentrationen an PGE₂ [0,1-50 ng/ml] bzw. Medium (Ko) behandelt. Nach 48 h wurde in den Kulturüberständen der Gehalt an Nitrit [μ M] bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von IFN γ für $p < 0.05$

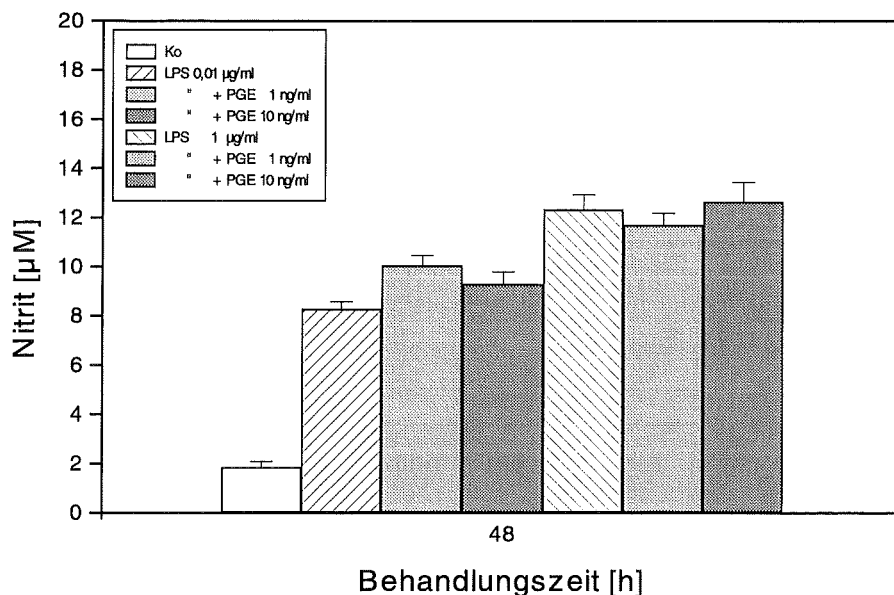


Abb. 14: Wirkung von PGE₂ auf die LPS-stimulierte Nitritbildung. RAM wurden mit LPS [0,01; 1 μ g/ml] und PGE₂ [1; 10 ng/ml] bzw. Medium (Ko) behandelt. Nach 48 h wurde in den Kulturüberständen der Gehalt an Nitrit [μ M] bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Versuchen.

In diesen Experimenten konnte ebenso keine Induktion der NO-Bildung nach Behandlung von RAM mit PGE₂ in einem Konzentrationsbereich von 0,1-50 ng/ml festgestellt werden. PGE₂ erhöhte jedoch synergistisch die IFN γ -induzierte Nitritbildung wie in Abb. 13 dargestellt. RAM wurden mit einer konstanten Konzentration an IFN γ und unterschiedlichen Konzentration an PGE₂ über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. PGE₂ erhöhte die IFN γ -induzierte Nitritbildung signifikant. Die Konzentrationen 10 und 50 ng PGE₂/ml zeigten eine synergistische Verstärkung der IFN γ -induzierten Nitritbildung. Dieser Effekt konnte in Bezug auf die LPS-stimulierte Nitritbildung nicht beobachtet werden (Abb. 14). RAM wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an LPS und PGE₂ inkubiert. Eine Konzentration von 1 ng PGE₂/ml erhöhte geringfügig die LPS- [0,01 μ g/ml] stimulierte Nitritbildung, die 10fach höhere Konzentration an PGE₂ führte zu keiner weiteren Erhöhung. Inkubation mit der 100fach höheren LPS-Konzentration in Kombination mit PGE₂ führte ebenfalls zu keiner meßbaren Verstärkung der Nitritbildung durch PGE₂.

3.2.1.4 Wirkung von Indomethacin auf die LPS- bzw. IFN γ -induzierte Nitritbildung

Indomethacin ist ein selektiver Hemmstoff (IC₅₀=0,1 μ M) der Cyclooxygenase und hemmt somit die Bildung von PGE₂. In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden inwieweit Indomethacin einen Einfluß auf die LPS- bzw. IFN γ -induzierte Nitritbildung hat. RAM wurden mit einer konstanten Konzentration an LPS bzw. IFN γ und ansteigenden Konzentrationen an Indomethacin [0,1-10 μ M] über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Die LPS-induzierte Nitritbildung wurde durch Indomethacin in einer Konzentration von 0,1 μ M um 23% reduziert (Abb. 15). Höhere Konzentrationen an Indomethacin [1 und 10 μ M] hatten keinen zusätzlich inhibitorischen Effekt, der mit 0,1 μ M bereits maximal zu sein scheint. Die Behandlung von RAM mit einer konstanten Konzentration an IFN γ unter Zusatz von ansteigenden Konzentrationen an Indomethacin über einen Zeitraum von 48 h führte ebenso zu einer Verminderung der IFN γ -induzierten Nitritbildung (Abb. 16). In einer Konzentration von 0,1 μ M reduzierte Indomethacin die IFN γ -induzierte Nitritbildung um 20%. Eine Erhöhung der Indomethacin-Konzentration führte wie in Kombination mit LPS zu keiner deutlichen zusätzlichen Reduktion der Nitritbildung.

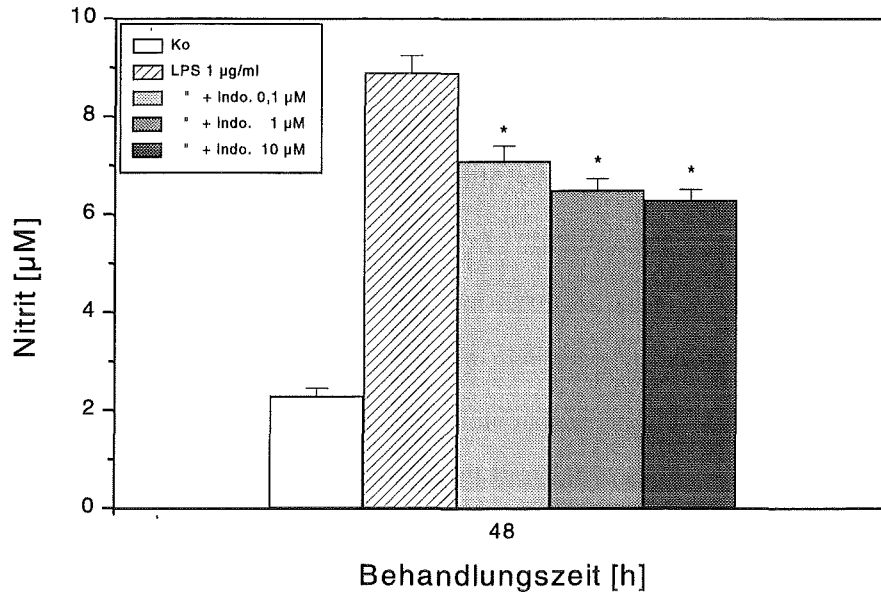


Abb. 15: Wirkung von Indomethacin auf die LPS-stimulierte Nitritbildung. RAM wurden mit LPS [1 µg/ml] und unterschiedlichen Konzentrationen an Indomethacin (Indo.) [0,1; 1; 10 µM] bzw. Medium (Ko) behandelt. Nach 48 h wurde in den Kulturüberständen der Gehalt an Nitrit [µM] bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von LPS für $p < 0.05$

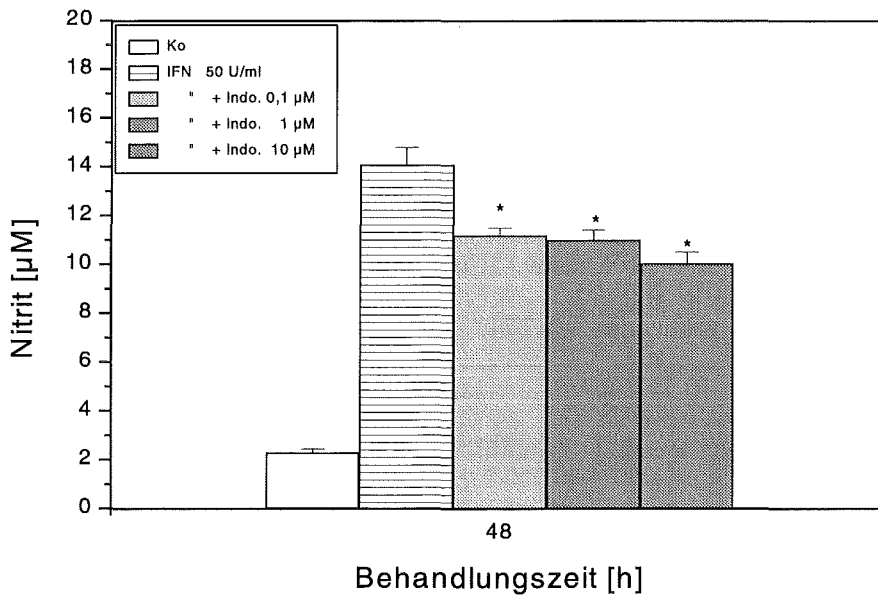


Abb. 16: Wirkung von Indomethacin auf die IFN γ -stimulierte Nitritbildung. RAM wurden mit IFN γ [50 U/ml] und unterschiedlichen Konzentrationen an Indomethacin (Indo.) [0,1; 1; 10 µM] bzw. Medium (Ko) behandelt. Nach 48 h wurde in den Kulturüberständen der Gehalt an Nitrit [µM] bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von IFN γ für $p < 0.05$

3.2.2 Untersuchungen zur Expression der iNOS mRNA

Die Expression der iNOS-mRNA wurde mit RT-PCR bestimmt (siehe 2.5.). Die hierfür notwendigen Primer-Sequenzen wurden von Adler *et al.* (1995) übernommen. Diese Gruppe hat ihre Untersuchungen an vom Knochenmark bzw. von Monozyten abgeleiteten Rindermakrophagen durchgeführt. Es wurde angenommen, daß diese Sequenzen eine hohe Homologie zur iNOS mRNA von Alveolarmakrophagen des Rindes besitzen und dies hat sich auch in den Untersuchungen bestätigt. Die Behandlung von RAM mit LPS führte nach erfolgter RT-PCR zur Amplifikation eines spezifischen PCR-Produktes sichtbar im Gel als eine Bande. Um die Identität des PCR-Produktes eindeutig nachzuweisen, wurde eine Hybridisierung mit einer iNOS-spezifischen Sonde durchgeführt. In diesem Kapitel wird zunächst der Beweis dafür erbracht, in den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zur Charakterisierung der Expression der iNOS mRNA dargestellt.

Vorversuche zur Expression der iNOS-mRNA zeigten, daß nach der Kulturnahme der RAM die Expression der iNOS mRNA ansteigt. Der Gehalt an iNOS mRNA war über einen Zeitraum von 12-24 h auf einem erhöhten Niveau und sank nach weiteren ca. 12 h auf Kontrollniveau. Diese Erhöhung des iNOS mRNA Gehaltes könnte durch Stress bedingt sein, hervorgerufen durch die Isolierung und Kulturnahme der Zellen.

Bei jedem Experiment wurde direkt nach Isolierung der RAM der Gehalt an iNOS mRNA bestimmt. Dies sollte Aufschluß über eine eventuell vorhandene Primäraktivierung der Zellen geben. In den Abbildungen werden diese Ergebnisse mitaufgeführt und als „nach Iso.“ bezeichnet.

3.2.2.1 Identität des iNOS-PCR-Produktes

Für die Identitätsbestimmung wurden zuerst iNOS-PCR-Produkte hergestellt (siehe 2.5.). Als Stimulus der iNOS Expression wurde LPS verwendet. RAM wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS behandelt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription). Anschließend erfolgte die Amplifikation der iNOS-spezifischen Gensequenzen. Als interner Standard wurde GAPDH in einem separaten Ansatz amplifiziert. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden im Gel aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden durch Ethidiumbromid-Färbung und mit UV-Licht sichtbar gemacht. Im oberen Teil der Abb. 17 ist die Fluoreszenz-Fotografie dieses

Geles abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Stimulierung der RAM mit LPS die Expression einer spezifischen Sequenz erhöhte. In den unbehandelten Proben wurde nur eine geringfügige Expression dieser Sequenz nachgewiesen. Die Amplifikation der GAPDH-PCR-Produkte zeigt, daß gleiche Mengen an RNA verwendet wurden.

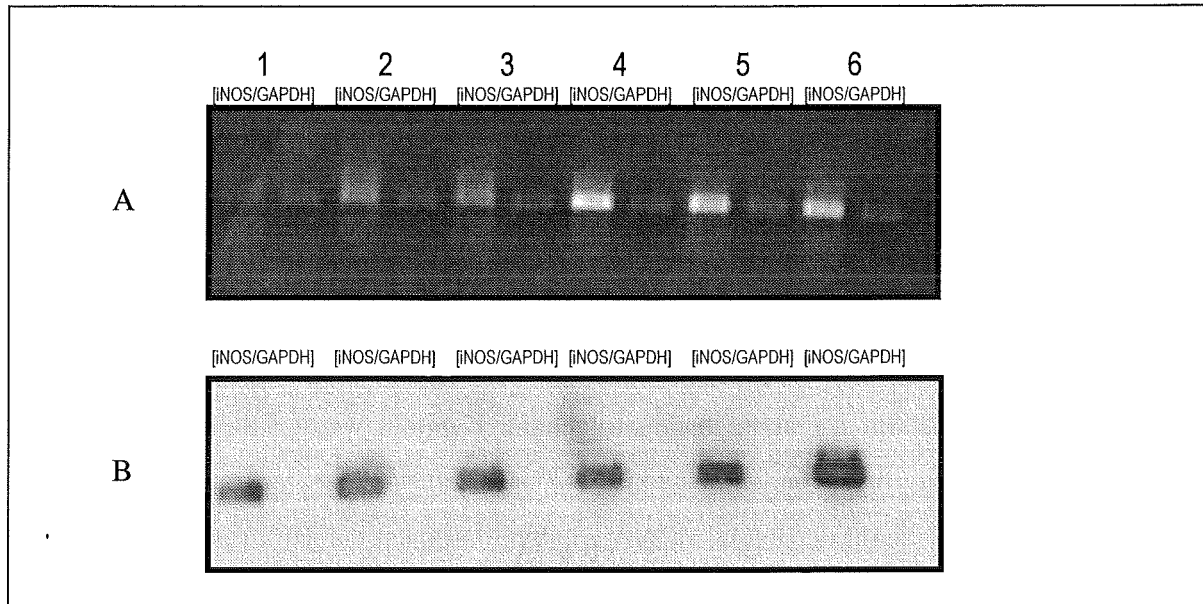


Abb. 17: Identifizierung des iNOS-PCR-Produktes.

A: Fluoreszenz-Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte. RAM wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS [0,01-1 µg/ml] bzw. Medium für 24 h behandelt. Nach Isolierung der gesamten zellulären RNA jeder Probe wurde jeweils 1 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. 2 µl der cDNA-Produkte wurden für die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit einem iNOS- bzw. GAPDH-Primer-Paar eingesetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 µl der iNOS-PCR-Produkte und jeweils 24 µl der GAPDH-PCR-Produkte im Agarosegel (2%) aufgetrennt; iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte wurden abwechselnd aufgetragen. Auf den Bahnen 1-6 sind folgende Proben aufgetragen: 1: RAM nach Isolierung, 2: Ko zu Beginn der Behandlung (0 h), 3: Ko (24 h), 4: LPS [1 µg/ml], 5: LPS [0,1 µg/ml], 6: LPS [0,01 µg/ml]; LPS-Stimulierung jeweils über 24 h.

B: Autoradiogramm nach erfolgter Hybridisierung mit der iNOS-spezifischen Sequenz. Die PCR-Produkte wurden mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer DIG-markierten Rinder-iNOS-Sonde (128 Bp) hybridisiert. Die Hybridisierung wurde mit Anti-DIG-Antikörpern nachgewiesen.

Dieses Gel wurde für die nachfolgende Hybridisierung verwendet. Hierzu wurden die PCR-Produkte mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung und die anschließende Detektion wurde wie unter 2.6. beschrieben durchgeführt. Die Fotografie des erhaltenen Autoradiogramms ist im unteren Teil der Abb. 17 dargestellt. Die Banden im Autoradiogramm zeigen, daß eine spezifische Hybridisierung der Rinder-iNOS Sonde mit dem iNOS-PCR-Produkt stattgefunden hat. Dies wird in der Darstellung besonders deutlich durch die Anlagerung der Rinder-iNOS-Sonde an die mehrfach aufgetragenen iNOS-PCR-Produkten. An den in den Zwischenräumen aufgetragenen GAPDH-PCR-Produkten fand

keine Hybridisierung der Sonde statt. Damit ist gezeigt, daß es sich bei dem PCR-Produkt tatsächlich um die iNOS-spezifische Sequenz handelt.

3.2.2.2 LPS- und IFN γ -induzierte iNOS mRNA Expression

Die Expression der iNOS mRNA nach Behandlung mit LPS und/oder IFN γ wurde nach 24-stündiger Inkubation untersucht. Aus der Literatur war der Zeitverlauf der iNOS mRNA Expression nach Stimulierung von RAM mit LPS bekannt. Nach 4 h wird ein erhöhter mRNA Gehalt nachgewiesen, der bis zu 8 h kontinuierlich zunimmt und über einen Zeitraum von 24 h auf einem erhöhten Niveau bleibt. Ein Absinken der mRNA Menge wird erst nach 48 h beobachtet. (Mason *et al.*, 1996).

In Abb. 18 sind die Ergebnisse nach Behandlung von RAM mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen dargestellt. Der obere Teil der Abbildung zeigt die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte, im unteren Teil der Abbildung sind die Intensitäten der optischen Dichten (IntOD) der Gelbanden des iNOS-PCR-Produktes bezogen auf GAPDH aufgetragen. LPS induziert in RAM konzentrationsabhängig die Expression der iNOS-mRNA. Direkt nach Isolierung und nach 24-stündiger Kultur mit Medium wurde nur eine geringfügige Expression der iNOS mRNA nachgewiesen.

Die zusätzliche Gabe von IFN γ erhöhte die LPS-induzierte iNOS-mRNA Expression (Abb. 19). Eine Konzentration von 50 U/ml IFN γ induzierte eine ebenso hohe iNOS-mRNA Expression wie LPS in einer Konzentration von 1 μ g/ml. Die Koinkubation von LPS und IFN γ führte innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches zu einer verstärkten Expression der iNOS mRNA im Vergleich mit der induzierten Expression durch die jeweiligen Einzelsubstanzen.

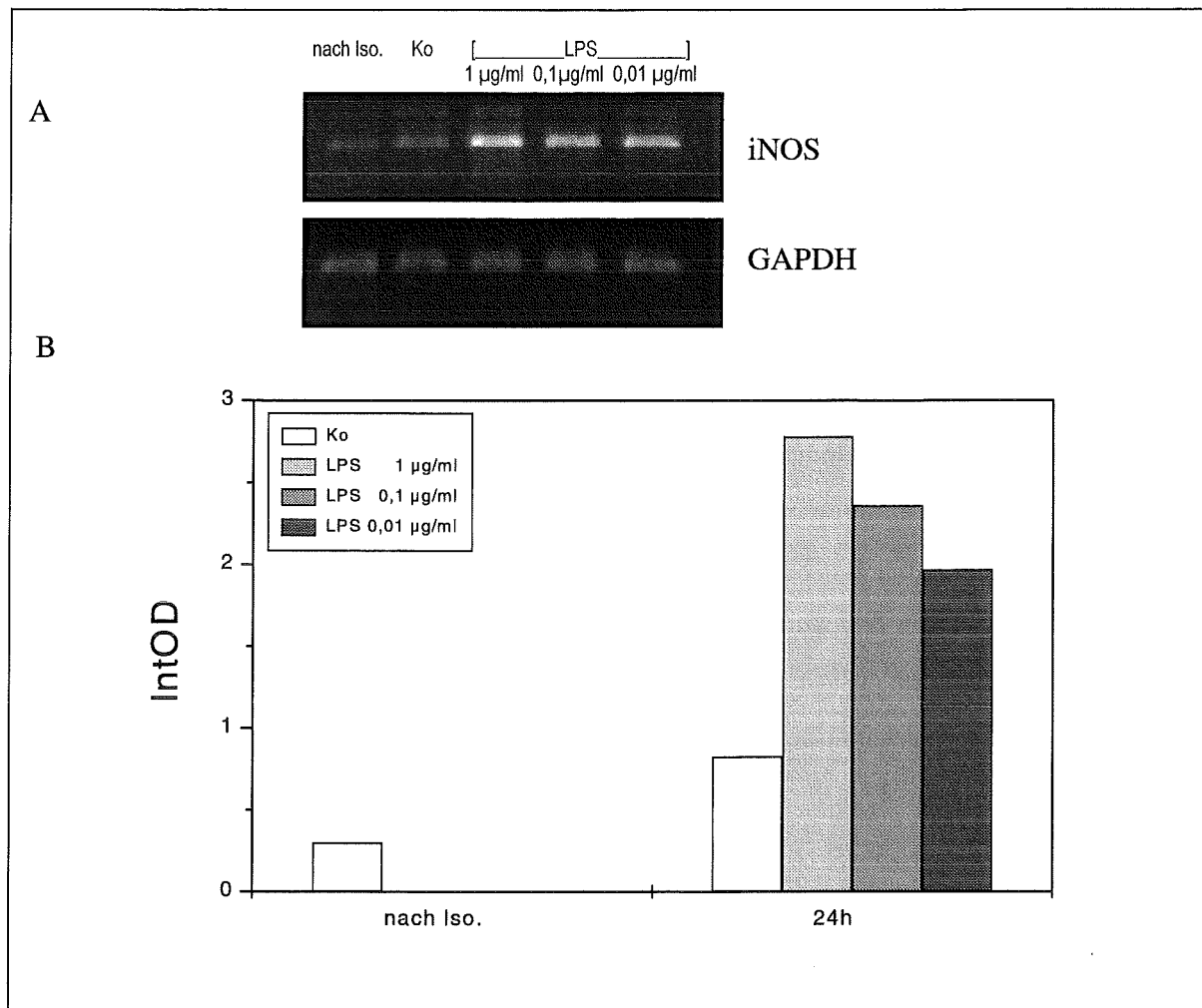


Abb. 18: Expression der iNOS mRNA nach Behandlung von RAM mit LPS.

A: Fluoreszenz-Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte. RAM wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS [0,01-1 µg/ml] bzw. Medium (Ko) für 24 h behandelt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA jeder Probe wurde jeweils 1 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. 2 µl der cDNA-Produkte wurden für die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit einem iNOS- bzw. GAPDH-Primer-Paar eingesetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 µl der iNOS-PCR-Produkte und jeweils 24 µl der GAPDH-PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt.

B: Quantitative Analyse der Expression der iNOS mRNA. Die DNA-Banden wurden mit einer Videokamera aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde über die Messung der optischen Intensitäten (IntOD) bestimmt. Die IntOD der iNOS-PCR-Produkte wurden in Relation zur IntOD der GAPDH-PCR-Produkte dargestellt.

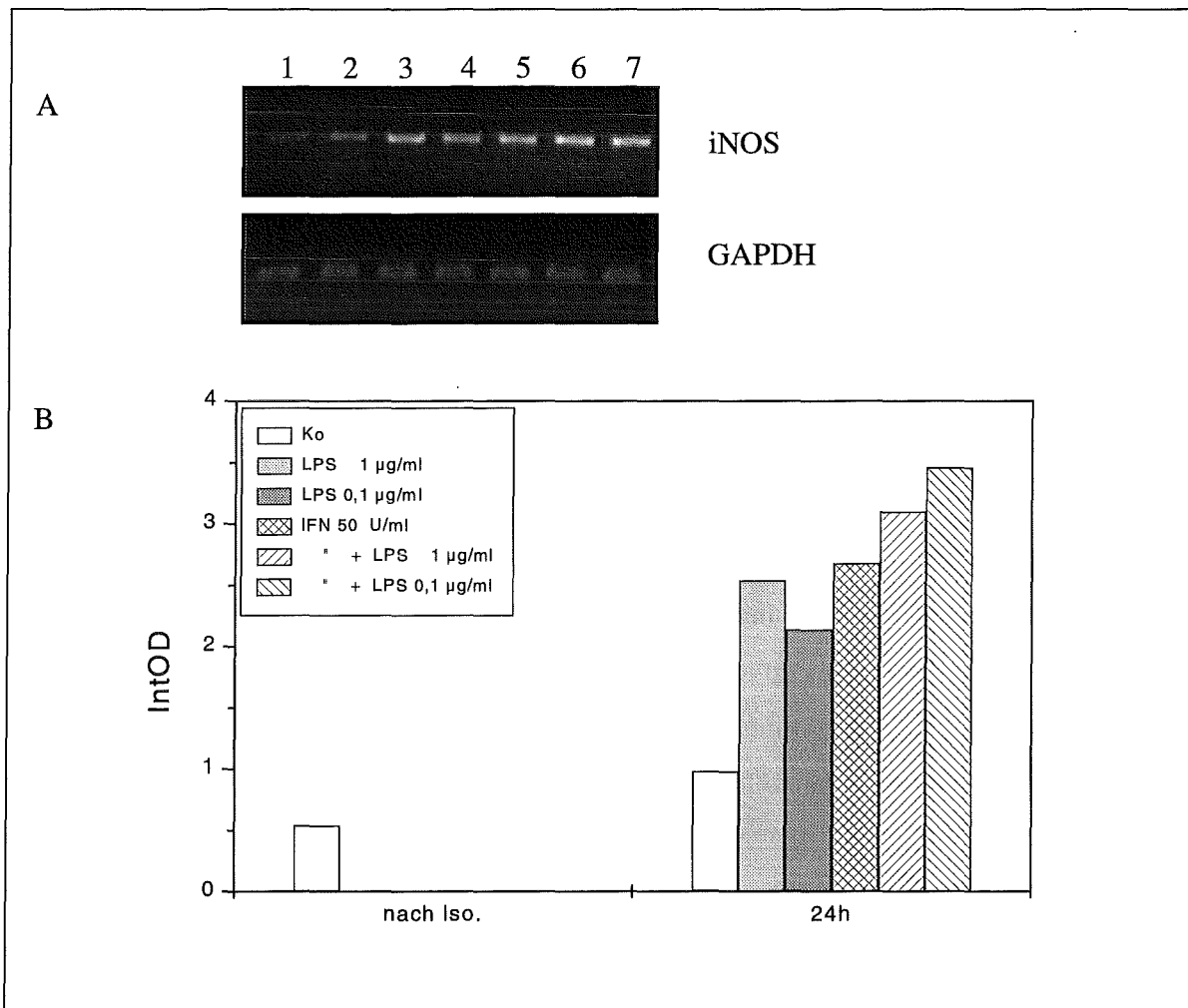


Abb. 19: Expression der iNOS mRNA nach Behandlung von RAM mit LPS und IFN γ .

A: Fluoreszenz-Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte. RAM wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS [0,1; 1 µg/ml], IFN γ [50 U/ml] bzw. Medium (Ko) für 24 h behandelt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA jeder Probe wurde jeweils 1 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. 2 µl der cDNA-Produkte wurden für die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit einem iNOS- bzw. GAPDH-Primer-Paar eingesetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 µl der iNOS-PCR-Produkte und jeweils 24 µl der GAPDH-PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt.

Auf den Bahnen 1-6 sind folgende Proben aufgetragen: 1: RAM nach Isolierung, 2: Ko (24 h), 3: LPS [1 µg/ml], 4: LPS [0,1 µg/ml], 5: IFN γ [50 U/ml], 6: IFN γ /LPS [1 µg/ml], 7: IFN γ /LPS [0,1 µg/ml]; Behandlungszeitraum jeweils 24 h.

B: Quantitative Analyse der Expression der iNOS mRNA. Die DNA-Banden wurden mit einer Videokamera aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde über die Messung der optischen Intensitäten (IntOD) bestimmt. Die IntOD der iNOS-PCR-Produkte wurden in Relation zur IntOD der GAPDH-PCR-Produkte dargestellt.

3.2.2.3 Wirkung von SNP, SIN-1 und Nitrit auf die Expression der iNOS mRNA

Zur Untersuchung der Wirkung von NO auf seine eigene Synthese wurde der NO-Donor Natrium-Nitroprussid (SNP) eingesetzt. Der Einfluß von Folgeprodukten der NO-Bildung auf die Expression der iNOS mRNA wurde mit Hilfe von SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin), einem Peroxynitritbildner, und Nitrit bestimmt. SNP gehört wie Nitritester und Eisencluster-Komplexe zu den NO-Donoren, welche spontan und sehr schnell NO freisetzen. SIN-1 ist ein Vertreter der Sydnonimine. Diese Substanzen setzen NO langsam frei (Henning, 1993). Bei diesen Experimenten wurden folgende Versuchsbedingungen unterschieden: Zugabe der Reagentien 2 h nach Isolierung, am folgenden Tag in Kombination mit LPS und nach 24-stündiger Vorinkubation mit SNP. Die Nitritkonzentration wurde in der Größenordnung, wie die Konzentration der Nitritbildung nach einer zweistündigen NO₂-Begasung im Medium, ausgewählt. In Abb. 20 ist der Zeitverlauf der iNOS mRNA Expression 2 h nach Kulturnahme der RAM und anschließender Stimulierung mit LPS, SNP bzw. SIN-1 dargestellt. Direkt nach Isolierung der Zellen konnte keine Expression der iNOS-mRNA nachgewiesen werden („nach Iso“). Nach Behandlung der RAM mit Medium wurde die nach Kulturnahme der RAM bedingte Erhöhung des iNOS mRNA-Gehaltes beobachtet (siehe 3.2.2.). Nach 24 h sank der Wert auf ein niedriges Niveau ab. Stimulierung der RAM mit LPS führte zu einem schnelleren Ansteigen des iNOS mRNA-Gehaltes. Dies konnte auch nach Behandlung der Zellen mit SNP bzw. SIN-1 nachgewiesen werden. Nach 24-stündiger Behandlungszeit wurde nur in den LPS-stimulierten RAM ein erhöhter iNOS mRNA Gehalt gemessen. Die mit SNP bzw. SIN-1 stimulierten Proben waren nach 24 h ungefähr auf dem gleichen Niveau wie die mit medium-behandelten Proben.

Als nächstes sollte geklärt werden, welchen Einfluß SNP bzw. Nitrit auf die LPS-stimulierte iNOS-mRNA Expression haben. Hierbei wurde die Wirkung auf die frühe Induktionsphase (2 h) und die nach längerer Stimulierung (24 h) untersucht. In Abb. 21 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Versuchsbeginn war 20 h nach Kulturnahme der RAM. Direkt nach Isolierung der Zellen wurde eine geringfügige Expression der iNOS-mRNA gemessen. Nach 2-stündiger Behandlungszeit induzierte LPS eine erhöhte Expression der iNOS mRNA. In Kombination mit SNP bzw. Nitrit wurde der gleiche iNOS mRNA Gehalt gemessen. Behandlung mit SNP, Nitrit bzw. Medium führte nach 2 h zu einer verminderten Expression der iNOS mRNA im Vergleich zu den LPS-stimulierten Proben. Nach 24 h wurde in den

LPS-behandelten Proben ein erhöhter iNOS mRNA Gehalt gemessen. Die Zugabe von SNP bzw. Nitrit veränderte die durch LPS hervorgerufene iNOS mRNA Expression kaum. Ohne den Stimulus LPS wurde nach 24-stündiger Behandlungszeit nur eine minimale Expression der iNOS mRNA gemessen.

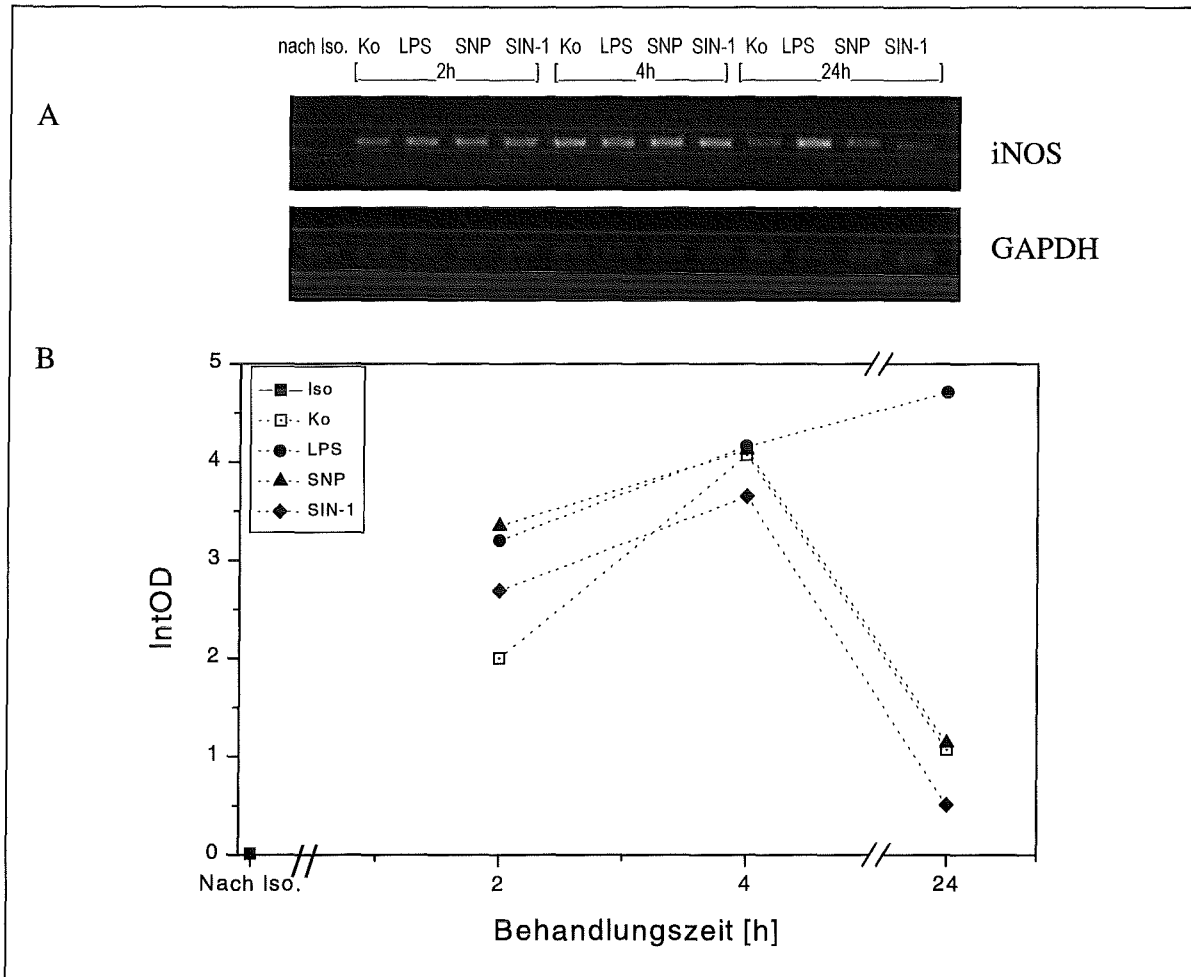


Abb. 20: Wirkung von LPS, SNP und SIN-1 auf die Expression der iNOS mRNA nach Kulturnahme der RAM.
 A: Fluoreszenz-Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte. RAM wurden 2 h nach Isolierung mit LPS [1 µg/ml], SNP [100 µM], SIN-1 [100 µM] bzw. Medium (Ko) für unterschiedliche Zeiten behandelt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA jeder Probe wurde jeweils 1 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. 2 µl der cDNA-Produkte wurden für die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit einem iNOS- bzw. GAPDH-Primer-Paar eingesetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 µl der iNOS-PCR-Produkte und jeweils 24 µl der GAPDH-PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt.
 B: Quantitative Analyse der Expression der iNOS mRNA. Die DNA-Banden wurden mit einer Videokamera aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde über die Messung der optischen Intensitäten (IntOD) bestimmt. Die IntOD der iNOS-PCR-Produkte wurden in Relation zur IntOD der GAPDH-PCR-Produkte dargestellt.

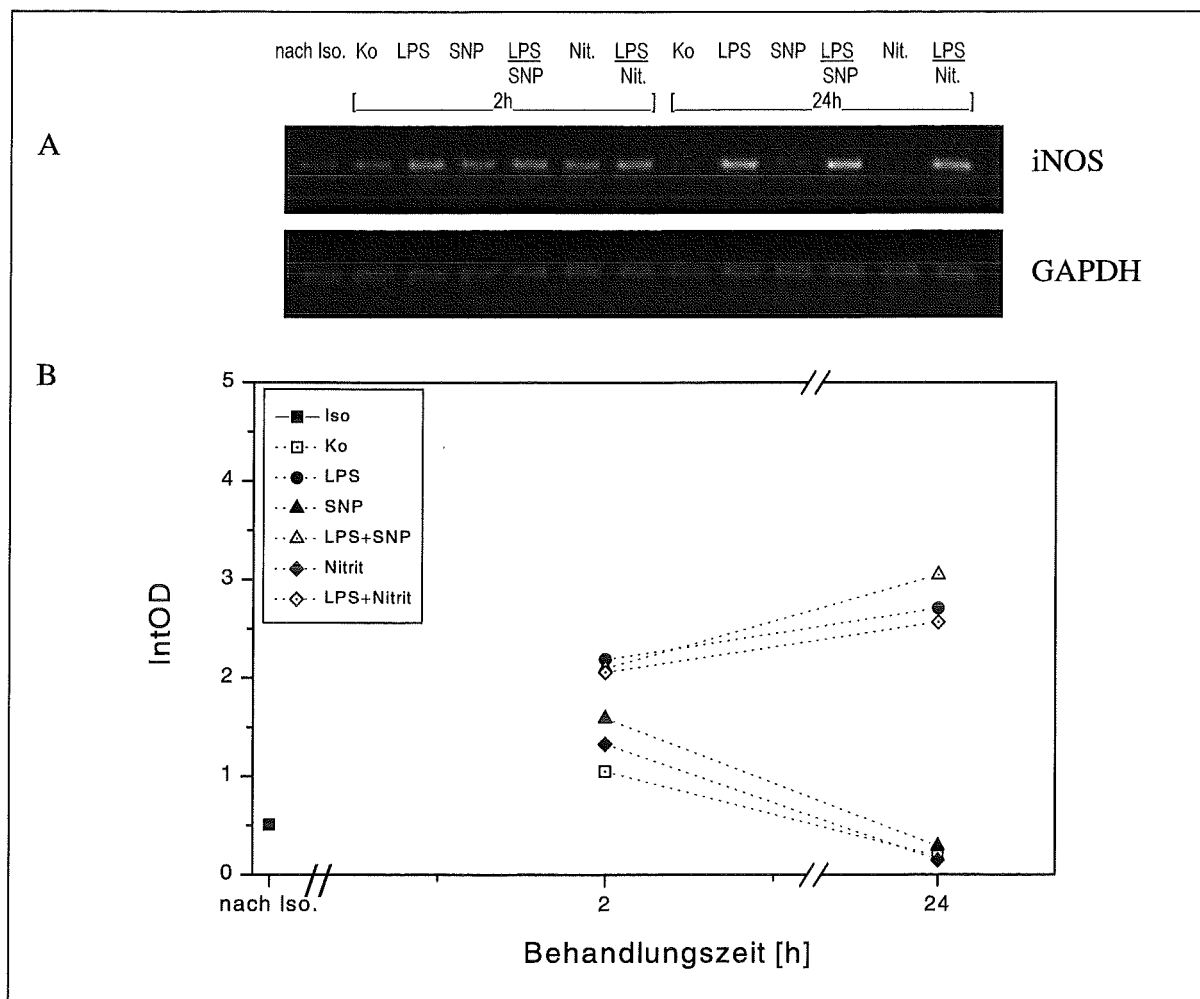


Abb. 21: Wirkung von SNP bzw. Nitrit auf die LPS-induzierte Expression der iNOS mRNA.

A: Fluoreszenz-Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte. RAM wurden 24 h nach Isolierung mit LPS [1 µg/ml], SNP [50 µM], Nitrit [10 µM], LPS/SNP, LPS/Nitrit bzw. Medium (Ko) für unterschiedliche Zeiten behandelt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA jeder Probe wurde jeweils 1 µg der RNA in eine cDNA umgeschrieben. 2 µl der cDNA-Produkte wurden für die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit einem iNOS- bzw. GAPDH-Primer-Paar eingesetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 µl der iNOS-PCR-Produkte und jeweils 24 µl der GAPDH-PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt.

B: Quantitative Analyse der Expression der iNOS mRNA. Die DNA-Banden wurden mit einer Videokamera aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde über die Messung der optischen Intensitäten (IntOD) bestimmt. Die IntOD der iNOS-PCR-Produkte wurden in Relation zur IntOD der GAPDH-PCR-Produkte dargestellt.

Eine weitere Fragestellung war, ob SNP nach einer zusätzlichen Vorinkubationszeit eine Änderung der LPS-stimulierten iNOS mRNA Expression bewirkt. Hierzu wurden RAM 2 h nach Kulturnahme mit SNP für 24 h behandelt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und frisches Medium mit SNP und/oder LPS zugegeben. Der iNOS mRNA Gehalt der Proben wurde nach weiteren 24 h bestimmt. In Abb. 22 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Die Zeitangabe in der Abbildung gibt hierbei die gesamte Behandlungszeit (48 h) wieder, d.h. 24 h Vorinkubation und 24 h Behandlung in Kombination mit LPS. LPS induzierte eine erhöhte Expression der iNOS mRNA im Vergleich zu den RAM, die im Kontrollmedium kultiviert wurden. Die 24-stündige Vorinkubation der RAM mit SNP verminderte den Gehalt an iNOS

mRNA gegenüber dem durch LPS hervorgerufenen Wert. Nach Behandlung der Zellen mit SNP ohne zusätzliche LPS-Stimulierung wurde der gleiche iNOS mRNA Gehalt wie in der Kontrolle gemessen.

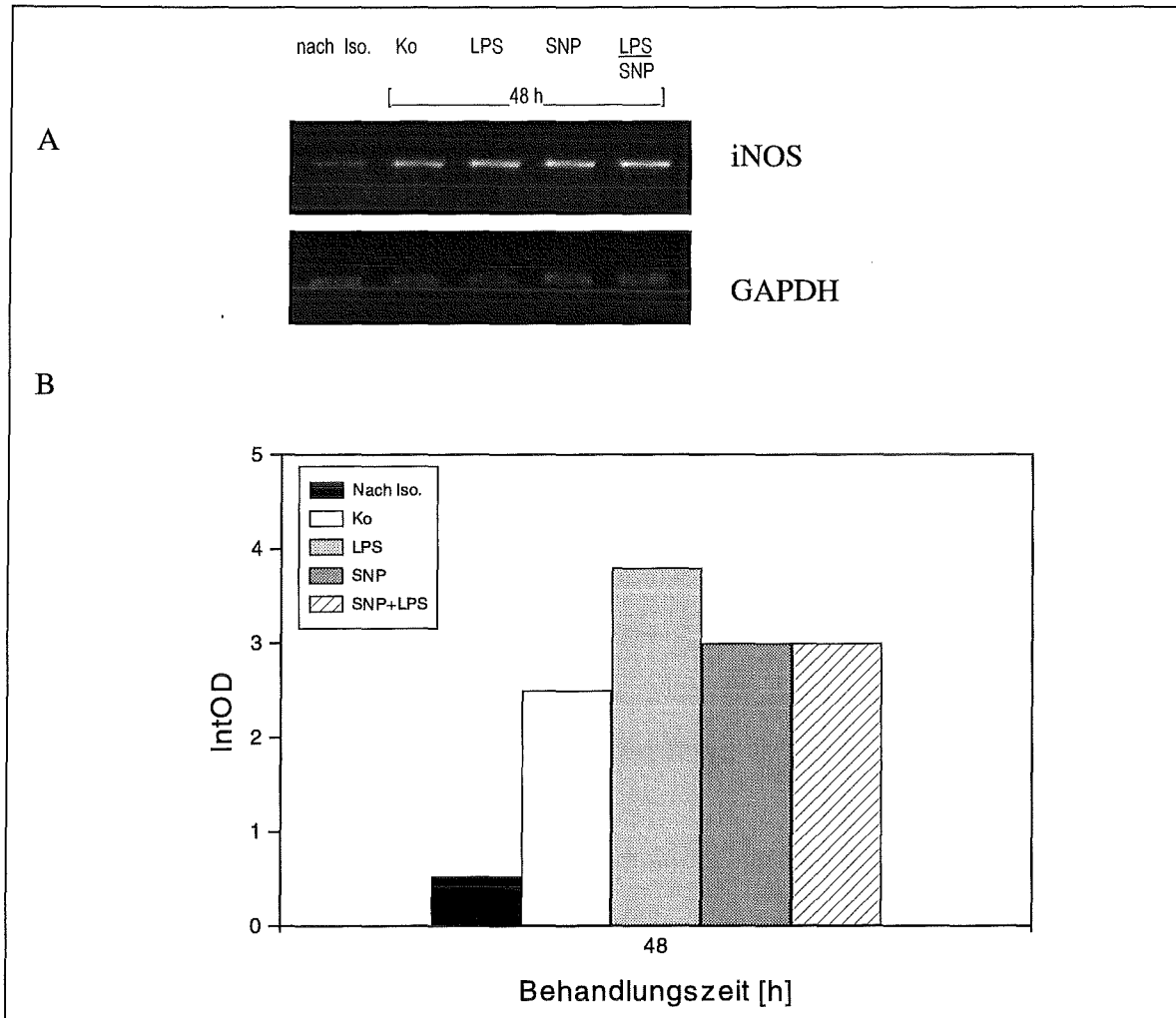


Abb. 22: Wirkung einer 24-stündigen Vorinkubation mit SNP auf die LPS-induzierte Expression der iNOS mRNA.

A: Fluoreszenz-Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte. RAM wurden 2 h nach Isolierung mit SNP [50 μ M] bzw. Medium (Ko) behandelt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und SNP und/oder LPS [0,1 μ g/ml] bzw. Medium (Ko) für weitere 24 h zugefügt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA jeder Probe wurde jeweils 1 μ g der RNA in cDNA umgeschrieben. 2 μ l der cDNA-Produkte wurden für die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit einem iNOS- bzw. GAPDH-Primer-Paar eingesetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 μ l der iNOS-PCR-Produkte und jeweils 24 μ l der GAPDH-PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt.

B: Quantitative Analyse der Expression der iNOS mRNA. Die DNA-Banden wurden mit einer Videokamera aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde über die Messung der optischen Intensitäten (IntOD) bestimmt. Die IntOD der iNOS-PCR-Produkte wurden in Relation zur IntOD der GAPDH-PCR-Produkte dargestellt.

3.2.3. Einfluß von NO₂ auf die LPS- bzw. IFN γ -induzierte iNOS mRNA Expression

Die Ergebnisse zur Nitritbildung nach NO₂-Exposition zeigten nach 24 h erhöhte Werte gegenüber den luft-begasten Zellen. Falls die NO₂-Begasung die NO-Bildung über eine Änderung der iNOS mRNA Expression beeinflusst, so müßte sich dieses während der Induktionsphase der iNOS bemerkbar machen. Daher wurde zum einen direkt nach Gasexposition und nach anschließender 5-stündiger Behandlungszeit der Gehalt an iNOS mRNA untersucht. Neben dieser Versuchsanordnung wurde der Gehalt an iNOS mRNA nach längerer Begasungszeit (5 h) unter Zusatz von Stimuli der iNOS untersucht. Hierbei sollte geklärt werden, ob eine längere Begasungszeit bei gleichzeitiger Stimulierung stärkere Effekte hervorruft. In Abb. 23 sind die Ergebnisse nach 2-stündiger Gasexposition dargestellt. Direkt nach Gasexposition konnten keine Unterschiede in der Expression der iNOS mRNA zwischen luft- und NO₂-begasten Proben festgestellt werden (nicht dargestellt). Nach anschließender 5-stündiger Behandlung mit Medium wurde auch kein Unterschied in der Expression der iNOS mRNA beobachtet. Unterschiede zwischen luft- und NO₂-begasten Proben wurden jedoch nach Behandlung mit LPS bzw. IFN γ nachgewiesen. Eine vorangehende NO₂-Exposition erhöhte die stimulierte-Expression der iNOS mRNA im Vergleich zu den luft-behandelten Zellen.

In Abb. 24 sind die Ergebnisse nach 5-stündiger Begasung dargestellt. LPS bzw. IFN γ wurden kurz vor Begasungsbeginn in das zellumgebende Medium gegeben. Während der Begasung waren diese Substanzen auch im Unterstand enthalten. Nach 5-stündiger Begasung konnten wie nach 2-stündiger Begasung keine Unterschiede in der Expression der iNOS mRNA zwischen den luft- und NO₂-begasten und mit medium-behandelten Zellen beobachtet werden. Unterschiede wurden hierbei, wie in der vorher beschriebenen Versuchsanordnung, in Kombination mit LPS bzw. IFN γ zwischen luft- und NO₂-begasten Zellen nachgewiesen. Die LPS- bzw. IFN γ -induzierte iNOS mRNA Expression war nach gleichzeitig erfolgter NO₂-Exposition gegenüber den luft-behandelten RAM erhöht.

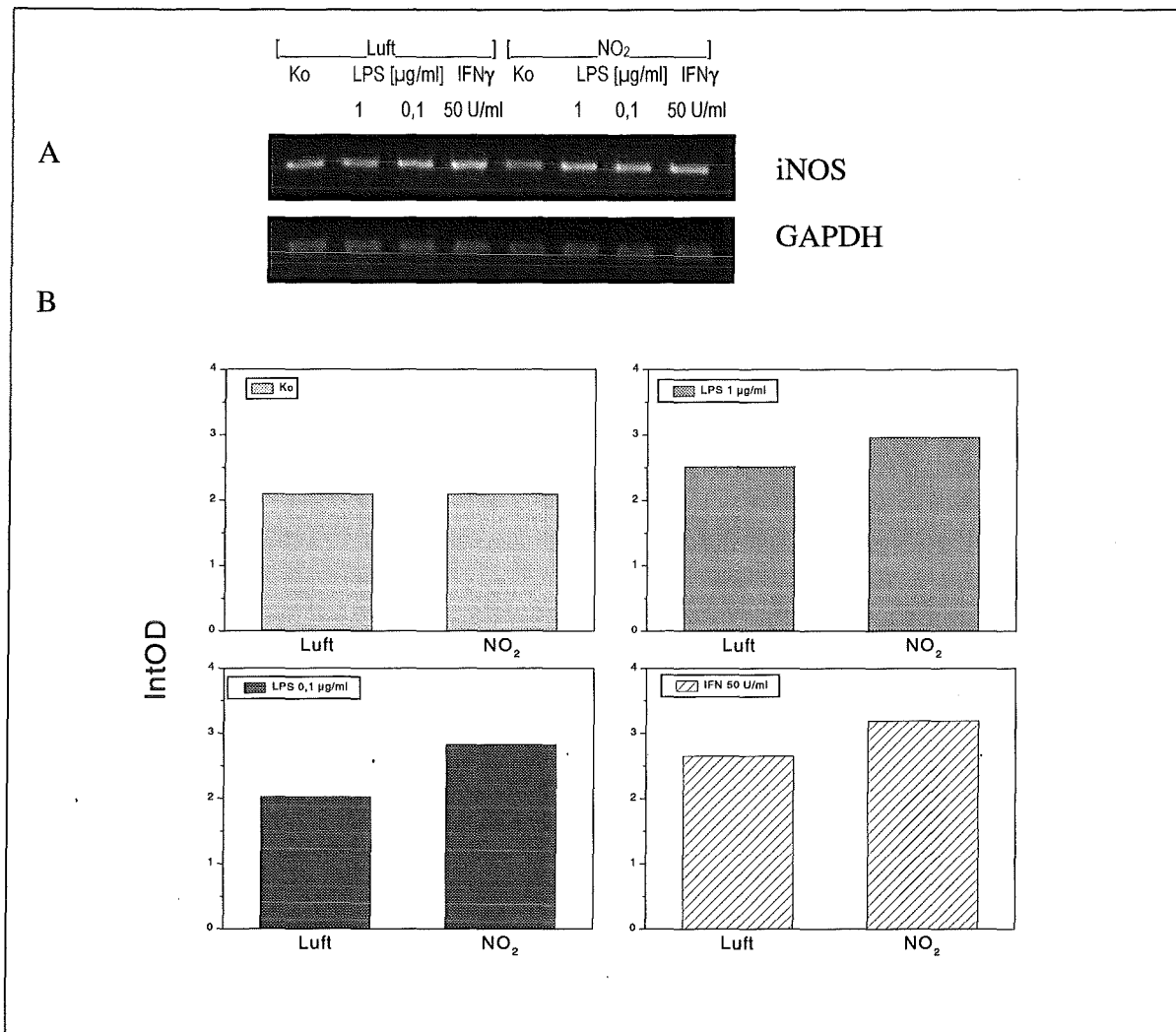


Abb. 23: Wirkung von NO₂ auf die Expression der iNOS mRNA nach 2-stündiger Gasexposition.

A: Fluoreszenz-Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte. RAM wurden 2 h mit Luft bzw. NO₂ begast, bevor sie mit LPS [0,1; 1 $\mu\text{g/ml}$], IFN γ [50 U/ml] bzw. Medium (Ko) für 5 h behandelt wurden. Nach Isolierung der Gesamt-RNA jeder Probe wurde jeweils 1 μg der RNA in cDNA umgeschrieben. 2 μl der cDNA-Produkte wurden für die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit einem iNOS- bzw. GAPDH-Primer-Paar eingesetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 μl der iNOS-PCR-Produkte und jeweils 24 μl der GAPDH-PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt.

B: Quantitative Analyse der Expression der iNOS mRNA. Die DNA-Banden wurden mit einer Videokamera aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde über die Messung der optischen Intensitäten (IntOD) bestimmt. Die IntOD der iNOS-PCR-Produkte wurden in Relation zur IntOD der GAPDH-PCR-Produkte dargestellt.

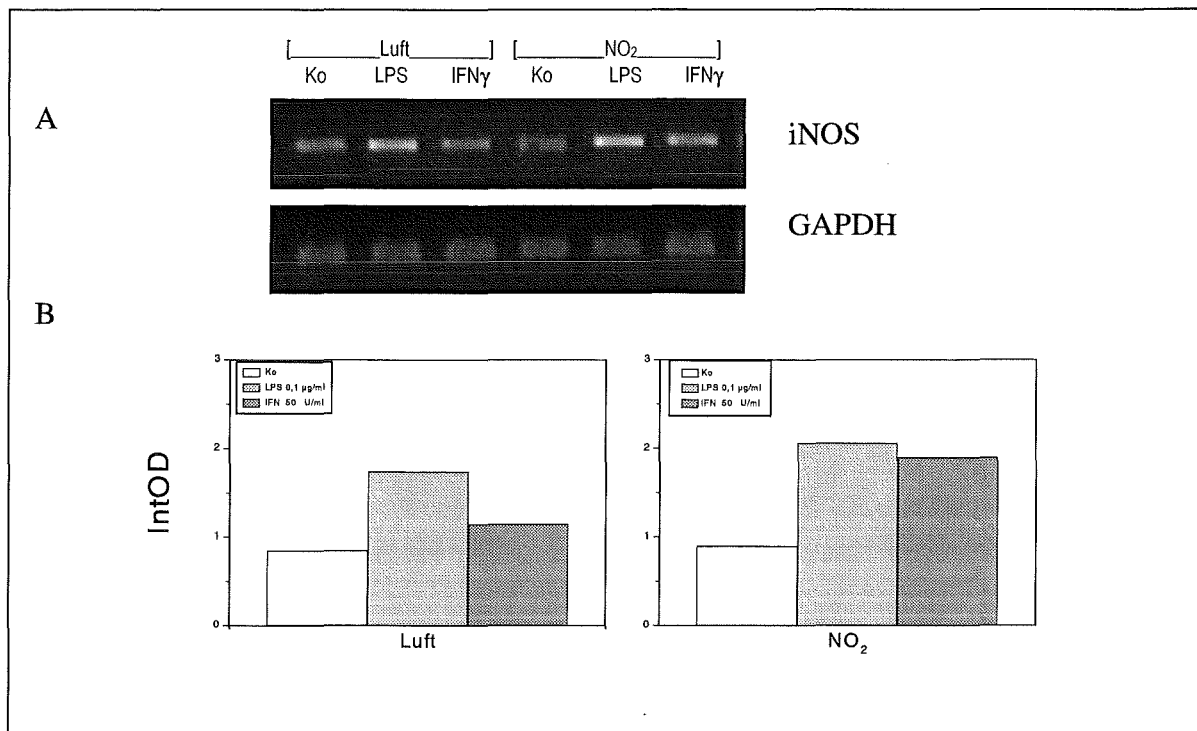


Abb. 24: Wirkung von NO₂ auf die Expression der iNOS mRNA nach 5-stündiger Gasexposition.

A: Fluoreszenz-Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte. RAM wurden für 5 h mit Luft bzw. NO₂ begast bei gleichzeitiger Behandlung mit LPS [0,1 μ g/ml], IFN γ [50 U/ml] bzw. Medium (Ko). Nach Isolierung der Gesamt-RNA jeder Probe wurde jeweils 1 μ g der RNA in cDNA umgeschrieben. 2 μ l der cDNA-Produkte wurden für die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit einem iNOS- bzw. GAPDH-Primer-Paar eingesetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 μ l der iNOS-PCR-Produkte und jeweils 24 μ l der GAPDH-PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt.

B: Quantitative Analyse der Expression der iNOS mRNA. Die DNA-Banden wurden mit einer Videokamera aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde über die Messung der optischen Intensitäten (IntOD) bestimmt. Die IntOD der iNOS-PCR-Produkte wurden in Relation zur IntOD der GAPDH-PCR-Produkte dargestellt.

Primäraktivierte RAM

Die Ergebnisse zur Expression der iNOS mRNA primäraktivierter RAM sind in Abb. 25 dargestellt. Die Aktivierung dieser Zellen in Bezug auf die NO-Bildung ist am hohen iNOS mRNA Gehalt der luft-begasten RAM deutlich erkennbar. Die gleichzeitige Behandlung der luft-exponierten Zellen mit LPS bzw. IFN γ induzierte nur eine geringfügige Erhöhung der Expression der iNOS mRNA. In den NO₂ begasten Zellen wurde eine deutliche Reduktion des iNOS mRNA Gehaltes im Vergleich zu den luft-exponierten RAM festgestellt. Die gleichzeitige Stimulierung mit LPS bzw. IFN γ führte zu einer minimalen Erhöhung des iNOS mRNA Gehaltes. Im Vergleich mit den luft-begasten iNOS mRNA Werten waren jedoch auch diese Werte vermindert.

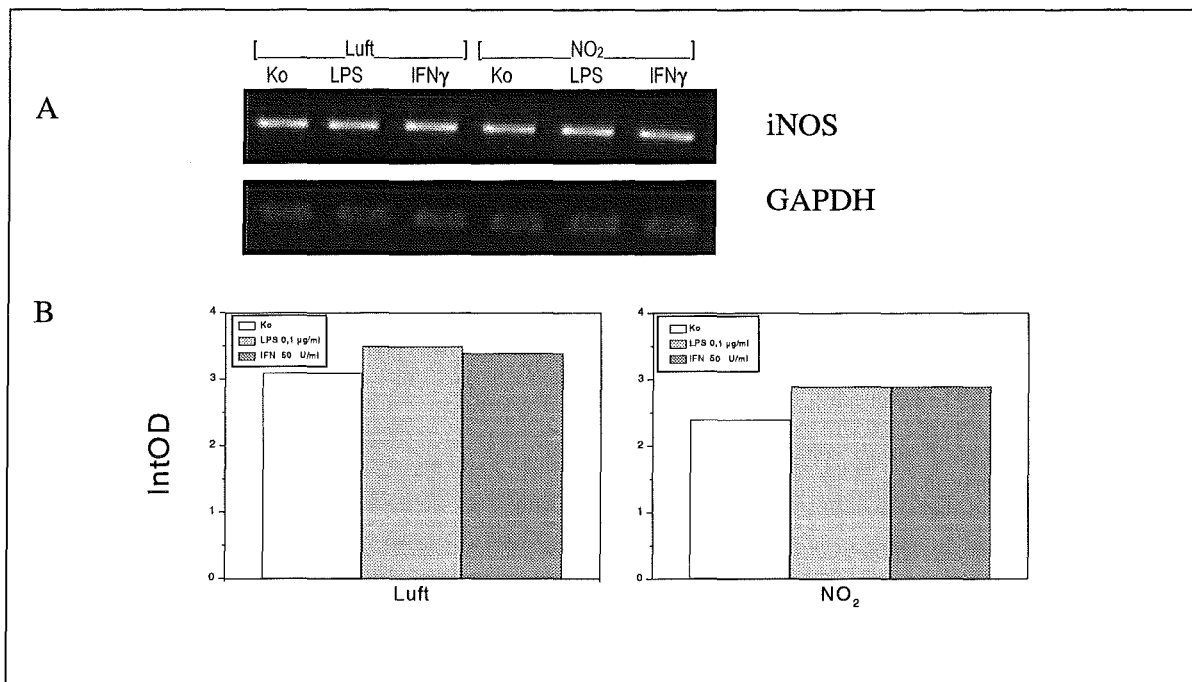


Abb. 25: Wirkung von NO $_2$ auf die Expression der iNOS mRNA primäraktivierter RAM nach 5-stündiger Gasexposition.

A: Fluoreszenz-Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten iNOS- und GAPDH-PCR-Produkte. RAM wurden für 5 h mit Luft bzw. NO $_2$ begast bei gleichzeitiger Behandlung mit LPS [0,1 μ g/ml], IFN γ [50 U/ml] bzw. Medium (Ko). Nach Isolierung der Gesamt-RNA jeder Probe wurde jeweils 1 μ g der RNA in cDNA umgeschrieben. 2 μ l der cDNA-Produkte wurden für die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit einem iNOS- bzw. GAPDH-Primer-Paar eingesetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 12 μ l der iNOS-PCR-Produkte und jeweils 24 μ l der GAPDH-PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt.

B: Quantitative Analyse der Expression der iNOS mRNA. Die DNA-Banden wurden mit einer Videokamera aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde über die Messung der optischen Intensitäten (IntOD) bestimmt. Die IntOD der iNOS-PCR-Produkte wurden in Relation zur IntOD der GAPDH-PCR-Produkte dargestellt.

3.3 Untersuchungen zur NO-Bildung in RAW 264.7 Makrophagen

Die Maus-Monozyten Zelllinie RAW 264.7 wurde für die Untersuchungen der Wirkung von NO $_2$ auf die NO-Bildung zusätzlich herangezogen, um eine Aussage über die iNOS-Proteinbildung nach NO $_2$ -Exposition machen zu können. Denn es stellte sich heraus, daß käufliche anti-iNOS Antikörper lediglich eine Spezifität für Maus, Ratte und Mensch und, wie in mehreren Experimenten, nachvollzogen eine zu geringe Spezifität für das iNOS Protein von RAM besitzen (Adler *et al.*, 1995). Aus diesem Grund wurden RAW Makrophagen zur Untersuchung der iNOS-Proteinbildung nach NO $_2$ -Exposition eingesetzt. In Vorversuchen wurde die NO-Bildung in Abhängigkeit von LPS bestimmt. In Abb. 26 sind diese Ergebnisse zusammengefaßt. Nach 24-stündiger Behandlung wurden erhöhte Nitritwerte nachgewiesen.

Die Nitritgehalte nahmen nach weiteren 24 h deutlich zu. Die Nitritbildung nach Stimulierung mit LPS wies in RAW-Makrophagen einen zeit- und konzentrations-abhängigen Verlauf auf. Ein Vergleich der LPS-induzierten Nitritbildung von RAW-Makrophagen mit RAM zeigt, das Behandlung mit LPS in RAW-Makrophagen eine wesentlich höhere Nitritbildung zur Folge hat als in RAM.

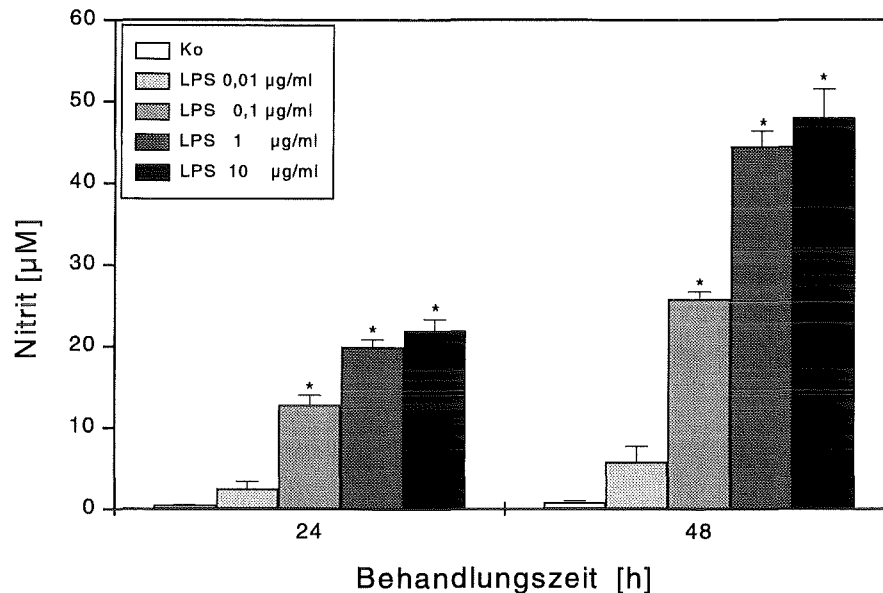


Abb. 26: Zeitverlauf der LPS-stimulierten Nitritbildung. RAW 264.7 Makrophagen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS [0,01-10 µg/ml] bzw. Medium (Ko) behandelt. Nach den angegebenen Zeiten wurde in den Kulturüberständen der Gehalt an Nitrit [µM] bestimmt.

Die Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Versuchen.

* steht für signifikant verschieden von der Kontrolle für $p < 0.05$

3.3.1 Zeitverlauf der LPS-induzierten iNOS-Proteinbildung

Für die Untersuchungen zur Wirkung von NO_2 auf die iNOS-Proteinbildung wurde zuerst der Zeitverlauf der LPS-induzierten iNOS Proteinbildung in RAW 264.7 Makrophagen bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit LPS in einer Konzentration von [1 µg/ml] bzw. Medium als Kontrolle unterschiedlich lang behandelt. Der Nachweis des iNOS Proteins erfolgte mit einem spezifischen Antikörper mittels Western Blot (siehe 2.7.) In der Abb. 27 ist deutlich zu erkennen, daß nach 6-stündiger Stimulierung mit LPS das iNOS Protein gebildet ist. Eine längere Behandlungszeit geht mit erhöhter Proteinbildung einher. In der Kontrolle konnte zu keiner Zeit das iNOS Protein nachgewiesen werden.

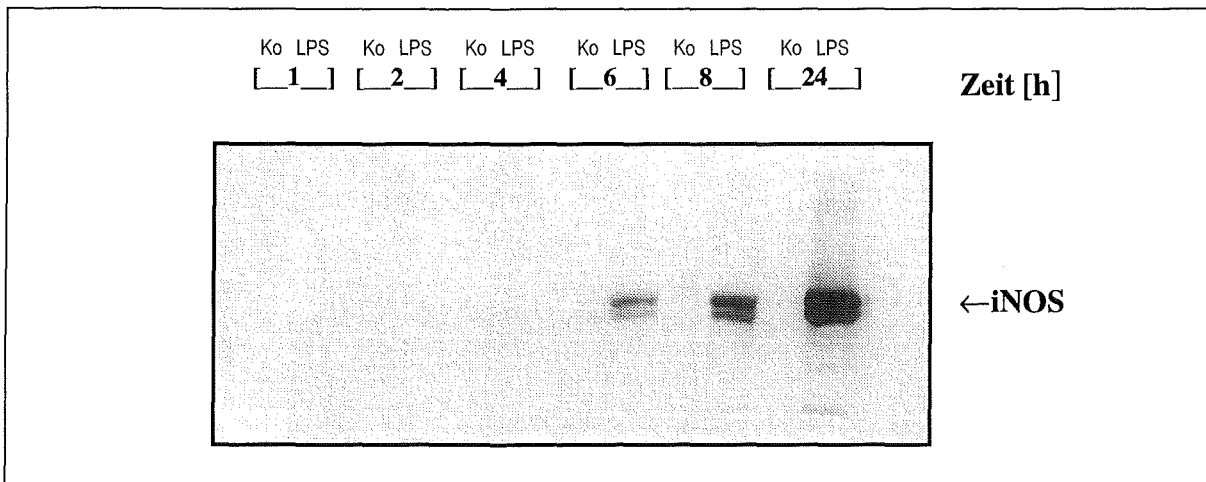


Abb. 27: Zeitverlauf der iNOS-Proteinbildung in RAW 264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden mit LPS [1 µg/ml] bzw. Medium (Ko) für unterschiedliche Zeiten behandelt. Der Nachweis des iNOS Proteins erfolgte nach Auftrennung von Ganzzelextrakten in einem 7,5% SDS-Gel durch einen spezifischen Antikörper mittels Western Blot.

3.3.2 Wirkung von NO₂ auf die Bildung des iNOS-Proteins

Die Wirkung von NO₂ auf die iNOS-Proteinbildung wurde in Abhängigkeit von Inhibitoren untersucht. Dies sollte einen Hinweis auf den Wirkungsmechanismus von NO₂ auf die NO-Bildung liefern. Hierzu wurde ein Teil der Proben mit C11AG, einen Hemmstoff der neutralen Sphingomyelinase, bzw. Indomethacin, einen Hemmstoff der Cyclooxygenase, vor Begasung für 20 min behandelt. Diese Substanzen waren auch während der 5-stündigen Begasung dem Unterstand zugefügt. Als Stimulus der NO-Biosynthese wurde LPS eingesetzt. In Abb. 28 sind die Ergebnisse nach erfolgter Detektion des iNOS Proteins dargestellt. In der oberen Hälfte der Abbildung markiert der Pfeil das iNOS Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa. In der unteren Hälfte ist ein Ausschnitt der unspezifischen Bindung des Antikörpers abgebildet. Die gleichförmige unspezifische Bindung in allen Spalten beweist, daß gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. In den ersten 6 Spalten sind die luft-begasten Proben aufgetragen, in den folgenden 6 Spalten die NO₂-begasten. In der mit Medium behandelten Kontrolle konnte sowohl nach Luft- als auch NO₂-Begasung kein iNOS-Protein nachgewiesen werden. Auch die Behandlung mit den Hemmstoffen allein hatte keinen Effekt. LPS induzierte während der 5-stündigen Gasexposition die iNOS Proteinbildung. Die NO₂-Exposition erhöhte geringfügig aber sichtbar die LPS-induzierte iNOS-Proteinmenge. Behandlung der Zellen mit C11AG führte in den luft-begasten Proben zu einer vollständigen Hemmung der LPS-induzierten Proteinbildung. In den NO₂-begasten Proben wurde keine

vollständige Reduktion der LPS-induzierten iNOS Proteinbildung durch C11AG beobachtet (Vergleich der Spalten 4 (Luft) mit 10 (NO₂)). Indomethacin reduzierte die LPS-induzierte iNOS Proteinbildung in den luft- und NO₂-begasten Proben. Ein Vergleich der Spalten 6 mit 12 zeigt, daß der hemmende Effekt von Indomethacin in den NO₂ begasten Proben stärker ausgeprägt ist.

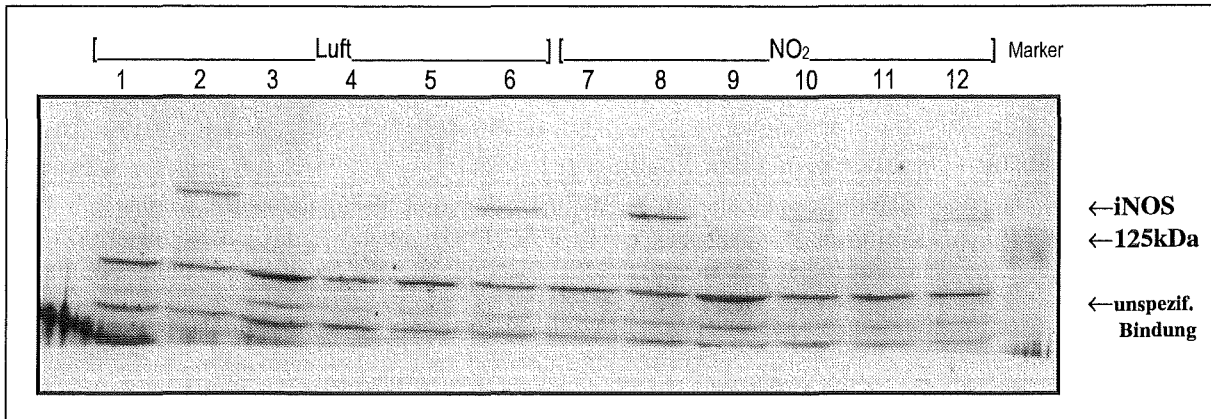


Abb. 28: Wirkung von NO₂ auf die iNOS Proteinbildung in RAW 264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden für 5 h mit Luft bzw. NO₂ begast bei gleichzeitiger Behandlung mit LPS [0,1 µg/ml], C11AG [0,5 µg/ml], Indomethacin [1 µM], LPS/C11AG, LPS/Indomethacin oder Medium (Ko). Der Nachweis des iNOS Proteins erfolgte nach Auftrennung von Ganzzellextrakten in einem 7,5% SDS-Gel durch einen spezifischen Antikörper mittels Western Blot. In den Bahnen 1-12 sind folgende Proben aufgetragen:

Luft: 1, Ko; 2, LPS; 3, C11AG; 4, LPS/C11AG; 5, Indomethacin; 6, LPS/Indomethacin;

NO₂: 7, Ko, 8, LPS; 9, C11AG; 10, LPS/C11AG; 11, Indomethacin; 12, LPS/Indomethacin.

4 Diskussion

Stickstoffdioxid (NO_2) ist ein wesentlicher Bestandteil der Luftverunreinigung. Seine schädigende Wirkung auf die Atemwege konnte in mehreren Studien belegt werden (Morrow, 1984). Der Mechanismus dieser Schädigung ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Als Zielzellen im Respirationstrakt gelten in erster Linie die Epithelien der Atemwege und die Alveolarmakrophagen (AM). AM nehmen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr der Lunge ein, da sie eine wichtige Quelle proinflammatorischer Mediatoren darstellen. Ziel dieser Arbeit war es die Wirkung von NO_2 in einer umweltrelevanten Konzentration auf Immunfunktionen von Alveolarmakrophagen zu beschreiben. Als umweltrelevante Konzentration wurde hierfür 0,2 ppm NO_2 und Begasungszeiten von 1, 2 bzw. 5 h gewählt. Diese Konzentration ist zwar höher als maximal gemessene Werte der Außenluft in Deutschland, entspricht jedoch Spitzenwerten in der Innenluft. In Großstädten, wie Mexiko (Stadt) und Dehli, werden in der Außenluft u.a. auf Grund des hohen Verkehrsaufkommens und geringer Maßnahmen zur Reinhaltung der Luft, Konzentrationen im Bereich von 0,2 ppm NO_2 gemessen.

Als Untersuchungsmodell wurden Rinderalveolarmakrophagen ausgewählt (RAM). RAM haben sich bereits in vorangegangenen Studien zur Untersuchung des Einflusses von Schadgasen auf Immunfunktionen von Makrophagen als geeignetes Modell erwiesen (Lind, 1993; Mosbach, 1994). Das Arbeiten mit RAM hatte den großen Vorteil, daß es sich um primär gewonnene Zellen handelte, d.h. es konnte die Wirkung des Schadgases NO_2 auf Zellen, welche frisch aus einem Organismus isoliert wurden, untersucht werden. Diese Zellen stellen ein relativ naturgetreues Modell dar, im Gegensatz zu Zelllinien, welche oftmals bestimmte Eigenschaften der Zellen, deren Modell sie darstellen, verloren haben oder nicht besitzen. Es muß jedoch deutlich hervorgehoben werden, daß das Arbeiten mit primär isolierten Zellen, andere Schwierigkeiten beinhaltet, welche mit Zelllinien nicht auftreten. So mußten für die Untersuchungen Zellen von einer Vielzahl unterschiedlicher Tiere unbekannter Herkunft verwendet werden. Daher war zu erwarten, daß sich diese Zellen in Abhängigkeit ihres genetischen Potentials und der vorher bestehenden Lebensbedingungen unterscheiden. Bei den Untersuchungen konnten so zwei prinzipielle Einteilungen an Zellpopulationen vorgenommen werden: RAM, welche nach Kulturnahme keine oder nur eine geringe Spontansekretion an Zytokinen aufwiesen, und sogenannte primäraktivierte RAM, welche

nach Kulturnahme ohne zusätzlichen Stimulus bereits Zytokine sezernierten. Die genauen Gründe für diese Primäraktivierung sind nicht bekannt. Der aktivierte Zustand dieser Makrophagen deutet jedoch daraufhin, daß diese Zellen aus einem entzündeten oder vorgeschädigten Lungengewebe entstammen. Dies bestätigen Untersuchungen mit Alveolarmakrophagen von Patienten mit fibrotischen, interstitiellen Lungenerkrankungen. Diese Zellen weisen z.B. eine erhöhte Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) Sekretion im Vergleich zu Alveolarmakrophagen von Gesunden auf (Zhang *et al.*, 1993). Die Exposition von RAM mit NO₂ zeigte in Abhängigkeit von dem Immunstatus der Zellen, d.h. primäraktiviert oder nicht, eine unterschiedliche Wirkungsweise von NO₂. Aus diesem Grund wird die Reaktion primäraktivierter Zellen nach Gasexposition getrennt von der Reaktion nicht primäraktivierter betrachtet und auch im folgenden Text diskutiert.

Zur Beschreibung der Wirkung von NO₂ wurde die Freisetzung von Entzündungsmediatoren nach Gasexposition bestimmt. Bei den untersuchten Mediatoren handelte es sich um TNF- α , Prostaglandin E₂ (PGE₂), Superoxidanionenradikal (Superoxidanion) und Stickstoffmonoxid (NO). Die NO-Bildung durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wurde hierbei in Form von Nitrit, einem stabilen Oxidationsprodukt der NO-Bildung, ermittelt. Die Begasung der Zellen mit NO₂ führte durch in Lösung gegangenes NO₂ ebenso zu einer erhöhten Nitritkonzentration im Medium. Um die gezeigten Effekte nach NO₂-Exposition spezifisch auf eine Wirkung von NO₂ auf die NO-Bildung zurückzuführen, wurden zusätzlich zur Nitritbildung, die Expression der iNOS mRNA und die iNOS Proteinbildung nach Gasexposition bestimmt.

Außerdem wurden Faktoren, welche die NO-Biosynthese beeinflussen näher untersucht, um Aufschluß über den Mechanismus der NO₂ Wirkung zu erhalten. Dazu wurde die NO-Bildung in RAM charakterisiert.

Die Begasung der Zellen mit NO₂ verursachte keine Abnahme der Vitalität. Zwischen luft- und NO₂-exponierten Zellen konnten direkt nach Gasexposition bzw. nach anschließender Stimulierung keine Unterschiede bezüglich der Vitalität festgestellt werden. Vitalitätsverluste nach NO₂-Exposition werden jedoch dosisabhängig nach Begasung mit höheren NO₂-Konzentrationen beobachtet. Dies bestätigen mehrere Untersuchungen: die Exposition von Nichtrauchern mit 0,6 ppm NO₂ führte zu keiner signifikanten Vitalitätsänderung der Alveolarmakrophagen (Smeglin *et al.*, 1986). NO₂-Konzentrationen im Bereich von 5 und 10 ppm reduzierten dagegen signifikant die Vitalität der Alveolarmakrophagen von Mäusen,

nach Exposition mit 2 ppm NO₂ wurde dies nicht beobachtet (Davis *et al.*, 1992). Die Exposition von RAM mit 3 ppm NO₂ für zwei Stunden induzierte eine ca. 15% Reduktion der Vitalität (Lind, 1993). Unterschiede in der Sekretion von Mediatoren nach NO₂-Exposition, die in dieser Arbeit festgestellt wurden, können folglich nicht auf einer verminderten Vitalität beruhen.

Einfluß von NO₂ auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in RAM

Zur Untersuchung der Wirkung von NO₂ auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wurde deren Gehalt direkt nach Gasexposition bzw. nach anschließender Stimulierung gemessen. Als Stimuli wurden Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon γ (IFN γ) verwendet. LPS ist ein makromolekulares Glykolipid, das Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien ist. Seine Lipidkomponente, das sogenannte Lipid A, ist für die biologische Wirkung verantwortlich, die über die Aktivierung immunkompetenter Zellen bis hin zum septischen Schock und zum Multiorganversagen führen kann (Rietschel *et al.*, 1982; Tracey und Cerami, 1989). IFN γ wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen (*natural killer cells*) synthetisiert. IFN γ wurde ursprünglich auf Grund seiner antiviralen Aktivität entdeckt (Wheelock, 1965). Die Eigenschaften von IFN γ beinhalten jedoch die Regulation mehrerer verschiedener Aspekte der Immunantwort. Dazu gehören Stimulierung der Antigenpräsentation durch die Haupthistokompatibilitätskomplexe MHC 1 und 2, Wirkung auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion, die Zellproliferation und Apoptose (Boehm *et al.*, 1997).

Beide Substanzen induzieren in Makrophagen eine Immunreaktion, die mit der Sekretion von Mediatoren einhergeht. In den Versuchen konnte gezeigt werden, daß die NO₂-Exposition einen deutlichen Effekt auf die stimulierte Freisetzung von Entzündungsmediatoren hat. Ohne zusätzlichen Stimulus blieb die Sekretion der Mediatoren weitgehend unbeeinflusst.

Nach 2-stündiger NO₂-Exposition wurde eine Erhöhung der LPS-induzierten TNF- α Sekretion im Vergleich zu luft-begasteten RAM festgestellt (Abb. 2). Dieser Effekt wurde nach 1-stündiger Gasexposition noch nicht beobachtet (Abb. 1). Mit humanen Makrophagen wurde analog eine Erhöhung der LPS-induzierten TNF- α Sekretion nach NO₂-Exposition in einer Konzentration von 0,1 ppm nachgewiesen (Kienast *et al.*, 1993). Mehrere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen, welche zum Teil mit höheren NO₂-Konzentrationen (1,5; 3 und 10 ppm)

durchgeführt wurden, zeigten dagegen einen hemmenden Effekt auf die stimulierte-TNF- α Sekretion. Allerdings wurde ebenfalls kein Effekt auf die unstimulierte TNF- α Sekretion von Makrophagen beobachtet (Erroi *et al.*, 1996; Kienast *et al.*, 1993, 1996; Polzer *et al.*, 1994). Ein induktiver Effekt auf die Synthese von TNF- α mit einer niedrigen NO₂-Konzentration konnte bisher nur in einer Untersuchung mit humanen Bronchialepithel gezeigt werden. Eine NO₂-Konzentration von 0,4 ppm über einen Zeitraum von 6 h induzierte die Synthese von TNF- α und weiteren proinflammatorischen Zytokinen (Devalia *et al.*, 1993). Dies könnte in einer unterschiedlichen Empfindlichkeit von Makrophagen und Bronchialepithelzellen und/oder einer verschiedenen Reaktion dieser beiden Lungenzellen auf das Schadgas NO₂ begründet sein. Die hier aufgeführten Wirkungen von NO₂ auf die TNF- α Sekretion deuten daraufhin, daß niedrige NO₂-Konzentrationen die TNF- α Freisetzung verstärken, hohe NO₂-Konzentrationen dagegen hemmend wirken. Inwieweit dies auf einer unterschiedlichen Wirkung von NO₂ in Abhängigkeit der Konzentration beruht, muß durch weitere Experimente, welche den niedrigen und hohen Konzentrationsbereich berücksichtigen, abgesichert werden. Für die Hypothese sprechen Untersuchungen zum Einfluß von NO₂ auf den Arachidonsäuremetabolismus. Robison und Mitarbeiter (1993) zeigten, daß niedrige NO₂-Konzentrationen (0,1-5 ppm) keinen Einfluß auf den basalen Metabolismus haben, jedoch die stimulierte Synthese von Cyclo- und Lipoxygenase Produkten verstärken. Begasung mit einer hohen NO₂-Konzentration (20 ppm) zeigte das gegenteilige Reaktionsprofil. Eine in Abhängigkeit der NO₂-Konzentration verschiedene Wirkung auf die Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten gemessen in der bronchoalveolären Lavage von Kaninchen wurde auch nach *in vivo* Exposition festgestellt (Schlesinger *et al.*, 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde als Arachidonsäuremetabolit die Sekretion von PGE₂ bestimmt. Direkt nach 2-stündiger Gasexposition konnte kein PGE₂ nachgewiesen werden. Eine anschließende 5-stündige Behandlung der RAM mit LPS bzw. IFN γ induzierte jedoch die Sekretion von PGE₂ (Abb. 3,4). Der Gehalt an PGE₂ war in den Kulturüberständen der NO₂-exponierten signifikant gegenüber den luft-begasteten Zellen erhöht. Diese Ergebnisse bestätigen die vorher beschriebene Wirkung von NO₂: eine niedrige NO₂-Konzentration beeinflußt den basalen Metabolismus der Arachidonsäure nicht, verstärkt jedoch die stimulierte Synthese hier von PGE₂.

Die Bildung von Superoxidanionen wurde nach Gasexposition und anschließender Stimulierung mit Zymosan gemessen. Begasung mit NO₂ verminderte die zymosan-

stimulierte Superoxidanionen-Produktion im Vergleich zu den luft-begasten Proben (Abb. 6). Im Gegensatz zu der vorher beschriebenen konzentrationsabhängig unterschiedlichen Wirkung von NO_2 scheint dieser Effekt auf die Bildung von Superoxidanionen nicht zu zutreffen. Denn mehrere Studien beschreiben eine hemmende Wirkung von NO_2 auf die stimulierte Superoxidanionen Produktion sowohl nach Begasung mit niedrigen als auch höheren NO_2 -Konzentrationen (Lind, 1992). Amoruso und Mitarbeiter (1981) beobachteten eine verminderte Superoxidanionenbildung von AM nach NO_2 -Exposition in einem Konzentrationsbereich von 6 bis 17 ppm über die Dauer von 3 Stunden. Die Untersuchung von Robison und Mitarbeiter (1993) bestätigt, daß eine niedrige Konzentration in der gleichen Weise wirkt. Hierbei wurden Ratten mit einer NO_2 -Konzentration von 0,5 ppm über die Zeiträume von 0,5 bis 10 Tage exponiert. Die *ex vivo* PMA(Phorbolmyristylacetat)-stimulierte Superoxidanionenbildung von AM war zu jedem Zeitpunkt signifikant gegenüber der luft-begasten Kontrolle vermindert.

Die Wirkung von NO_2 auf die NO-Bildung der RAM wurde nach 2-stündiger Gasexposition und anschließender Behandlung mit LPS gemessen. LPS induzierte in luft- und NO_2 -begasten Zellen die NO-Bildung, die hier in Form von Nitrit gemessen wurde (Abb. 7). Die NO_2 -begasten Zellen wiesen erhöhte Nitritwerte nach 24-stündiger LPS-Behandlung im Vergleich zu luft-exponierten Zellen auf. Ohne anschließende LPS-Stimulierung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen luft- und NO_2 -begasten Zellen beobachtet werden. In Abb. 7 ist deutlich zu erkennen, daß im Unterstand der NO_2 -begasten RAM erhöhte Nitritkonzentrationen gemessen wurden. Dieser Gehalt an Nitrit beruhte nicht auf endogener NO-Bildung. Dies konnte durch Begasungsexperimente ohne Zellen bestätigt werden. Außerdem führte L-NMMA, ein Hemmstoff der iNOS, nicht zur Reduktion der Nitritbildung. Um eine vorgetäuschte Wirkung von NO_2 durch gelöstes NO_2 auf die NO-Bildung auszuschließen, wurde zusätzlich zur Nitritbildung, die Expression der iNOS mRNA und die iNOS Proteinbildung nach Gasexposition bestimmt. Gleichzeitig wurden Faktoren, welche die NO-Biosynthese beeinflussen näher untersucht, um Aufschluß über den Mechanismus der NO_2 -Wirkung zu erhalten. Auf diese Ergebnisse wird im Verlauf der weiteren Diskussion eingegangen.

In der Literatur ist keine Untersuchung zur Wirkung von NO_2 auf die NO-Bildung von Makrophagen beschrieben. Bisher wurde der Einfluß des Schadgases Ozon auf die NO-Bildung von Alveolarmakrophagen von Ratten untersucht (Pendino *et al.*, 1993). Hierbei wurde durch die Ozonbegasung (1 bis 2 ppm, 3 h) ein induktiver Effekt auf die NO-Bildung

festgestellt. Eine anschließende *in vitro* Behandlung der AM mit LPS bzw. IFN γ zeigte eine erhöhte NO-Bildung in den Ozon-begasten Ratten im Vergleich zur luft-begasten Kontrolle. Die Ozonbehandlung zeigte hierbei im Vergleich zur oben beschriebenen Wirkung von NO $_2$ einen induzierenden Effekt auf die NO-Bildung. Dies könnte darin begründet sein, daß für Ozon und NO $_2$ unterschiedliche Wirkungsmechanismen diskutiert werden (Schlesinger *et al.*, 1990). In vergleichenden Studien zur Wirkung der beiden Schadgase wird Ozon als 10-40fach toxischer als NO $_2$ eingeschätzt und dies wurde auf das größere oxidative Potential von Ozon zurückgeführt (Freeman *et al.*, 1974; Mustafa *et al.*, 1984; Rietjens *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1980). Abgesehen von den unterschiedlich gewählten Konzentrationen der beiden Schadgase, könnte dies eine weitere Erklärung für die induzierende Wirkung von Ozon auf die NO-Bildung von AM sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die NO $_2$ -Exposition die stimulierte Freisetzung von Entzündungsmediatoren in RAM deutlich beeinflusst. Neben den hier gezeigten Veränderungen der Sekretion von Mediatoren, sind in der Literatur weitere Effekte von NO $_2$ auf die Immunfunktionen von AM beschrieben. Hierzu zählen eine Veränderung der Phagozytoserate, der bakteriziden Aktivität, der Freisetzung von Interferon und eine Veränderung in der Reaktion auf den Makrophagen inhibitorischen Faktor (Bouley *et al.*, 1986; DeNicola *et al.*, 1981; Frampton *et al.*, 1989; McGrath und Wong, 1987; Morrow, 1984; Rose *et al.*, 1988; Schlesinger, 1987; Sone *et al.*, 1983). Somit kann davon ausgegangen werden, daß NO $_2$ eine weitreichende immunomodulatorische Wirkung hat.

Einfluß von NO $_2$ auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren primäraktivierter RAM

Primäraktivierte Makrophagen zeichneten sich durch die Sekretion von Mediatoren ohne zusätzlichen Stimulus aus. Die erhöhte Sekretion bestimmter Mediatoren war in einigen Versuchsreihen besonders deutlich in bezug auf die Freisetzung von PGE $_2$ und NO ausgeprägt. Diese Zellen reagierten in anderer Weise auf die NO $_2$ -Exposition als Makrophagen ohne Primäraktivierung. Die Versuchsergebnisse zeigten, daß die NO $_2$ -Exposition einen hemmenden Effekt auf die PGE $_2$ -Freisetzung und NO-Bildung primäraktivierter RAM hat. Die PGE $_2$ -Freisetzung war nach 2-stündiger Gasexposition und anschließender 5-stündiger Inkubation deutlich gegenüber der luft-begaster RAM vermindert (Abb. 5). Zugabe von IFN γ führte in den luft-begasten Zellen zu einer weiteren Erhöhung der PGE $_2$ -Sekretion. Dies wurde nach NO $_2$ -Exposition nicht beobachtet. LPS induzierte keine

weitere Freisetzung von PGE₂. Nach Behandlung mit LPS wurden zwischen luft- und NO₂-begasten Zellen nur geringe Unterschiede beobachtet.

Die NO-Bildung dieser aktivierten Zellen konnte bereits im Unterstand, also während der 2-stündigen Begasungszeit, in Form von Nitrit nachgewiesen werden (Abb. 8). Durch den Zusatz von L-NMMA, einem Hemmstoff der NO-Biosynthese, wurde der Nitritgehalt im Unterstand von luft- und NO₂-begasten Zellen reduziert. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation wurden in den NO₂-begasten Proben im Vergleich zu luft-begasten Zellen signifikant verminderte Nitritgehalte gemessen. Eine nach Gasexposition durchgeführte 24-stündige Behandlung mit LPS reduzierte in luft- und NO₂-exponierten RAM die Konzentration von Nitrit im Medium. Dieser hemmende Effekt durch eine zusätzliche Gabe von LPS wurden auch von anderen Autoren beschrieben (Bogdan *et al.*, 1993). Die Ergebnisse mit primäraktivierten RAM zeigen, daß eine NO₂-Exposition die bereits vorhandene Freisetzung von PGE₂ und NO nicht verstärkt, sondern vermindert.

Im Vergleich mit den Ergebnissen nicht primäraktivierter RAM wird deutlich, daß eine umweltrelevante NO₂-Exposition in Abhängigkeit vom Immunstatus der Zellen unterschiedliche Wirkungen hervorruft. Dies wurde bei Untersuchungen zum Einfluß von Ozon ebenfalls beobachtet (Mosbach, 1994). Aktivierte Makrophagen zeigten auch hier eine Hemmung der Freisetzung bestimmter Zytokine nach Exposition mit dem Schadgas.

Charakterisierung der NO-Bildung von RAM

Makrophagen und bestimmte andere Zelltypen, wie Endothelzellen, Fibroblasten und Herzmuskelzellen, sind in der Lage NO über eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) zu bilden. Die iNOS ist in ruhenden Zellen nicht exprimiert, wie der Name sagt, wird die Synthese des Enzyms induziert. Mehrere Untersuchungen bestätigen, daß die Induktion auf Transkriptionsebene erfolgt (Lorsbach *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1993). In Abhängigkeit von der Spezies und dem Zelltyp werden jedoch große Unterschiede in der Induktion sowie der Regulation der NO-Bildung festgestellt (Nussler und Billiar, 1993; Xie und Nathan, 1994). Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der NO-Bildung von RAM. Dabei wurden auch Faktoren berücksichtigt, welche u.U. die Wirkungsweise von NO₂ auf die NO-Bildung klären können. Die Untersuchung der NO-Bildung von RAM erfolgte auf der Ebene der Nitritbildung und der Expression der iNOS mRNA. Im folgenden Text werden zuerst die Ergebnisse zur Nitritbildung und anschließend die zur Expression der iNOS mRNA diskutiert.

Zu den typischen Stimuli der iNOS gehören LPS und IFN γ . In Abb. 9 ist zu erkennen, daß LPS zeit- und konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der Nitritproduktion führt. Dieser induzierende Effekt von LPS auf die NO-Bildung wurde für Makrophagen des Rindes und andere Spezies beschrieben (Adler *et al.*, 1995; Ding *et al.*, 1988; Mason *et al.*, 1996). IFN γ induzierte als Einzelgabe die NO-Bildung und verstärkte in geringen Mengen die LPS-induzierte NO-Bildung (Abb. 10, 11). Adler und Mitarbeiter (1995) konnten an knochenmark-abgeleiteten Rindermakrophagen keine induzierende und keine verstärkende Wirkung von IFN γ auf die NO-Bildung feststellen. Mit Alveolarmakrophagen des Rindes wurde durch IFN γ nur eine geringfügige NO-Bildung, aber in Kombination mit LPS eine synergistische Verstärkung der NO-Bildung beschrieben (Mason *et al.*, 1996). Die Unterschiede der hier gezeigten Wirkung des IFN γ zu der von Adler und Mitarbeiter (1995) beschriebenen, könnte in der Verschiedenartigkeit der Herkunft der Makrophagen liegen. Zusätzlich handelt es sich bei den Alveolarmakrophagen um bereits vollständig differenzierte Zellen, während die aus dem knochenmark-abgeleiteten Zellen vor dem Versuch *in vitro* differenziert wurden. Dies könnte durchaus das unterschiedliche Verhalten erklären. In anderen Makrophagenspezies wurde auch, wie in dieser Arbeit, ein induzierender und verstärkender Effekt von IFN γ auf die NO-Bildung beschrieben (Bogdan *et al.*, 1994; Vodovotz *et al.*, 1993).

Während PGE₂ in einem Konzentrationsbereich von 0,01-50 ng/ml selbst keine NO-Synthese bewirkte, verstärkte eine zusätzliche Behandlung mit PGE₂ die Nitritbildung, wenn die Zellen mit IFN γ aktiviert wurden (Abb. 13). Ein solch synergistischer Effekt wurde in der Kombination mit LPS nicht beobachtet (Abb. 14). In der Literatur werden in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies oder der Zelllinie unterschiedliche Wirkungen von PGE₂ auf die NO-Bildung beschrieben. In der Makrophagen-Zelllinie der Maus ANA-1 konnte gezeigt werden, daß Substanzen, welche den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen (PGE₂, Cholera Toxin sowie Sp-cAMP, ein selektiver Aktivator der cAMP-abhängigen Proteinkinasen 1 und 2) die IFN γ -induzierte NO-Bildung erhöhen. Keine NO-Bildung wurde jedoch durch die Einzelgabe der Substanzen hervorgerufen (Mullet *et al.*, 1997). In anderen Untersuchungen wurde durch die Behandlung mit Prostanoiden bzw. den cAMP-Spiegel erhöhenden Substanzen eine Hemmung der NO-Bildung festgestellt (Bulut *et al.*, 1993; Marotta *et al.*, 1992). Eine mögliche Erklärung für die verschiedene Wirkung von PGE₂ bzw. den cAMP-Spiegel erhöhenden Substanzen könnte die unterschiedliche Regulation der Expression der NO-Biosynthese in Abhängigkeit der Spezies und des gewählten Stimulus sein (Nussler und

Billiar, 1993; Xie und Nathan, 1994). Eine weitere Verflechtung der Synthesewege von NO und Eicosanoiden konnte durch die Experimente mit Indomethacin, einem selektiven Hemmstoff der Cyclooxygenase, gezeigt werden (Abb. 15, 16). Indomethacin reduzierte in einer Konzentration von 0,1 μM sowohl die LPS- als auch $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Nitritbildung zu ca. 20%. Die Experimente mit Indomethacin zeigen, daß endogenes PGE_2 sowohl an der LPS- als auch an der $\text{IFN}\gamma$ -induzierten NO-Bildung beteiligt ist. Allerdings wurde durch die zusätzliche Gabe von PGE_2 , wie bereits oben diskutiert, nur ein Effekt auf die NO-Bildung durch PGE_2 in Kombination mit $\text{IFN}\gamma$ beobachtet. Eine mögliche Ursache könnte sein, daß LPS und PGE_2 den gleichen Signalweg induzieren und damit durch exogenes PGE_2 keine Steigerung der Reaktion erfolgt, während bei $\text{IFN}\gamma$ durch PGE_2 eine zusätzliche Wirkung erzielt werden kann. Die Versuche mit Indomethacin bzw. mit PGE_2 als zusätzlichem Stimulus demonstrieren, daß Prostaglandine positiv modulierend auf die induzierte NO-Bildung von RAM wirken.

Die Nitritbildung von RAM wurde auch in Abhängigkeit der Superoxiddismutase (SOD) untersucht. Die SOD ist ein intra- und extrazelluläres Enzym. In der Lunge wird im Vergleich zu anderen Organen eine verhältnismäßig hohe Aktivität an extrazellulärer SOD (EC-SOD) vorgefunden (Marklund, 1984). Die physiologischen Funktionen der EC-SOD sind noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, daß die hauptsächliche Aufgabe in dem Abbau von Superoxidanionen liegt. Wodurch die Zellmembran sowie extrazelluläre Matrixkomponenten vor oxidativer Schädigung geschützt werden. Neuere Untersuchungen zeigen, daß auch humane AM in der Lage sind EC-SOD zu exprimieren (Su *et al.*, 1997). In Typ 2 Pneumozyten von Ratten wurde die Koexpression von EC-SOD und iNOS nach Aktivierung von NF- κB nachgewiesen (Brady *et al.*, 1997). Die Untersuchungen zur Wirkung der SOD auf die Nitritbildung in RAM zeigten, daß bereits geringe Konzentrationen an SOD die LPS-stimulierte Nitritbildung signifikant hemmten (Abb. 12). Dieser hemmende Effekt von SOD wurde auch von anderen Autoren mit RAM beschrieben (Bochsler *et al.*, 1996). Die Beobachtungen mit Rinderalveolarmakrophagen stehen jedoch im Widerspruch zu einer anderen Untersuchungen, in der gezeigt wurde, daß die Zugabe von SOD die stimulierte Nitritbildung von Alveolarmakrophagen der Ratten erhöht (Pendino *et al.*, 1993). Eine Erklärung hierfür ist die Funktion der SOD als Superoxidanion abfangendes Enzym. Gebildetes Superoxidanion stünde für die Reaktion von NO mit Superoxidanion zu Peroxynitrit nicht mehr zur Verfügung und würde so zu einer Erhöhung der Nitritbildung

führen. Voraussetzung hierfür ist die gleichzeitige Bildung von NO und Superoxidanionen. Weshalb bei der Inkubation von RAM mit SOD eine verminderte Nitritbildung gemessen wurde, konnte nicht geklärt werden. Tatsache ist jedoch, daß nicht alle NO-bildenden Zelltypen mit einer Erhöhung der Nitritbildung auf die Zugabe von SOD reagieren. So konnte z.B. die stimulierte Nitritbildung von RAW 264.7 Makrophagen durch SOD nicht beeinflusst werden (Fricker *et al.*, 1995). Diese Beobachtung wurde auch in der vorliegenden Arbeit mit RAW 264.7 Makrophagen bestätigt (Daten nicht gezeigt), so daß der gezeigte hemmende Effekt der SOD auf die Nitritbildung von RAM nicht auf die Art der Bestimmungsmethode zurückzuführen ist.

Ein Teil der Untersuchungen zur Charakterisierung der NO-Bildung in RAM wurde auch auf der Ebene der iNOS mRNA nachvollzogen. Die Expression der iNOS mRNA wurde mit Hilfe der RT-PCR bestimmt. Die Identität des erhaltenen PCR-Produktes konnte mit Hilfe einer iNOS-spezifischen Sonde bestätigt werden (Abb. 17). Es konnte gezeigt werden, daß LPS die Expression der iNOS mRNA induziert. Unstimulierte RAM wiesen nur eine geringfügige Expression der iNOS mRNA auf. Das heißt die Induktion der iNOS erfolgt auf Transkriptionsebene (Xie *et al.*, 1992; Xie und Nathan, 1994). Es konnte auch gezeigt werden, daß LPS konzentrationsabhängig die Expression der iNOS mRNA induziert (Abb. 18). Dies steht in Einklang mit der gezeigten Wirkung von LPS auf die Nitritbildung (Abb. 9). Nach Behandlung der RAM mit IFN γ konnte auch die Expression der iNOS mRNA nachgewiesen werden (Abb. 19). Eine verstärkte Expression der iNOS mRNA wurde nach Koinkubation von RAM mit LPS und IFN γ beobachtet. Dies wurde auch auf der Ebene der Nitritbildung nach 24-stündiger Behandlungszeit gemessen (Abb. 11).

Für die weitere Charakterisierung der Expression der iNOS mRNA wurden der NO-Donor SNP, der Peroxynitritbildner SIN-1 und Nitrit eingesetzt. Welche Wirkung NO auf seine eigene Synthese hat, wurde mit Hilfe des NO-Donors untersucht. Der Einfluß von Folgeprodukten der NO-Bildung auf die Expression der iNOS mRNA wurde anhand von Peroxynitrit, dem Reaktionsprodukt aus NO mit Superoxidanionen, und Nitrit, einem Oxidationsprodukt der NO-Synthese, geklärt. Da Nitrit auch während der Begasung der Zellen durch Lösen von NO $_2$ im Medium entsteht, wurde mit diesen Experimenten, der Einfluß der NO $_2$ -Exposition auf die Expression der iNOS mRNA, welcher auf Nitrit zurückzuführen ist, ermittelt. Daher wurde Nitrit in der Konzentration verwendet, wie es nach NO $_2$ -Exposition im Medium gemessen wurde. Entscheidend war bei diesen Untersuchungen die Wirkung der Substanzen auf die Induktionsphase oder erst zu erfolgende Induktion der iNOS zu klären. Es

konnte gezeigt werden, daß SIN-1 und SNP die LPS-induzierte oder die nach Kulturnahme der RAM bedingte Induktion der iNOS in den Zeiträumen 2, 4 und 24 h nicht hemmte (Abb. 20, 21). Nach 24-stündiger Inkubation hatten die LPS-stimulierten Proben auch in Kombination mit dem NO-Donor den gleichen iNOS mRNA Gehalt. Die Inkubation von RAM mit Nitrit und LPS hatte ebenso keinen hemmenden Effekt auf die LPS-induzierte Expression der iNOS mRNA. Daraus kann gefolgert werden, daß NO, Peroxynitrit und Nitrit die gleichzeitig erfolgte Induktion der iNOS nicht beeinflussen. Das bedeutet auch, daß während der NO₂-Exposition gebildetes Nitrit im Untersuchungszeitraum keinen Einfluß auf die Expression der iNOS mRNA hat. Die Resultate zeigen, daß hier keine Regulation im Sinne einer negativen Rückkopplung vorliegt, wenn die Stimulierung der Zellen und die Endprodukt-Zugabe gleichzeitig erfolgen. Ganz anders bei einer Vorinkubation der Zellen mit einem NO-Donor. Hier bewirkte NO bei einer nachfolgenden LPS-Aktivierung eine Reduktion der iNOS Expression. In der Literatur wird eine Endprodukthemmung von NO auf seine eigene Synthese diskutiert. In Übereinstimmung mit den hier gefundenen Ergebnissen wurde gezeigt, daß für die Endprodukthemmung von NO auf seine eigene Synthese der Zeitpunkt der Zugabe von NO-Donoren entscheidend ist. Wurde SNP 4 h nach Induktion der iNOS zugegeben, konnte kein hemmender Effekt auf die LPS/TNF α induzierte Expression der iNOS mRNA in humanen Gliazellen beobachtet werden (Colasanti *et al.*, 1995). Für diese Hemmung wird entweder die Wirkung von SNP auf die Verfügbarkeit von NF- κ B, einem Transkriptionsfaktor verantwortlich gemacht, welcher an der Genexpression der iNOS beteiligt ist, oder eine direkte Wirkung von NO-Donoren auf die Aktivität der NO-Synthase angenommen (Assreuy *et al.*, 1993; Colasanti *et al.*, 1995; Rachivandran *et al.*, 1995).

Die Experimente zur Expression der iNOS mRNA zeigen, daß mit dieser Methode in Abhängigkeit der Stimuli und Konzentration Unterschiede in der Expression der iNOS mRNA nachgewiesen werden konnten. Ein Beweis für die beschriebene Regulation der iNOS auf Transkriptionsebene und zugleich eine Verifizierung der hier angewandten Methode.

Einfluß von NO₂ auf die Expression der iNOS mRNA

Die Ergebnisse zur Nitritbildung nach NO₂-Exposition zeigten eine Erhöhung der LPS-induzierten NO-Bildung nach 24 h (Abb. 7). Um den Mechanismus der erhöhten Nitritbildung nach NO₂-Exposition zu klären, wurde die Expression der iNOS mRNA nach NO₂ Exposition bestimmt. Hierzu wurde zum einen direkt nach 2-stündiger Gasexposition und anschließend 5-stündiger Stimulierung oder nach 5-stündiger Gasexposition bei gleichzeitiger Stimulierung

mit LPS bzw. IFN γ die Expression der iNOS mRNA bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß die NO $_2$ -Exposition keinen Einfluß auf die unstimulierte Expression der iNOS mRNA sowohl nach 2- als auch 5-stündiger Begasung hat (Abb. 23, 24). Eine erhöhte Expression der iNOS mRNA wurde jedoch in Kombination mit den Stimuli LPS bzw. IFN γ nach NO $_2$ -Exposition gegenüber luftbegassten RAM festgestellt. Diese Erhöhung wurde sowohl nach 2-stündiger Begasung und anschließender 5-stündiger Behandlung mit LPS bzw. IFN γ und nach 5-stündiger Begasung bei gleichzeitiger LPS bzw. IFN γ Stimulierung erreicht (Abb. 23, 24). Diese Ergebnisse bestätigen die Daten zur Nitritbildung nach NO $_2$ -Exposition. Es konnte ebenso, wie die Bestimmung der Nitritbildung ergeben hat, kein Einfluß auf die unstimulierte NO-Bildung festgestellt werden können. Die gezeigten Effekte auf die stimulierte NO-Bildung, die bei der Nitritbildung gemessen wurden, können auf die Wirkung von NO $_2$ auf die Expression der iNOS mRNA zurückgeführt werden. Das heißt NO $_2$ kann die LPS- bzw. IFN γ -induzierte NO-Bildung verstärken. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt von NO $_2$ auf die Expression der iNOS mRNA könnte darin begründet sein, daß NO $_2$ in der Lage ist, eine Lipidperoxidation zu initiieren. Eine durch NO $_2$ ausgelöste Peroxidation vielfach ungesättigter Fettsäuren wurde in mehreren Untersuchungen bestätigt (Gallon und Pryor, 1994; Pryor und Lightsey, 1981). Diese Wirkung von NO $_2$ auf Lipide der Zellmembran oder des Alveolarschleims wird als hauptsächlicher Mechanismus der NO $_2$ -Toxizität angesehen. Eine Schädigung der Zellmembran durch Lipidperoxidation verändert das Verhältnis von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, welches mit einer verminderten Fluidität der Zellmembran verbunden ist (Bruch und Thayer, 1983). Die Lipidperoxidation ist ein komplexer Prozess, welcher zuerst zur Bildung von konjugierten Dien-Hydroperoxiden führt. Durch Zerfall der Hydroperoxide können Aldehyde und weitere reaktive, aber nur kurzzeitig stabile Verbindungen entstehen (Frankel, 1983; Gardner 1989). Lipidperoxide können möglicherweise eine verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B hervorrufen, wie dies für oxidativen Stress gezeigt wurde. Reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere Peroxide, können zur Aktivierung von NF- κ B und damit zur Induktion oder verstärkten Expression von Genen führen, welche eine NF- κ B-bindende Domäne besitzen. Es konnte gezeigt werden, daß Butylperoxid die Aktivierung von NF- κ B in Jurkat Zellen und in der Mauszelllinie 70/Z3 induziert (Schreck *et al.*, 1992). Diese Substanz wird von anderen Autoren eingesetzt, um die Wirkung oxidativer Gase, wie z.B. NO $_2$, nachzuahmen (Zhou *et al.*, 1997). Somit könnte also NO $_2$ über die Bildung reaktiver Lipidperoxidationsprodukte eine

verstärkte Aktivierung von NF- κ B und in dieser Folge eine erhöhte Expression der iNOS mRNA bewirken. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist an der Expression der iNOS der Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt. Die Aktivierung von NF- κ B kann durch Antioxidantien verhindert werden (Schreck *et al.*, 1992). Untersuchungen zur Wirkung von Antioxidantien auf die Toxizität von NO₂ wiesen ebenso eine Verminderung der durch NO₂ ausgelösten Effekte auf (Halliwell *et al.*, 1992; Mohsenin, 1994).

Die hier gezeigte Erhöhung der LPS- bzw. IFN γ -induzierten iNOS mRNA Expression von RAM nach NO₂-Exposition könnte auch durch einen indirekten Mechanismus erklärt werden. Die Ergebnisse zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren zeigen eine erhöhte Freisetzung von TNF- α und PGE₂ nach NO₂-Exposition (Abb. 2-4). Diese früh sezernierten Zytokine könnten einen verstärkenden Effekt auf die Expression der iNOS mRNA ausüben. So wurde in mehreren Studien gezeigt, daß Zytokine die Expression der iNOS mRNA beeinflussen. Dabei verstärken TNF- α , IL-1 β und IFN γ die Expression der iNOS mRNA, während dagegen IL-4, IL-10 und TGF β reduzierend wirken (MacMicking *et al.*, 1997; Mason *et al.*, 1996). Auch durch Prostaglandine bzw. Substanzen, die den cAMP-Spiegel erhöhen, wurde eine Erhöhung der NO-Bildung nachgewiesen (Mullet *et al.*, 1997). In dieser Arbeit konnte, wie bereits zuvor diskutiert, gezeigt werden, daß PGE₂ die NO-Bildung von RAM positiv moduliert. Daher wäre es durchaus möglich, daß die erhöhte Expression der iNOS mRNA nach NO₂-Exposition auf der vermehrten Sekretion von PGE₂ beruht. Da in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt wurde, daß durch die NO₂-Exposition die stimulierte Freisetzung von TNF- α erhöht wurde, kommt TNF- α ebenfalls als ein die NO-Bildung verstärkendes Zytokin in Frage (Abb. 2). Diese Wirkung von TNF- α auf die NO-Bildung konnte in den Experimenten nicht überprüft werden, da kein TNF- α des Rindes zur Verfügung stand. Statt dessen eingesetztes humanes TNF- α hatte keinen Effekt auf die NO-Bildung von RAM. Unterschiede in der Wirkung von humanem und Rinder-TNF- α können jedoch speziespezifisch begründet sein.

Die indirekte Erhöhung der stimulierten-iNOS mRNA Expression über die vermehrte Freisetzung von TNF- α und PGE₂ nach NO₂-Exposition kann ebenso über eine verstärkte Aktivierung von NF- κ B erfolgen. TNF- α induziert die Aktivierung von NF- κ B, wie in mehreren Untersuchungen gezeigt werden konnte (Duh *et al.*, 1989; Lowenthal *et al.*, 1989; Osborn *et al.*, 1989). Wie PGE₂ die NO-Bildung beeinflusst ist noch nicht geklärt. Von einigen Autoren wird auch hierfür eine verstärkte Aktivierung von NF- κ B über eine Erhöhung des

intrazellulären cAMP-Spiegel diskutiert (Beg *et al.*, 1993; Mullet *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Untersuchung gezeigt, daß cAMP (Dibutyryl-cAMP) die Expression der iNOS mRNA ohne Beteiligung von NF- κ B erhöhte (Greenberg *et al.*, 1997). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß NO₂ die Expression der iNOS mRNA verstärkt. Dies kann sowohl über einen direkten als auch indirekten Mechanismus erfolgen entweder unter Beteiligung von NF- κ B oder eines anderen verstärkenden Effektors wie PGE₂. Dies würde auch erklären, warum NO₂ nicht auf die unstimulierte Expression der iNOS mRNA wirkt. Da die alleinige Aktivierung von NF- κ B nicht ausreichend ist die Expression der iNOS mRNA zu induzieren (Xie und Nathan, 1994) und außerdem, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Inkubation von RAM mit PGE₂ nicht zur Nitritbildung führte.

Die Wirkung von NO₂ auf die Expression der iNOS mRNA wurde auch in primäraktivierten RAM untersucht. Primäraktivierte RAM zeichneten sich durch eine erhöhte Nitritbildung bereits ohne die Zugabe eines Stimulus aus (Abb. 8). Diese Nitritbildung beruhte auf einer erhöhten Expression der iNOS mRNA wie in Abb. 25 gezeigt werden konnte. Die Kontrolle der luftexponierten RAM wies einen deutlich erhöhten iNOS mRNA-Gehalt auf. Eine 5-stündige NO₂-Exposition reduzierte den Gehalt an iNOS mRNA im Vergleich zu luftbegasteten RAM. Die Stimuli LPS bzw. IFN γ induzierten in den luft- und den NO₂-begasteten RAM nur eine geringfügige Erhöhung der iNOS mRNA, wobei die NO₂-exponierten RAM deutlich verminderte iNOS mRNA Werte aufwiesen.

Die Experimente zur Expression der iNOS mRNA primäraktivierter RAM bestätigen die Ergebnisse, die durch Messung der Nitritbildung gewonnen wurden. Sie bestätigen darüberhinaus auch die unterschiedliche Wirkung von NO₂ auf die NO-Bildung, die vom Immunstatus der Zellen abhängig ist.

Einfluß von NO₂ auf die iNOS-Proteinbildung von RAW 264.7 Makrophagen

Die RAW 264.7 Makrophagen sind eine Mausmonozyten-Zelllinie und besitzen wie RAM eine induzierbare NO-Synthase (Lowenstein *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1992). RAW 264.7 Makrophagen wurden für die Experimente zur Wirkung von NO₂ auf die NO-Bildung herangezogen um auch Untersuchungen der iNOS auf Proteinebene durchführen zu können. Leider war, wie bereits unter 3.3. beschrieben wurde, das iNOS Protein in den RAM nicht eindeutig nachweisbar, da entsprechende Antikörper fehlten. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe der Makrophagen-Zelllinie geklärt werden, inwieweit die Proteinbildung der iNOS durch eine NO₂-Exposition beeinflussbar ist. Gleichzeitig wurde durch den Einsatz von

Hemmstoffen der Mechanismus der NO₂-induzierten Erhöhung der NO-Bildung näher untersucht. Eingesetzt wurden C11AG, ein Inhibitor der neutralen Sphingomyelinase, und Indomethacin, ein Inhibitor der Cyclooxygenase. Die neutrale Sphingomyelinase ist ein membranständiges Enzym, das die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin katalysiert. Ceramid kann über verschiedene Proteinkinasen die Aktivierung von NF-κB bewirken (Kolesnick *et al.*, 1994; Lipton, 1997). Untersuchungen mit C11AG zeigten, daß LPS-vermittelte Effekte inhibiert werden (pers. Mitteilung Dr. Amtmann, DKFZ Heidelberg). Mit dem Einsatz dieser beiden Substanzen kann also unterschieden werden, inwieweit die NO₂ Wirkung LPS-ähnlich ist oder eher auf der Induktion des Cyclooxygenaseweges beruht.

Die NO-Bildung von RAW 264.7 Makrophagen wird ebenso wie in RAM auf Transkriptionsebene induziert (Lowenstein *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1992). Die Expression der iNOS mRNA wird hierbei auch durch den Stimulus LPS induziert. In Abhängigkeit von der LPS Konzentration konnten unterschiedliche Mengen an iNOS mRNA festgestellt werden (Chesrown *et al.*, 1994). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß LPS zeit- und konzentrationsabhängig die NO-Bildung induzierte (Abb. 26). Die nachgewiesene Nitritmenge nach Behandlung mit LPS war in RAW Makrophagen jedoch wesentlich höher als in RAM (vgl. Abb. 9). Bereits nach 24-stündiger Inkubation mit LPS war der Gehalt an Nitrit deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht. Das iNOS Protein mit seiner typischen Doppelbande und einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa konnte im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 27) (Vodovotz *et al.*, 1993). Der Zeitverlauf der iNOS Proteinbildung zeigte, daß nach ca. 6 h Behandlung mit LPS das Protein gebildet war. Längere Behandlungszeiten gehen mit erhöhter Proteinbildung einher (Abb. 27) In den Kontrollzellen konnte kein iNOS Protein nachgewiesen werden.

Für die Untersuchung des NO₂-Effektes auf die iNOS Proteinbildung wurden RAW 264.7 Makrophagen 5 h mit Luft bzw. NO₂ begast. Abb. 28 zeigt, daß LPS während dieses Zeitraums die iNOS Proteinbildung in den luft- und NO₂-begasten Proben induziert. Die NO₂-Exposition führte zu einer leichten jedoch sichtbaren Erhöhung des iNOS Proteins. Ohne den zusätzlichen Stimulus LPS konnte sowohl in den luft- als auch NO₂-begasten Zellen kein iNOS Protein nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den oben diskutierten Ergebnissen bei den RAM. Die NO₂-Exposition hatte keinen Einfluß auf die unstimulierte NO-Bildung, in Kombination mit dem Stimulus LPS wurde auch auf der Ebene der iNOS Proteinbildung ein Effekt gemessen. Der Hemmstoff C11AG führte in den luftexponierten Zellen zu einer

vollständigen Hemmung der LPS-stimulierten iNOS Proteinbildung. In den NO₂-exponierten Zellen war diese Hemmung nicht vollständig. Indomethacin hemmte die LPS-stimulierte iNOS Proteinbildung in den luft- und NO₂-begasten Zellen teilweise. Diese Hemmung ist jedoch in den NO₂-begasten Zellen ausgeprägter. Die Ergebnisse mit den Hemmstoffen deuten daraufhin, daß NO₂ einen von LPS verschiedenen Weg der NO-Bildung verstärkt, d.h. ohne die Beteiligung der neutralen Sphingomyelinase und deren nachfolgende Aktivierung von NF-κB. Es liegt nahe, daß in den Mechanismus der NO-Bildung induziert durch NO₂-Exposition die Synthese von Prostaglandinen durch die Cyclooxygenase involviert ist.

Die Untersuchungen mit den RAW 264.7 Makrophagen zeigten ebenso wie die Experimente mit den RAM eine Wirkung von NO₂ auf die NO-Bildung. Auch wenn die mit der Makrophagen-Zelllinie gewonnenen Ergebnisse zur Proteinbildung der iNOS nach NO₂-Exposition nicht mit absoluter Sicherheit auf RAM übertragen werden können, bestätigen sie doch den verstärkenden Effekt von NO₂ auf die NO-Bildung.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß NO₂ in umweltrelevanter Konzentration die Mediatorfreisetzung von Alveolarmakrophagen deutlich beeinflusst. Aufgrund dieser Wirkung muß man davon ausgehen, daß durch NO₂ wichtige immunologische Funktionen der Makrophagen verändert werden. Da Alveolarmakrophagen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr der Lunge einnehmen, kann daraus gefolgert werden, daß NO₂ durch die Änderung der Immunfunktion dieser Zellen auf Entzündungsmechanismen und deren Folgereaktionen in der Lunge wirken kann.

5 Literaturverzeichnis

Adler H., Frech B., Thöny M., Pfister H., Peterhans E., Jungi T.W. (1995). Inducible nitric oxide synthase in cattle. *J. Immunol.* 154: 4710-4718.

Amoruso M.A., Witz G., Goldstein B.D. (1981). Decreased superoxide anion radical production by rat alveolar macrophages following inhalation of ozone or nitrogen dioxide. *Life Sci.* 28: 2215-2221.

Assreuy J., Cunha F.Q., Liew F.Y., Moncada S. (1993). Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 108: 833-837.

Baek K.J., Thiel B.A., Lucas S., Stuehr D.J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into dimeric enzyme. *J. Biol. Chem.* 268: 21120-21129.

Baeuerle P.A. und Henkel T. (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141-179.

Barnes P.J. (1994). Air pollution and asthma. *Postgrad. Med. J.* 70: 319-325.

Barnes P.J. and Belvisi M.G. (1993). Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 48: 1034-1043.

Beckman J.S. and Koppenol W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 271 (*Cell Physiol.* 40): C1424-C1437.

Beg A.A., Finco T.S., Nantermet P.V., Baldwin Jr. A.S. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B- α : a mechanism for NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3301-3310.

Belvisi M.G., Saunders M.A., Haddad E.-B., Hirst S.T., Yacoub M.H., Barnes P.J., Mitchell J.A. (1997). Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type. *Br. J. Pharmacol.* 120: 910-916.

Bienhoff S.E. and Allen G.K. (1995). Quantitation of bovine TNF- α mRNA by reverse transcription and competitive polymerase chain reaction amplification. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 129-140.

Blomberg A., Krishna M.T., Bocchino V., Biscione G.L., Shute J.K., Kelly F.J., Frew A.J., Holgate S.T., Sandström T. (1997). The inflammatory effects of 2 ppm NO₂ on the airways of healthy subjects. *Am. J. Crit. Care Med.* 156: 418-424.

Bochsler P.N., Mason G.L., Olchoway T.W.J., Yang Z. (1996). Bacterial lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide generation is unrelated to concurrent cytotoxicity of bovine alveolar macrophages. *Inflammation* 20: 177-189.

Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J.C. (1997). Cellular responses to Interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.* 15: 749-795.

- Bogdan C., Vodovotz Y., Paik J., Xie Q.-W., Nathan C. (1993). Traces of bacterial lipopolysaccharide suppress IFN- γ -induced nitric oxide gene expression in primary mouse macrophages. *J. Immunol.* 151: 301-309.
- Bogdan C., Vodovotz Y., Paik J., Xie Q.-W., Nathan C. (1994). Mechanisms of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 55: 227-233.
- Bouley G., Azoulay-Dupuis E., Gaudebaut C. (1986). Impaired acquired resistance of mice to *Klebsiella pneumoniae* infection induced by acute NO₂ exposure. *Environ. Res.* 41: 497-504.
- Brady T.C., Chang L.-Y., Day B.J., Crapo J.D. (1997). Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF- κ B activation. *Am. J. Physiol.* 273 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 17): L1002-L1006.
- Bruch R.C. and Thayer W.S. (1983). Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *Biochim. Biophys. Acta* 73: 216-222.
- Bulut V., Severn A., Liew F.Y. (1993). Nitric oxide production by murine macrophages is inhibited by prolonged elevation of cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 1134-1138.
- Chesrown S.E., Monnier J., Visner G., Nick H.S. (1994). Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, IFN- γ , TGF- β , and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 200: 126-134.
- Colasanti M., Persichini T., Menegazzi M., Mariotto S., Giordano E., Caldarera C.M., Sogos V., Lauro G.M., Suzuki H. (1995). Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. *J. Biol. Chem.* 270: 26731-26733.
- Collart M.A., Baeuerle P.A., Vassali P. (1990). Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four κ B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1498-1506.
- Davis J.K., Davidson M.K., Schoeb T.R., Lindsey J.R. (1992). Decreased intrapulmonary killing of mycoplasma pulmonis after short-term exposure to NO₂ is associated with damaged alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: 406-411.
- DeNicola D.B., Rebar A.H., Hendersson R.F. (1981). Early damage indicators in the lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 60: 301-312.
- Devalia J.L., Campbell A.M., Sapsford R.J., Rusnak C., Quint D., Godard P., Bousquet J., Davies R.J. (1993). Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human epithelial cells *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9: 271-278.
- Ding A.H., Nathan C.F., Stuehr D.J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407-2412.

Duh E.J., Maury W.J., Folks T.M., Fauci A.S., Rabson A.B. (1989). Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5974-5978.

Ehrenberg A.S.C. (1986). *Statistik oder der Umgang mit Daten*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Elstner E.F. (1990). *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BJ-Wissenschaftsverlag Mannheim Wien Zürich, 464-468.

Erroi A., Pagani P., Sironi M., Salmona M. (1996). In vivo exposure to NO₂ reduces TNF and IL-6 production by endotoxin-stimulated alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 271 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 15): L132-L138.

Espevik T. and Nissen-Meyer J. (1986). A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13 for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Meth.* 95: 99-105.

Frampton M.W., Morrow P.E., Cox C., Gibb F.R., Speers D., Utell M.J. (1991). Effects of nitrogen dioxide on pulmonary function and airway reactivity in normal humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143: 522-527.

Frampton M.W., Smeglin A.M., Roberts Jr., N.J., Finkelstein J.N., Morrow P.E., Utell M.J. (1989). Nitrogen dioxide exposure in vivo and human alveolar macrophage inactivation of influenza virus in vitro. *Environ. Res.* 48: 179-192.

Frankel E.N. (1983). Volatile lipid oxidation products. *Prog. Lipid Res.* 22: 1-33.

Freeman G., Juhos L.T., Furiosi N.J., Mussenden R., Stephens R.T., Evans M.J. (1974). Pathology of pulmonary disease from exposure to interdependent ambient gases (nitrogen dioxide and ozone). *Arch. Environ. Health* 29: 203-210.

Fricker S.P., Slade E., Powell N.A. (1995). Effect of superoxide dismutase on nitric oxide production by RAW264 macrophages. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 231.

Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.

Gaillard T., Mülsch A., Klein H., Decker K. (1992). Regulation by prostaglandin E₂ of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373: 897-902.

Gallon A.A. and Pryor W.A. (1993). The identification of the allylic nitrite and nitro derivatives of methyl linoleate and methyl linolenate by negative chemical ionization mass spectroscopy. *Lipids* 28: 125-133.

Gallon A.A. and Pryor W.A. (1994). The reaction of low levels nitrogen dioxide with methyl linoleate in the presence and absence of oxygen. *Lipids* 29: 171-176.

- Gardner H.W. (1989). Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biol. Med.* 7: 65-86.
- Gaston B., Drazen J.M., Loscalzo J., Stamler J.S. (1994). The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149: 538-551.
- Glasgow J.E., Pietra G.G., Abram W.R., Blank J., Oppenheim D.M., Weinbaum G. (1987). Neutrophil recruitment and degranulation during induction of emphysema in the rat by nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 1129-1136.
- Gordon R.E., Shaked A.A., Solano D.F. (1986). Taurine protects hamster bronchioles from acute NO₂-induced alterations. *Am. J. Pathol.* 125: 585-600.
- Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrite in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.
- Greenberg S.S., Zhao X., Wang J.-F., Hua L., Ouyang J. (1997). cAMP and purinergic P_{2y} receptors upregulate and enhance inducible NO synthase mRNA and protein in vivo. *Am. J. Physiol.* 273 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 17): L967-L979.
- Halliwell B., Hu M.-L., Louie S., Duvall T.R., Tarkington B.K., Motchnik P., Cross C.E. (1992). Interaction of nitrogen dioxide with human plasma. *FEBS Lett.* 313: 62-66.
- Hanks J.H. and Wallace J.H. (1958). Determination of cell viability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98: 156-160.
- Hazucha M.J., Ginsberg J.F., McDonnell W.F., Haak Jr. E.D., Pimmel R.L., Abdul-Salaam S., House D.E., Bromberg P.A. (1983). Effects of 0.1 ppm nitrogen dioxide on airways of normal and asthmatic subjects. *J. Appl. Physiol.* 54: 730-739.
- Henning R. (1993). Stickoxid-freisetzende Substanzen und Inhibitoren der NO-Synthase. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 41: 412-419.
- Hibbs J.B., Taintor R.R., Vavrin Z., Granger D.L., Drapier J.-C., Amber I.J., Lancaster Jr. J.R. (1990). Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In: *Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System* (eds. Moncada S. and Higgs E.A.). Elsevier Amsterdam, 189-223.
- Islam M.S. und Ulmer W.T. (1979). Beeinflussung der Lungenfunktion durch ein Schadstoffgemisch aus Ozon (O₃), Schwefeldioxid (SO₂) und Stickstoffdioxid (NO₂) im MAK-Bereich (Kurzzeitversuch). *Wiss. Umwelt* 3: 131-137.
- Johnston Jr. R.B. (1981). Secretion of superoxide anion. In: *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes* (eds. Adams P.O., Edelson P.J., Karen H.). Academic Press, N.Y., 489-497.

Jörres R. and Magnussen H. (1991). Effect of 0.25 ppm nitrogen dioxide on the airway response to methacholine in asymptomatic patients. *Lung* 169: 77-85.

Kamijo R., Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gerecitano J., Shapiro D., Le J., Koh S.I., Kimura T., Green S.J., Mak T.W., Taniguchi T., Vilcek J. (1994). Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263: 1612-1615.

Kharitonov S.A., Wells A.U., O'Connor B.J., Cole P.J., Hansell D.M., Logan-Sinclair R.B., Barnes P.J. (1995). Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 1889-1893.

Kharitonov S.A., Yates D., Robbins R.A., Logan-Sinclair R., Shinebourne E., Barnes P.J. (1994). Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 343: 133-135.

Kienast K., Knorst M., Müller-Quernheim J., Ferlinz R. (1993). Modulation der TNF- α -Sekretion von Alveolarmakrophagen unter NO₂-Exposition in umweltrelevanten Konzentrationen. *Atemw.-Lungenkrkh.* 19: 427-429.

Kienast K., Knorst M., Müller-Quernheim J., Ferlinz R. (1996). Modulation of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , and TGF- β secretions by alveolar macrophages under NO₂ exposure. *Lung* 174: 57-67.

Kleinman M.T., Bailey R.M., Linn W.S., Andersson K.R., Whynot J.D. (1983). Effects of 0.2 ppm nitrogen dioxide on pulmonary function and response to bronchoprovocation in asthmatics. *J. Toxicol. Environ. Health* 12: 815-826.

Kolesnick R. and Golde D.W. (1994). The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signalling. *Cell* 77: 325-328.

Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Landesanstalt für Umweltschutz: *Luftbericht 1996*.

Lansing M.W., Mansour E., Ahmed A., Cortes A., Garcia L., Lauredo I., Wanner A., Abraham W.M. (1991). Lipid mediators contribute to oxygen-radical-induced airway responses in sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144: 1291-1296.

Lind I. (1993). Untersuchungen der Wirkungen von NO₂ auf Immunfunktionen von Rinderalveolarmakrophagen in einem realitätsnahen in vitro-System. *Dissertation*, Universität Karlsruhe.

Linn W.S., Solomon J.C., Trim S.C., Spier C.E., Shamoo D.A., Venet T.G., Avol E.L., Hackney J.D. (1985). Effect of exposure to 4 ppm nitrogen dioxide in healthy and asthmatic volunteers. *Arch. Environ. Health* 40: 234-239.

Lipton S.A. (1997). Janus faces of NF- κ B: neurodestruction versus neuroprotection. *Nature Medicine* 3: 20-22.

- Lohmann-Matthes M.-L. (1981). Der Makrophage. *Biologie in unserer Zeit* 11:135-143.
- Lorsbach R.B., Murphy W.J., Lowenstein C.J., Snyder S.H., Russell S.W. (1993). Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 268: 1908-1913.
- Lowenstein C.J., Glatt C.S., Bredt D.S., Snyder S.H. (1992). Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6711-6715.
- Lowenthal J.W., Ballard D.W., Boehnlein E., Greene W.C. (1989). Tumor necrosis factor alpha induces proteins that bind specifically to kappa B-like enhancer elements and regulate interleukin-2 receptor alpha chain gene expression in primary human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2331-2335.
- Maier J.A., Hla T., Maciag T. (1990). Cyclo-oxygenase is an immediate early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265: 10805-10808.
- Marklund S.L. (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissue from nine mammalian species. *Biochem. J.* 222: 649-655.
- Marletta M.A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268: 12231-12234.
- Marrota P., Sautebin L., Di Rosa M. (1992). Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. *Br. J. Pharmacol.* 107: 640-641.
- Mason G.L., Yang Z., Olchoway T.W.J., Jian Z., Bochsler P.N. (1996). Nitric oxide production and expression of inducible nitric oxide synthase by bovine alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53: 15-27.
- Matejka M. (1992). Einfluß von Lanthan und Cer auf die Freisetzung des Tumornekrosefaktors durch Makrophagen. *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe.
- McGrath J.J. and Wong S. (1987). Immunotoxicology of inhalants and methods of evaluation. In: *Inhalation Toxicology* (ed. Salem H.). New York: Marcel Dekker, 255-291.
- McPhail L.C., Ellenburg M.D., Leone P.A., Agwu D.E., McCall C.E., Qualliotine-Mann D., Strum S.L. (1991). Molecular mechanism of activation of leukocyte superoxide production. In: *Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes* (eds. Jesaitis A.J. and Dratz E.A.). Ann Arbor, Mich.: CRC Press, 11-24.
- Mitchell J.A., Belvisi M.G., Akaresereenont P., Robbins R.A., Kwon O.-J., Croxtall J., Barnes P.J., Vane J.R. (1994). Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1008-1014.

Mohsenin V. (1988). Airway response to 2.0 ppm nitrogen dioxide in normal subjects. *Arch. Environ. Health* 43: 242-246.

Mohsenin V. (1991). Lipid peroxidation and antielastase activity in the lung under oxidant stress, role of oxidant defences. *J. Appl. Physiol.* 70: 1456-1462.

Mohsenin V. (1994). Human exposure to oxides of nitrogen at ambient and supra-ambient concentrations. *Toxicology* 89: 301-312.

Mohsenin V. and Gee J.B.L. (1987). Acute effects of nitrogen dioxide exposure on the functional activity of alpha₁-protease inhibitor on bronchoalveolar lavage fluid of normal subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 646-649.

Morrow P.E. (1984). Toxicological data on NO_x: an overview. *J. Toxicol. Environ. Health* 13: 205-227.

Mosbach M. (1994). In vitro-Untersuchungen zum Einfluß von Ozon auf Immunfunktionen von Alveolarmakrophagen. *Dissertation*, Universität Karlsruhe.

Mullet D., Fertel R.F., Kniss D., Cox G.W. (1997). An increase in intracellular cyclic AMP modulates nitric oxide production in IFN- γ -treated macrophages. *J. Immunol.* 158: 897-904.

Mustafa M.G., Elsayed N.M., von Dohlen F.M., Hassett C.M., Posthlewath E.M., Quinn C.L., Graham J.A., Gardner D.E. (1984). A comparison of biochemical effects of nitrogen dioxide, ozone, and their combination in mouse lung. 1. Intermittent exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72: 82-90.

von Nieding G. and Wagner H.M. (1979). Effects of NO₂ on chronic bronchitics. *Environ. Health Perspect.* 29: 137-142.

von Nieding G., Wagner H.M., Krekeler H., Loellgen H., Fries W., Beuthan A. (1979). Controlled studies of human exposure to single and combined action of NO₂, O₃, and SO₂. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 43: 195-210.

Norman V. and Keith C.H. (1965). Nitrogen oxides in tobacco smoke. *Nature* 205: 915-916.

Nowak D., Jörres R., Magnussen H. (1992). Einfluß von Luftschadstoffen auf die Lungenfunktion. *Atemw.-Lungenkrkh.* 18: 441-447.

Nussler A.K. and Billiar T.R. (1993). Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* 54: 171-178.

O'Sullivan M.G., Huggins E.M., Meade E.A., Dewitt D.L., McCall C.E. (1992). Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1123-1127.

Old L.J. (1987). Tumor necrosis factor: polypeptide mediator network. *Nature* 326: 330-331.

Old L.J. (1988). Der Tumor-Nekrose-Faktor. *Spektrum der Wissenschaft* 7: 42-51.

- Orehek J., Massari P., Gayrard P., Grimaud C., Charpin J. (1976). Effect of short-term, low-level nitrogen dioxide exposure on bronchial sensitivity of asthmatic patients. *J. Clin. Invest.* 57: 301-307.
- Osborn L., Kunkel S., Nabel G.J. (1989). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2336-2340.
- Oury T.D., Chang L.-Y., Marklund S.L., Day B.J., Crapo J.D. (1994). Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab. Invest.* 70: 889-898.
- Oury T.D., Day B.J., Crapo J.D. (1996). Extracellular superoxide dismutase: A regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.* 75: 617-636.
- Pendino K.J., Laskin J.D., Shuler R.L., Punjabi C.J., Laskin D.L. (1993). Enhanced production of nitric oxide by rat alveolar macrophages after inhalation of a pulmonary irritant is associated with increased expression of nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 151: 7196-7205.
- Polzer G., Lind I., Krüger E., Seidel A. (1994). In vitro effects of nitrogen dioxide on the superoxide anion, TNF- α , and IL-8 release by HL60-macrophages and bovine alveolar macrophages. *Inhal. Toxicol.* 6: 359-377.
- Pryor W.A. and Lightsey J.W. (1981). Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: Initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid. *Science* 214: 435-437.
- Rachivandran L.V., Johns R.A., Rengasamy A. (1995). Direct and reversible inhibition of endothelial nitric oxide synthase by nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 268 (*Heart Circ. Physiol.* 37): H2216-H2223.
- Rietjens I.M.C.M., Poelen M.C.M., Hempenius R.A., Gijbels M.J., Alink G.M. (1986). Toxicity of ozone and nitrogen dioxide to alveolar macrophages: comparative study revealing differences in their mechanisms of toxic action. *J. Toxicol. Environ. Health* 19: 555-568.
- Rietschel E.T.H., Schade U., Jensen M., Wollenweber H.-W., Lüderitz O., Greisman S.G. (1982). Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicemia. *Scand. J. Infect. Dis.* 31: 8-21.
- Robison T.W. and Forman J.H. (1993). Dual effect of nitrogen dioxide on rat alveolar macrophage arachidonate metabolism. *Exp. Lung Res.* 19: 21-36.
- Robison T.W., Forman H.J., Thomas M.J. (1995). Release of aldehydes from rat alveolar macrophages exposed in vitro to low concentrations of nitrogen dioxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1256: 334-340.
- Robison T.W., Murphy J.K., Beyer L.L., Richters A., Forman H.J. (1993). Depression of stimulated arachidonate metabolism and superoxide production in rat alveolar macrophages following in vivo exposure to 0.5 ppm NO₂. *J. Toxicol. Environ. Health* 38: 273-292.

- Rose R.M., Fuglestad J.M., Skornik W.A., Hammer S.M., Wolfthal S.F., Beck B.D., Brain J.D. (1988). The pathophysiology of enhanced susceptibility to murine cytomegalovirus respiratory infection during short-term exposure to 5 ppm nitrogen dioxide. *Am Rev. Respir. Dis.* 137: 912-917.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sandström T., Ledin M.-C., Thomasson L., Helleday R., Stjernberg N. (1992). Reductions in lymphocyte subpopulations after repeated exposure to 1.5 ppm nitrogen dioxide. *Br. J. Ind. Med.* 49: 850-854.
- Sandström T., Stjernberg N., Eklund A., Ledin M.-C., Bjermer L., Kolmodin-Hedman B., Lindström K., Rosenhall L., Angström T. (1991). Inflammatory cell response in bronchoalveolar lavage fluid after nitrogen dioxide exposure of healthy subjects: a dose response study. *Eur. Resp. J.* 3: 332-339.
- Schlesinger R.B. (1987). Intermittent inhalation of nitrogen dioxide: effects on rabbit alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health* 21: 127-139.
- Schlesinger R.B., Driscoll K.E., Gunnison A.F., Zelikoff J.T. (1990). Pulmonary arachidonic acid metabolism following acute exposure to ozone and nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health* 31: 275-290.
- Schreck R., Albermann K., Baeuerle P.A. (1992). Nuclear factor κ B: an oxidative stress responsive transcription factor of eucaryotic cells (a review). *Free Rad. Res. Comms.* 17: 221-237.
- Schütze S., Wiegmann K., Machleidt T., Krönke M (1995). TNF-induced activation of NF- κ B. *Immunobiol.* 193: 193-203.
- Smeglin A.M., Roberts Jr. N.J., Morrow P.E., Utell M.J. (1986). Effects of 0.6 ppm nitrogen dioxide on human alveolar macrophage inactivation of influenza virus. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133: A216.
- Sone S., Brennan L.M., Cresia D.A. (1983). In vivo and in vitro exposure enhance phagocytic and tumoricidal activities of rat alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health* 11: 151-163.
- Speizer F.E., Ferris Jr. B., Bishop Y.M.M., Spengler J. (1980). Respiratory disease rates and pulmonary function in children associated with NO₂ exposure. *Am. Rev. Respir. Dis.* 121: 3-10.
- Stendahl O., Molin L., Lindroth M. (1983). Granulocyte-mediated release of histamine from mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 70: 277-284.

Su W.-Y., Folz R., Chen J.-S., Crapo J.D., Chang L.-Y. (1997). Extracellular superoxide dismutase mRNA expressions in the human lung by *in situ* hybridization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16: 162-170.

Taylor L.M., Menconi M.J., Polgar P. (1983). The participation of hydroperoxides and oxygen radicals in the control of prostaglandin synthesis. *J. Biol. Chem.* 258: 6855-6857.

Thien F.C.K. and Walters E.H. (1995). Eicosanoids and asthma: an update. *Prostagl. Leukotr. Ess. Fatty Acids* 52: 271-288.

Tracey K.J. and Cerami A. (1989). Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. *Curr. Opin. Immunol.* 1: 454-461.

Van Loveren H., Rombout P.J.A., Fischer P.H., Lebret E., Van Bree L. (1995). Modulation of host defense by exposure to oxidant air pollutants. *Inhal. Toxicol.* 7: 405-423.

Vodovotz Y., Bogdan C., Paik J., Xie Q.-W., Nathan C. (1993). Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by Transforming Growth Factor β . *J. Exp. Med.* 178: 605-613.

Voisin C., Aerts C., Jakubczak E., Tonnel A.V. (1977). La culture cellulaire en Phase gazeuse. *Bull. Europ. Physiopath. Resp.* 13: 69-82.

Warner R.L., Paine III R., Christensen P.J., Marletta M.A., Richards M.K., Wilcoxon S.E., Ward P.A. (1995). Lung sources and cytokine requirements for *in vivo* expression of inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12: 649-661.

Watanabe H., Fakase O., Isomura K. (1980). Combined effects of nitrogen dioxide and ozone on mice. In: *Nitrogen Oxides and Their Effects on Health* (ed. Lee S.D.). Ann Arbor, Mich.: Ann Arbor Science, 181-189.

Wheelock E.F. (1965). Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemmagglutinin. *Science* 149: 310-311.

Xie Q.-W. and Nathan C. (1994). The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leukoc. Biol.* 56: 576-582.

Xie Q.-W., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., Nathan C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256: 225-228.

Xie Q.-W., Whisnant R., Nathan C. (1993). Promotor of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177: 1779-1784.

Zhang Y., Lee T.C., Guillemin B., Yu M.-C., Schlesinger R.B. (1993). Enhanced $\text{IL-1}\beta$ and tumor necrosis factor- α release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J. Immunol.* 150: 4188-4196.

Zhou H., Duncan R.F., Robison T.W., Gao L., Forman H.J. (1997). Ca^{2+} -dependent p47^{phox} translocation in hydroperoxide modulation of the alveolar macrophage respiratory burst. *Am. J. Physiol.* 273 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 17): L1042-L1047.