

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Genexpression intrazellulärer NO-Synthase in bronchoepithelialen Zellen *in vivo* und *in vitro* nach Exposition mit Faser- und Partikel-förmigen Stäube**

von

A. Gillissen\*<sup>#</sup>, S. Löseke<sup>#</sup>, C. Martini<sup>#</sup>, G. Schultze-Werninghaus<sup>#</sup>

\* Universitätsklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn

<sup>#</sup> Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannsheil - Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Abt. für Pneumologie, Allergologie und Schlafmedizin, Bürkle-de-la-Camp-Platz 1, 44789 Bochum

Die Arbeiten des Projektes „Umwelt und Gesundheit“  
wurden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Förderkennzeichen: PUG L 97004

25 Seiten

12 Abbildungen

2 Tabellen

36 Literaturstellen

September 2000

# 1 Zusammenfassung

## **Regulative Mechanismen der Genexpression intrazellulärer NO-Synthase in bronchoepithelialen Zellen *in vivo* und *in vitro* nach Exposition mit faser- und partikelförmigen Stäuben**

A. Gillissen<sup>\*,#</sup>, S. Löseke<sup>\*</sup>, C. Martini<sup>\*</sup>, B. Schärfling<sup>\*</sup>, G. Schultze-Werninghaus<sup>\*</sup>

BG-Kliniken Bergmannsheil - Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, <sup>\*</sup>Abt. für Pneumologie, Allergologie und Schlafmedizin, Bochum, <sup>#</sup>Med. Univ.-Klinik und Poliklinik II, Bonn

**Einleitung/Ziele:** NO (Stickstoffmonoxid) ist ein zelluläres Produkt und in der humanen Lunge bei Entzündungsprozessen vermehrt nachweisbar (z.B. Asthma bronchiale, Bronchiektasen). Da die vermehrte Oxidantienfreisetzung als ein wesentlicher proinflammatorischer Mechanismus bei staubinduzierten Lungenerkrankungen (z.B. Asbestose) angesehen wird, sollte in diesem Projekt die Frage geklärt werden, ob prooxidativ wirkende Stäube (Krokydolithasbest, Quarz) in Bronchialzellen und/oder in Alveolarmakrophagen (AM) zu einer Steigerung der zellulären NO-Produktion führen.

**Studiendesign/Methodik:** Das Forschungsvorhaben gliederte sich in einen *in vitro* und in einen *ex vivo* Abschnitt. *In vitro* wurden an verschiedenen Zelllinien (A549, BEAS 2B) untersucht, ob und unter welchen Bedingungen sie NO produzieren (Griess-Reagenz) und ob die NO-Produktion mit der Induktion der zellulären iNOS (*inducible NO-synthase*) korreliert. Da vorwiegend A549-Zellen zur NO-Produktion in der Lage sind, wurde auf die Expositionsversuche von BEAS 2B-Zellen verzichtet. Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt: a) Quantifizierung der NO-Produktion (Griess-Reagenz) und iNOS Expression (Northern Blot-Analysen) vor und nach Stimulation mit Zytokinen (Tumornekrosefaktor-alpha [TNF- $\alpha$ ], Interleukin-1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ], Interferon-gamma [IFN- $\gamma$ ], je 10 ng/ml), Krokydolith und Quarz (Negativkontrolle: Latexpartikel; b) Quantifizierung der NO-Produktion und Evaluierung deren Stimulierbarkeit in AM (gewonnen an Patienten mit pulmonalem Rundherd, n =30); c) Detektion der iNOS mRNA (*in situ* Hybridisierung) in Bronchialschleimhautbiopsien (Raucher-/Nichtraucher; staubexponierte/nichtstaubexponierte Patienten; n=19); d) Quantifizierung der NO-Produktion von A549-Zellen unter Koinkubation des Kulturüberstandes stimulierter (Krokydolith) AM (Kontrollen: L-NAME, entsprechende Zytokinantikörper. e) Quantifizierung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in AM-Überständen (ELISA).

**Ergebnisse:** Die zelluläre NO-Freisetzung war am effektivsten in der Zelllinie A549 durch die kombinierte Gaben von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  induzierbar. Die NO-Synthese verhielt sich wie folgt (vor und nach Zytokinstimulation): basal  $6,1 \pm 3,2$ ; unter Stimulation  $20,7 \pm 10,3 \cdot 10^{-6}$  mol/l/mg Protein ( $p < 0,001$ ). Die Inkubation mit nicht-zelltoxischen (LDH *release* Assay)

Konzentrationen von Krokydolithasbest und Quarz ( $1-8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Inkubationszeiten: 8, 24, 48 h) hatte keinen Effekt auf die NO-Produktion. Parallel konnte der iNOS mRNA-Nachweis geführt werden. Mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnene AM sezernieren ebenfalls NO. Allerdings ist NO-Produktion nicht steigerbar (weder durch die o.g. Zytokine noch durch eine Staubexposition [ $1-8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Inkubationszeiten: 8, 24, 48 h] oder Lipopolysaccharide): Werte um  $1,8\pm 10^{-6}$  mol/l/mg Protein. In den Bronchialschleimhautbiopsien ließ sich iNOS mRNA überwiegend im Bronchialepithel nachweisen. Staubexponierte Patienten (Asbest, Kohlemischstäube) zeigten überproportional (8 von 10 Patienten) häufiger, nichtstaubexponierte Probanden dagegen kaum (2 von 9 Patienten) positive Signale in den Biopsien. Eine Abhängigkeit zum Raucherstatus ergab sich nicht. Zur Überprüfung der Hypothese einer möglichen Interaktion zwischen AM und bronchoepithelialen Zellen wurde der Überstand LPS-stimulierter AM A549-Zellen zugegeben. Dadurch ließ sich die NO-Produktion signifikant erhöhen: basal  $5,66\pm 0,64$ ; unter Stimulation  $16,80\pm 1,13 \cdot 10^{-6}$  mol/l/mg Protein ( $p < 0,01$ ). Eine Vorinkubation der AM mit Krokydolith-Asbest ( $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 24 h) erbrachte keine zusätzliche Steigerung. Der Grund liegt in der mangelnden zusätzlichen Steigerung der Zytokinantwort, da  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  trotz der Staubexposition nicht zusätzlich sezerniert wurde. Die Koinkubation mit den Antikörpern anti- $\text{TNF-}\alpha$ , - $\text{IL-1}\beta$  und - $\text{IFN-}\gamma$  und die Gabe des spezifischen iNOS-Inhibitors L-NAME unterdrückte die vormalig erhöhte NO-Produktion von A549-Zellen.

### **Zusammenfassung:**

- a) Das Bronchialepithel ist der wesentliche Ursprungsort zellulärer NO-Freisetzung der tieferen Atemwege. Die NO-Produktion von A549-Zellen ist durch Zytokine ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IFN-}\gamma$ ) nicht jedoch durch Stäube (Krokydolith, Quarz) steigerbar.
- b) AM produzieren NO. Die NO-Freisetzung ist jedoch weder durch Zytokine noch durch Stäube zusätzlich stimulierbar.
- c) AM produzieren die für die NO-Produktion der bronchoepithelialen Zellen notwendigen Zytokine. Es konnte die Interaktion der beiden nach inhalativer Fremdstoffbelastung primär bedeutungsvollen Zelltypen (bronchoepitheliale Zellen, AM) anhand der zellulären NO-Freisetzung nachgewiesen.
- d) Die iNOS wird überwiegend in Bronchialepithelzellen exprimiert, wobei in vivo eine Staubexposition unabhängig vom Raucherstatus eine vermehrte Expression zu begünstigen scheint.

Das Projekt wurde am 31.12.1999 abgeschlossen.

## **2 Einleitung**

Der Pathomechanismus der durch Faser- und Partikel-förmige Stäube induzierten Zellschäden ist komplex. Ein wichtiger Faktor in der Entwicklung der durch anorganische Stäube verursachten Lungenveränderungen (z.B. Lungenfibrose nach Asbestexposition) ist die dabei vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffmetabolite [12,19,23]. Auch dem Stickstoffoxid und seinen reaktiven und zum Teil hoch toxischen Sauerstoffmetaboliten (z.B. Peroxinitrit,  $O_2^-$ ,  $NO\bullet$ ) wird diesbezüglich eine bedeutsame Rolle zugeschrieben, zumal sie in der unspezifischen Immunabwehr, bei verschiedenen anderen pulmonalen inflammatorischen Prozessen (z.B. Asthma bronchiale) und in der Karzinogenese (z.B. Colonkarzinom, Melanom) ursächlich oder reaktiv beteiligt sind [7,15,17,24]. Die Bildung von NO beruht auf dem L-Arginin-NO-Stoffwechselweg, wobei aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff NO und Citrullin entstehen. Diese Reaktion wird durch die NO-Synthase katalysiert [6,13]. Von den drei bekannten Isoformen der NO-Synthase wird die NO-Produktion in den Atemwegen überwiegend der induzierbaren Stickstoffsynthase (iNOS) zugeschrieben, weswegen seit wenigen Jahren diesem Enzym hinsichtlich der Analyse inflammatorischer pulmonaler Prozesse ein großes Interesse zuteil wurde.

Ob der Induktion der in den bronchoepithelialen Zellen vorzugsweise expremierten iNOS nach einer Exposition von Stäuben eine biologische Rolle zukommt, ist unbekannt und daher Gegenstand dieses Forschungsvorhaben.

## **3 Material und Methoden**

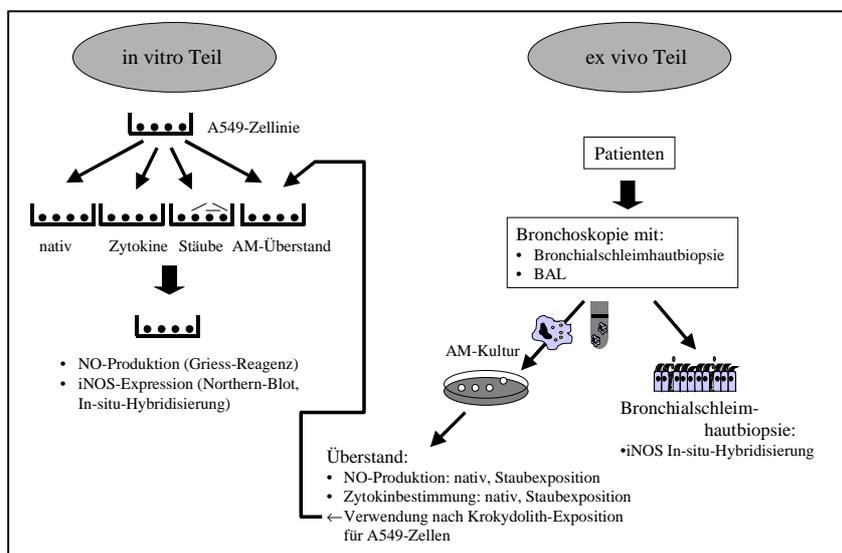
### **3.1 Materialien**

Agarose SeaKemLE (Biozym), Anti-huBAX polyklonale Rabbit-Antikörper (Upstate), Anti-Digoxigenin-AP-Fab Fragmente, CSPD, Nitrat-Reduktase, Dig-RNA Labeling Mix, positiv geladene Nylonmembran, SP6 RNA-Polymerase, T7 RNA-Polymerase (Boehringer Mannheim), DAB, Limulus-Amoebocyte-Assay, FAD, Fast/red Naphtol, DMEM, NADPH, HAM's F-12K-Zellmedium, Proteinase K, X-OMAT XAR-5 Röntgenfilm, Titandioxid (Sigma Chemie), Paraformaldehyd, Essigsäureanhydrid, Triethanolamin (Merck), fetales Kälberserum FCS (ICN Biomedicals GmbH, Deutschland), Griess-Reagenz, Formamid, Natriumnitrit, Xylol (Fluka), Goat anti-Rabbit IgG HRPO konjugiert (Dianova), humaner

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), humanes Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) beide Zytokine in rekombinanter Form, TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Antikörper, beide in monoklonaler Form (R&D Systems), humanes Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) rekombinant, ELISA Kits für IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Endogen), *in situ* Hybridisierungslösung (Dako), RPMI 1640-Zellmedium, Pen/Strep-Zellmediumzusatz (Gibco BRL, Deutschland), QuickPrep Micro-mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech).

### 3.2 Aufbau des Forschungsvorhabens

Es soll die Hypothese bewiesen oder widerlegt werden, daß die prooxidativ wirkenden Krokydolithfasern und Quarzstäube sowohl in bronchoepithelialen Zellen als auch in



**Abbildung 1:** Schematische Übersicht über die durchgeführten Arbeiten.

alveolären Makrophagen (AM) zu einer Induktion der NO-Synthese und – Freisetzung führen. Dazu wurde das hier beschriebene Forschungsvorhaben in einen *in vitro* und einen *ex vivo* Teil gegliedert (Abb. 1). *In vitro* wurden zwei bronchoepitheliale Zelllinien auf Ihre Fähigkeit NO zu produzieren

und iNOS zu exprimieren unter verschiedenen Expositionsbedingungen evaluiert. Der *ex vivo* Abschnitt beinhaltete a) Untersuchungen zur Frage, ob bronchoepitheliale Zellen, die mittels Bronchialschleimhautbiopsien gewonnen wurden, *in vivo* iNOS exprimieren, und b) wurden mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) AM gewonnen, isoliert und unter verschiedenen Bedingungen exponiert und auch hier NO-Messungen durchgeführt. Abschluß der Untersuchungen bildete die Analyse des Teilaspekts, ob AM-Sekretionsprodukte bronchoepitheliale Zellen zur NO-Produktion anregen können und somit auch bezüglich der NO-Freisetzung eine Zell-Zell-Interaktion zwischen beiden Zelltypen besteht. Abb. 1 gibt schematisch eine Übersicht über die durchgeführten Arbeiten.

### 3.3 Verwendete Fasern und Stäube

Für die Faserepositionsversuche wurden standardisierte UICC-Krokydolith-Fasern (*Union Internationale Contre le Cancer*; Fa. Mikrotechnik, München zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. K.-M. Müller, BG-Kliniken Bergmannsheil, Institut für Pathologie, Bochum) verwendet. Die Faser ist detailliert in früheren Arbeiten charakterisiert worden [12,27,33].

Außerdem verwendeten wir für die Untersuchungen den Quarzstaub Dörentrup 12 (ebenfalls zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. K.-M. Müller). Als Kontrollpartikel wurde Titandioxid verwendet. Da Titandioxid chemisch und biologisch inert ist, wurde ausgeschlossen, daß der Versuchsansatz an sich schon zu einem Effekt führt. Alle für die *in vitro* Expositionsversuche verwendeten Fasern wurden vor Versuchsbeginn hitzesterilisiert (120° C, 30 min), und eine mögliche Endotoxinkontamination der Stäube und des Zellmediums ausgeschlossen (Limulus-Amoebocyte-Assay). Die Charakteristika der verwendeten Faser und Stäube sind in Tab. 1 zusammengefasst.

<b>Staub</b>	<b>Durchmesser</b>	<b>Länge</b>	<b>Spezifische Oberfläche</b>	<b>Chemische Zusammensetzung (%)</b>
<b>Krokydolith<sup>+</sup></b>	10 %: < 0,08 µm 50 %: < 0,11 µm 90 %: < 0,18 µm	10 %: < 0,3 µm 50 %: < 0,9 µm 90 %: < 3,6 µm 3 %: < 5,0 µm	8,3 m <sup>2</sup> /g	Na <sub>2</sub> (Fe <sup>3+</sup> ) <sub>2</sub> (Fe <sup>2+</sup> ) <sub>3</sub> Si <sub>8</sub> O <sub>22</sub> (OH) <sub>2</sub> Fe <sup>2+</sup> : 14 % Fe <sup>3+</sup> : 13 %
<b>Quarzstaub<sup>&amp;</sup></b> (Dörentrup 12)	Partikelgröße 58 %: < 10 µm 34 %: < 5 µm		8,5 m <sup>2</sup> /g	SiO <sub>2</sub> : 100
<b>Latexpartikel<sup>%</sup></b>	Durchmesser 0,094 ± 0,013 µm		5,9 m <sup>2</sup> /g	Polystyren

Tabelle 1: *Charakteristik der verwendeten Fasern und Stäube. Angaben von: Krokydolith<sup>+</sup> entsprechend [33] Quarzstaub<sup>&</sup> entsprechend [2,22,35] Latexpartikel<sup>s</sup> entsprechend Sigma Chemie*

### **3.4 Verwendete Zelllinien und Inkubationsbedingungen**

Für die *in vitro* Expositionsversuche mit den oben beschriebenen Fasern wurden die bronchoepithelialen Zelllinien BEAS 2B und A549 (*American Type Culture Collection*) verwendet. Bei den BEAS 2B Zellen handelt sich um eine aus humanen bronchoepithelialen Zellen gewonnene und durch SV40 Transformation immortalisierte Zelllinie. Die A549-Zellen sind Adenokarzinomzellen der Lunge, die Eigenschaften von Pneumozyten Typ II besitzen. Beide Zelllinien wurden uns freundlicher Weise von Herrn Dr. C. C. Harris (National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD/USA) zur Verfügung gestellt. Die BEAS-2B Zellen wurden in RPMI 1640-Zellmedium (10% FCS, 200 IU/ml Penicillin-200 µg/ml Streptomycin) bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Für die Stimulationsversuche wurden die Zellen (A549 und BEAS 2B) in F12K-Medium bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 10 % inkubiert. Die iNOS-Expressionstudien (Zugabe der Zytokine oder der Stäube) wurden in serumfreiem DMEM (ohne Phenolrot) für 8, 24, oder 48 Stunden durchgeführt.

Die *in vivo* gewonnenen AM wurden in DMEM (5% FCS ohne Phenolrot) gewaschen, wonach sich ein Adhärierungsschritt für 2 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> anschloß. Die so gewonnene Zellkultur bestand aus zu über 99% aus AM. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen entweder mit oder ohne Staubexposition (Krokydolith, Quarz, Kontrollpartikel: Latex) für 24 h inkubiert. Der so gewonnene, konditionierte Kulturüberstand wurde dann weiter analysiert (Zytokinbestimmungen, Zugabe zu A549-Zellkultur, s.u.).

### **3.5 Quantifizierung der NO-Produktion**

Das zellulär gebildete NO diffundiert leicht aus den Zellen heraus und oxidiert extrazellulär innerhalb von ca. vier Sekunden in seine Folgeprodukte Nitrit (NO<sub>2</sub>) und Nitrat (NO<sub>3</sub>). Der quantitative Nachweis der NO-Folgeprodukte im Kulturüberstand erfolgte über die Messung des Gesamtnitritgehalts der Probe. Dazu wurde das in der Probe vorhandene Nitrat durch den Zusatz von NADPH/FAD und des Enzyms Nitrat-Reduktase und Inkubation für 1 h bei 25 °C zu Nitrit reduziert. Anschließend wurden 100 µl Probe mit 100 µl Griess-Reagenz gemischt und für 10 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Dabei reagierte das Griess-Reagenz mit dem Nitrit und es bildete sich ein rot-violetter Farbstoff, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifiziert wurde. Die Datenaufnahme erfolgte mittels eines ELISA-Reader (Novus Molecular Inc.). Die NO<sub>2</sub>-Konzentration errechnet sich anhand einer Standardkurve (0 µM - 100 µM NaNO<sub>2</sub> in DMEM).

### **3.6 Nachweis der iNOS-mRNA durch Northern Blot-Analyse**

Die Durchführung der Northern Blot-Analysen zum Nachweis einer induzierten iNOS Expression in den A549-Zellen folgte mit leichten Modifikationen der bei Southern (1975) und Sambrook et al. (1989) beschriebenen Standardprotokolle [30,31]. Zum spezifischen Nachweis der iNOS-mRNA wurde ein nichtradioaktives Verfahren eingesetzt, bei dem die Hybridisierungssignale mittels Chemilumineszens auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Dazu wurde aus den *in vitro* exponierten Zellen die Gesamt-mRNA mittels des QuickPrep Micro-mRNA Purification Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Gesamt-mRNA wurde auf einem 1 % denaturierenden Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem

Kapillartransfer der mRNA auf eine positiv geladene Nylonmembran wurde die Membran mit den verschiedenen Sonden ü.N. hybridisiert. Die sich anschließenden Waschschriffe zur Erzielung der notwendigen Stringenz wurden auf die jeweilig verwendeten Sonden eingestellt. Für die Hybridisierung setzten wir eine mittels *in vitro*-Transkription mit Digoxigenin markierte 1,9 kb große antisense cRNA Sonde ein. Als Template für die *in vitro*-Transkription diente das Plasmid pCCF21, welches ein 1,9 kb großes Insert der humanen iNOS-cDNA enthält. Nach der Hybridisierung und den Waschschriffen wurde mittels eines Anti-Digoxigenin-Antikörpers, an den die alkalische Phosphatase konjugiert war, und dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD die Signale visualisiert. Die Ergebnisse der Hybridisierungen wurden direkt auf einem Röntgenfilm detektiert (Expositionszeit 8-30 min). Als Standard wurden die Membranen mit einer Sonde für das *housekeeping* Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) rehybridisiert.

### 3.7 Patientenkollektive

Für die hier vorgestellten Untersuchungen an isolierten AM und den Bronchialschleimhautbiopsien wurden insgesamt 49 Patienten rekrutiert. Alle Patienten unterzogen sich aus diagnostisch-therapeutischen Gründen einer Bronchoskopie und einer BAL, die nach einem früher beschriebenen Standardvorgehen durchgeführt wurde [8]. Die AM wurden von 30 Patienten gewonnen, die sich zur Abklärung eines pulmonalen Rundherdes einer Bronchoskopie unterziehen mußten. Jeder dieser Patienten (8 Frauen u 22 Männer) rauchte, eine Staubexposition bestand nicht. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß die AM von Rauchern durch diese Exposition chronisch aktiviert sind, weswegen sie sich besonders gut für unsere *in vitro* Untersuchungen eigneten [11].

<b>Exposition</b>	<b>Patientenzahl</b>	<b>Geschlecht</b> (männlich/weiblich = m/w)	<b>Raucher</b>	<b>Staub</b> (A = Asbest; M = Mischstaub)
∅ Staubexp.	9	m=5, w=5	n=4	∅
Staubexposition	10	m=8, w=2	n=0	A=4, M=6

**Tabelle 2:** Übersicht der Patienten bei denen eine bronchoepitheliale Biopsie gewonnen und analysiert wurde.

Bei 19 Patienten wurde eine Biopsie der Bronchialschleimhaut (3. und 4. Bronchusgeneration) entnommen. Entsprechend der beruflichen Staubexposition (Kohlemischstäube, Asbeststäube im Rahmen anhängiger oder abgeschlossener Berufskrankheitenverfahren) teilten wir dieses Kollektiv in zwei Gruppen ein (Tab. 2).

### **3.8 Nachweis der iNOS mRNA durch *in situ* Hybridisierung**

Zur morphologischen Lokalisation einer iNOS Genexpression in Bronchialschleimhaut-Biopsien der verschiedenen Patientengruppen (Tab. 2) wurde die Methode der *in situ* Hybridisierung angewendet. Die auf silanisierten Objektträgern befindlichen Dünnschnitte (5  $\mu\text{m}$ ) wurden in Xylol entparaffiniert und in einer Alkoholreihe rehydriert. Zur Demaskierung der RNA und Permeabilisierung der Zellen wurden die Schnitte mit Proteinase K behandelt (30 min 30  $\mu\text{g/ml}$  PBS bei 37 °C). Nach zwei Waschschritten in PBS wurden die Schnitte vor der weiteren Behandlung fixiert (15 min in 4 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,0). Zur Reduktion unspezifischer Bindung der Sonden an das Gewebematerial wurden die Schnitte für 12 min in 0,1 M Triethanolamin mit 0,25 % Essigsäureanhydrid, pH 8,0 inkubiert. Es folgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe die Dehydrierung und danach für 1 h die mit je 100  $\mu\text{l}$  einer *in situ* Hybridisierungslösung (ohne Sonden) bei 62 °C in einer feuchten Kammer durchgeführte Prähybridisierung. Im Anschluss wurde pro Schnitt entweder 15  $\mu\text{l}$  der Hybridisierungslösung mit der Digoxigenin markierten iNOS antisense oder sense Sonde aufgetragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 62 °C in einer feuchten Kammer. Zur Entfernung der ungebundenen Sonde und Erzielung der notwendigen Spezifität wurden die Schnitte unter stringenten Bedingungen gewaschen (4 x 30 min in 0,1 x SSC, 70 % Formamid bei 64 °C). Nach einem Blockierungsschritt (200  $\mu\text{l}$  Blockinglösung pro Schnitt; 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,8 (w/v) BSA) zur Reduktion unspezifische Antikörperbindung an das Gewebe, wurden die Proben für 1 h bei RT mit Anti-Dig-AP- Fab-Fragmenten (1:500 Verdünnung in Blockinglösung) inkubiert. Nach Waschen der Schnitte für 2x 15 min in TBS visualisierten wir die Signale durch Inkubation (20-30 min bei RT) mit einer Fast/Red Naphtol Lösung. Anschließend wurden die Gewebe mit Hämatoxilin gegengefärbt.

### **3.9 Quantifizierung der IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ -Produktion durch AM**

Die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wurden im Kulturüberstand von *in vitro* kultivierten und mit Asbest exponierten Alveolarmakrophagen gemessen. Die Quantifizierung der Zytokine im zellfreien Überstand erfolgte mittels kommerzieller ELISA Kits nach Angaben des Herstellers.

### **3.10 Bestimmung des Gesamt-Proteins und der Zytotoxizität**

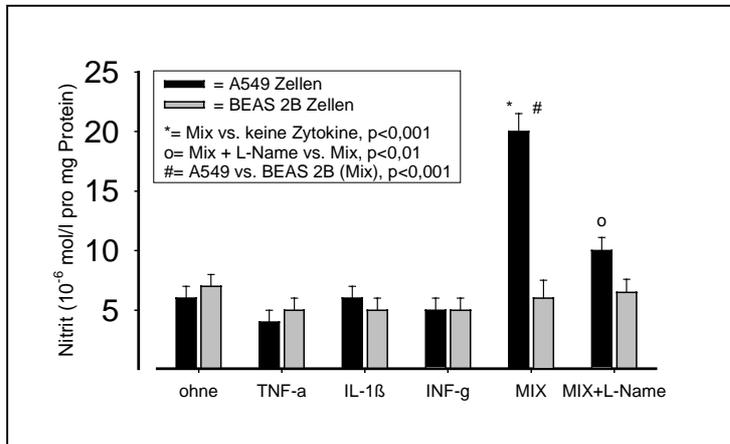
Da eine exakte Bestimmung der Gesamtzellzahl in den von uns durchgeführten Versuchen nicht möglich war, wurden alle gewonnenen Ergebnisse auf mg Gesamtprotein (gemessen im Zellysat) bezogen. Dazu wurde eine nach Bradford (1976) modifizierte Methode verwendet. Das Messprinzip beruht auf der spezifischen Reaktion von Proteinen mit der Farblösung Coomassie Brilliant Blue G-259, Bio-Rad, spektrophotometrisch messbar bei 630 nm. Alle Probenmessungen erfolgten in 3-fach Bestimmungen.

Die Zytotoxizität der mit den Stäuben exponierten Zellen wurde mit dem LDH-*release* Assay quantifiziert. Dieser Assay war zuvor mit Trypanblau validiert worden und wurde schon früher detailliert beschrieben [12]. Eine staubinduzierte Zytotoxizität konnte in jedem der hier beschriebenen Versuchsansätze ausgeschlossen werden.

### **3.11 Statistik**

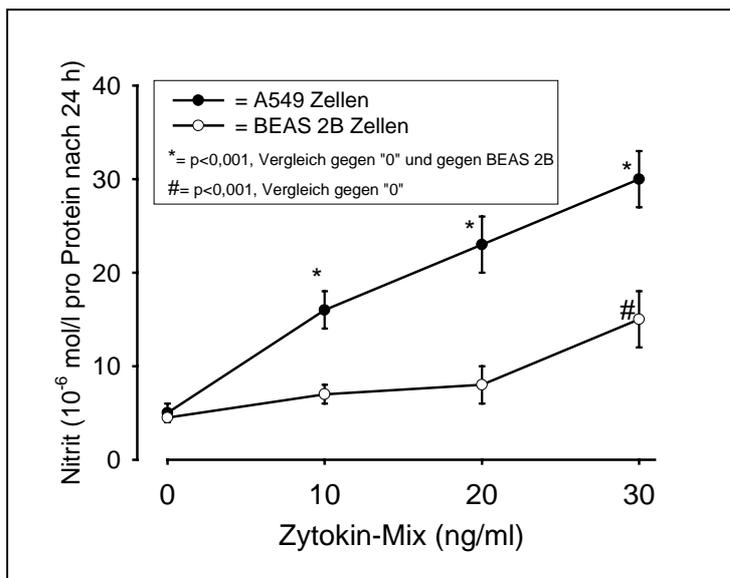
Für die statistische Sicherung von Unterschieden wurde der ANOVA-Test (Varianz-Test) für 2 unabhängige Stichproben angewandt. Die Nullhypothese wurde bei Überschreiten eines Wahrscheinlichkeitsniveaus von 95% ( $=p < 0,05$ ) verworfen.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 2:** NO-Produktion der A549- und der BEAS 2B Zelllinien vor und nach Zytokinstimulation. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. MIX = TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  + INF- $\gamma$  je 10 ng/ml. L-NAME = spez. iNOS-Inhibitor.

Zellen zu einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) NO-Synthesesteigerung. Der spezifisch iNOS-Inhibitor L-NAME resultierte in einer signifikanten ( $p < 0,01$ ) Reduktion der Zytokinvermittelten NO-Steigerung.



**Abbildung 3:** Dosis-abhängige NO-Produktion in A549- und in BEAS 2B-Zellen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

### 4.1 Vergleichende Analyse der NO-Produktion BEAS-2B und A549-Zellen

Zunächst wurde die NO-Produktion der Zelllinien A549 und BEAS 2B untersucht. Ziel war es die NO-Synthese durch Hinzugabe der Zytokine TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und

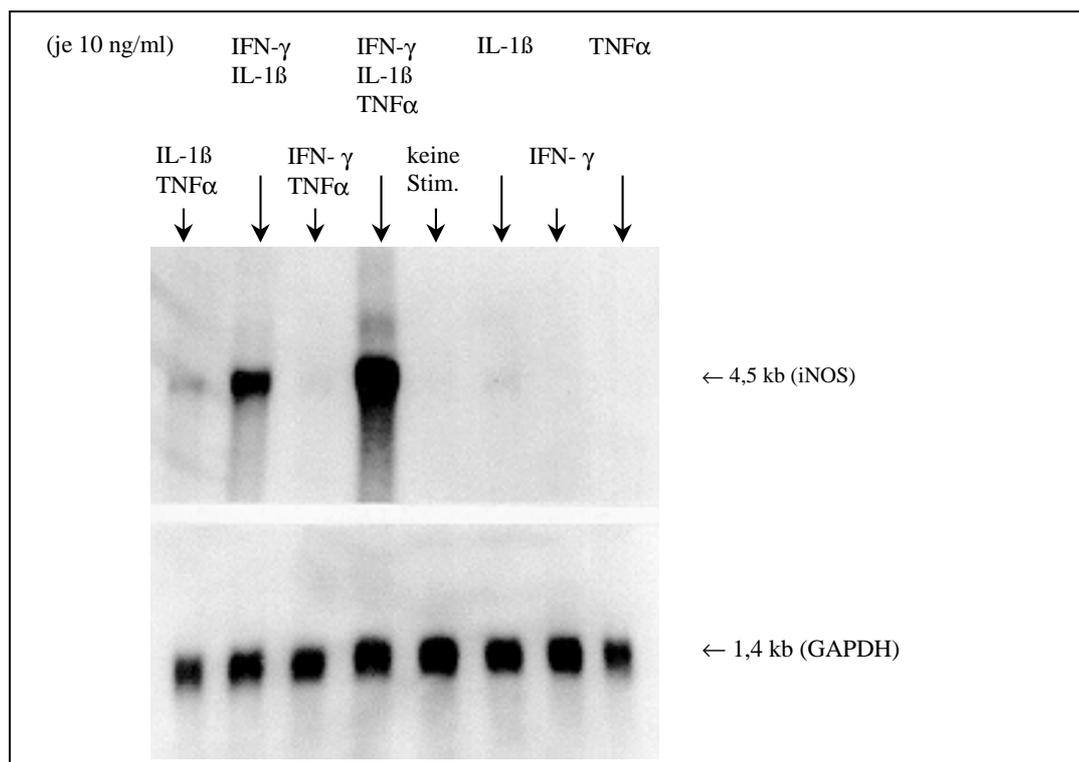
IL-1 $\beta$  zu stimulieren. Abb. 2 zeigt die Ergebnisse. Lediglich die Kombination aus allen drei Zytokinen führte bei den A549, nicht jedoch bei den BEAS 2B

Die Dosis abhängige NO-Produktion der Zelllinien BEAS-2B und A549 nach einer ansteigenden Zytokinstimulation zeigt Abb. 3. Die Zellen wurden mit je einer Zytokinmischung bestehend aus TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ , je 10, 20 und 30 ng/ml für 24 h inkubiert. Die Nitritkonzentrationen ließen sich im Kulturüberstand quantifizieren. Es kam bei A549-Zellen in Abhängigkeit zur gewählten Zytokinkonzentration zu

einer Zunahme der freigesetzten NO-Menge ( $p < 0,001$ ). Nur unter Verwendung einer hohen Dosis der Zytokinmischung (30 ng/ml) ließ sich auch bei der schlecht induzierbaren Zelllinie BEAS-2B eine signifikant gesteigerte NO-Synthese ( $p < 0,001$ ) erzielen (Abb. 3).

#### 4.2 Nachweis der zytokinabhängigen Stimulation der iNOS-Transkription in A549-Zellen durch Northern Analyse

Ergänzend zu den Nitritbestimmungen im Kulturüberstand der beiden genannten Zelllinien



wurde jetzt der iNOS mRNA Nachweis mittels Northern Blot-Analysen geführt. Da die BEAS

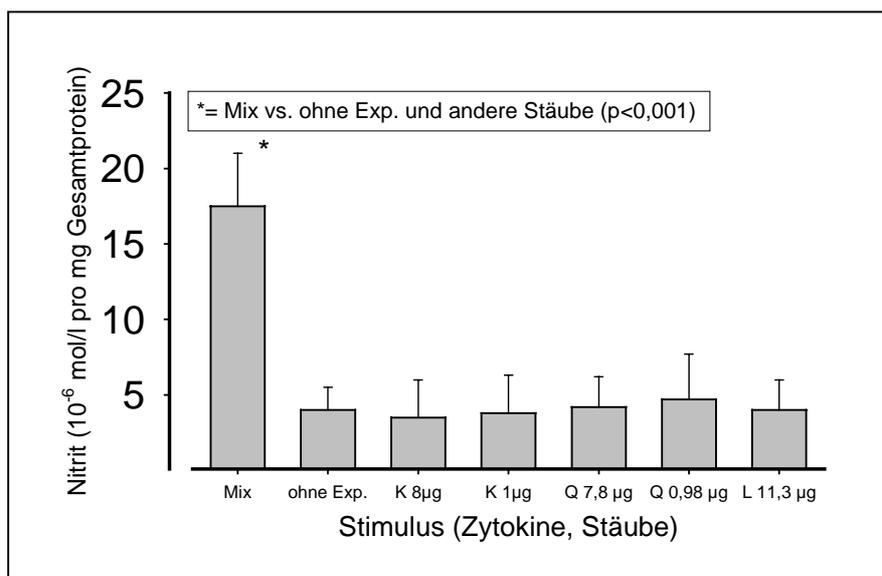
**Abbildung 4:** Northern Blot zum Nachweis der iNOS-mRNA in A549-Zellen nach Zytokinstimulation (je 10ng/ml).

2B-Zellen im Gegensatz zu den A549 nur bei sehr hohen Zytokinkonzentrationen zur NO-Produktion angeregt werden können, konzentrierten sich die weiteren in vitro Analysen lediglich auf die A549-Zellen. Die Northern Blot-Analysen wurden nach einer 8-stündigen Zytokin-Stimulation (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , einzeln oder in Kombination, je 10 ng/ml) durchgeführt. Alle Northern Blots wurden mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert. Es zeigt sich, daß unstimulierte A549-Zellen (Spur K) keine im Northern Blot detektierbare iNOS-mRNA Mengen aufweisen. Eine maximale Induktion der iNOS Transkription war nur durch eine Inkubation mit der Zytokinmischung erzielbar. Der Zusatz von jeweils nur einem der drei Zytokine im Zellmedium führte zu keiner Stimulation der

iNOS- Transkription. Die kombinierte Gabe zweier Zytokine ermöglicht es, die Zellen zur Produktion der iNOS-mRNA anzuregen, so führte die Kombinationen IFN  $\gamma$ /IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  zu einer iNOS-Induktion, die aber im Vergleich schwächer war. Die Kombination IFN  $\gamma$ /IL-1 $\beta$  führt zum zweitstärksten Signal, während die Kombination IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  nur zu einer sehr schwachen zellulären Antwort in Bezug auf eine iNOS-Transkription führt. Die Ergebnisse belegen die Bedeutung der kombinierten Zytokinstimulation in Bezug auf die iNOS-Expression bei A549-Zellen.

#### 4.3 Einfluß einer *in vitro* Faserexposition auf die NO Produktion in A549-Zellen

Die prooxidative Wirkung von Krokydolith und Quarz ist schon in früheren Forschungsvorhaben nachgewiesen worden [9,11,23]. Zur Klärung der Frage ob Krokydolith und Quarz die NO-Produktion von Bronchialepithelzellen stimulieren, wurden A549-Zellen mit diesen Stäuben entsprechend exponiert und es wurde anschließend im Kulturüberstand die



**Abbildung 5:** NO-Produktion in A549-Zellen nach Staubexposition (30 h). Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. Mix= TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  + INF- $\gamma$  je 10 ng/ml. K = Krokydolith, Q = Quarzstaub, L = Latexpartikel. Mengenangaben in  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. Die Staubmengen beziehen sich auf die Faseroberfläche Krokydolith und sind auf eine einheitliche Oberflächenmenge justiert.

NO-Produktion

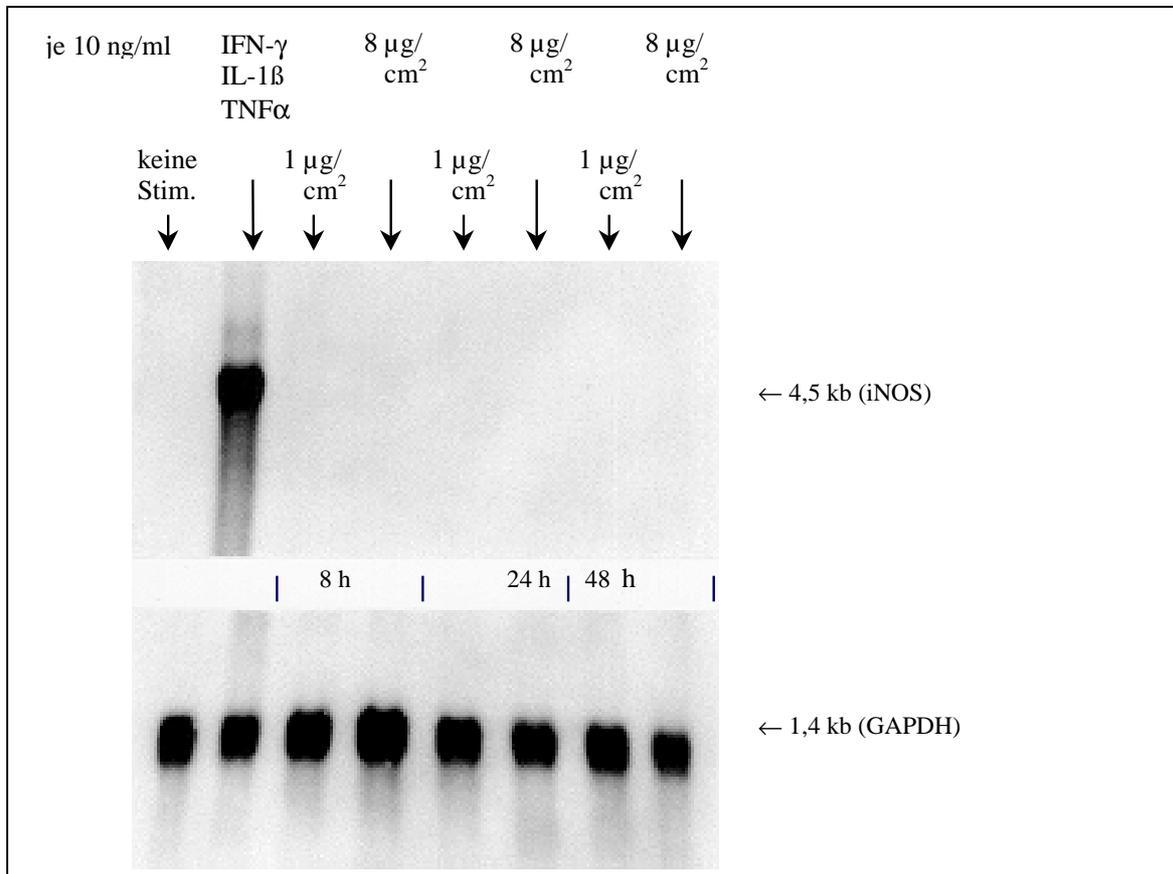
quantifiziert. Als Kontrollpartikel verwendeten wir die als biologisch inert geltenden Latexpartikel. Dazu wurden die A549-Zellen für 30 h entweder mit Krokydolithasbestfasern (1/cm<sup>2</sup>  $\mu$ g bzw. 8  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), Quarzstaub (0,98  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> bzw. 7,8  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), Latexpartikel (11,3  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) oder mit der Zytokinmischung (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , je 10 ng/ml) inkubiert. Es ließ sich in diesem *in vitro* Meßsystem bei keinem der Stäube ein induktiver Effekt gegenüber der unstimulierten Kontrolle auf die NO-Produktion in A549-Zellen nachweisen (Abb. 5). Auch die

NO-Produktion in A549-Zellen nachweisen (Abb. 5). Auch die

Koinkubation der Staubexposition zusammen mit der Zytokinmischung führte nicht zu einer zusätzlichen Steigerung der NO-Produktion (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4 Einfluß einer Fasereexposition auf die iNOS- Transkription in A549-Zellen

Parallel zur Nitrit-Bestimmung wurde wiederum die iNOS-Transkription mittels Northern



Blot untersucht. Dazu exponierten wir die Zellen mit Krokydolithfasern und in einer zusätzlichen Versuchsreihe mit Quarzstaub für 8, 24 und 48 h. Abb. 6 zeigt die Ergebnisse der

**Abbildung 6:** Detektion der iNOS-Transkription in A549-Zellen mittels Northern Blot nach 8, 24 und 48 h Exposition mit zwei verschiedenen Krokydolithkonzentrationen ( $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$  oder  $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). der Zytokinmischung IFN  $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (je 10 ng/ml); kein Stim. = unstimulierte Zellen. Rehybridisierung der Northern Blots mit einer GAPDH spezifischen Sonde.

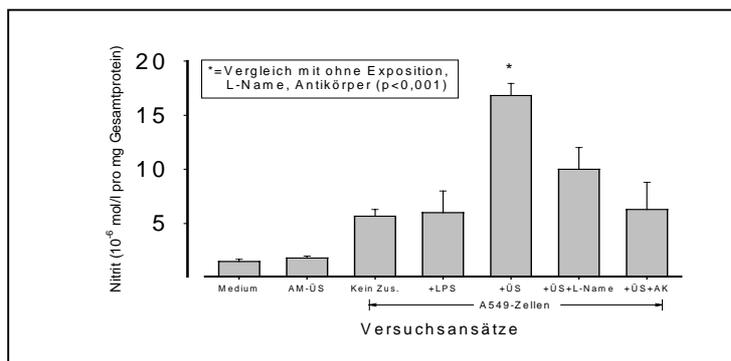
mit Krokydolith erhobenen Versuchsreihe.

Eine alleinige Exposition der A549-Zellen mit Krokydolith führte weder in niedriger Dosierung ( $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) noch bei einer hohen Expositions-konzentration ( $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) über den beobachteten Zeitraum von bis zu 48 h zu einer signifikanten iNOS-Transkription (Abb. 6). Lediglich die Zytokinmischung bestehend aus je 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  resultierte in einem deutlichen Signal. Das Ergebnis ist mit dem der Quarzstaubexpositionsversuche

identisch (Daten nicht gezeigt). Auch die Koinkubation der Stäube zusammen mit der Zytokinmischung führte im Vergleich zu der alleinigen Zytokinstimulation nicht zu einer zusätzlichen Signalsteigerung (Daten nicht gezeigt). Damit werden die Ergebnisse aus den oben beschriebenen NO-Messungen auf Transkriptionsebene bestätigt.

#### 4.5 Stimulation der NO Produktion in A549-Zellen durch Sekretionsprodukte der AM

Nach den bisherigen Ergebnissen lassen sich bronchoepitheliale Zellen nur durch die hier

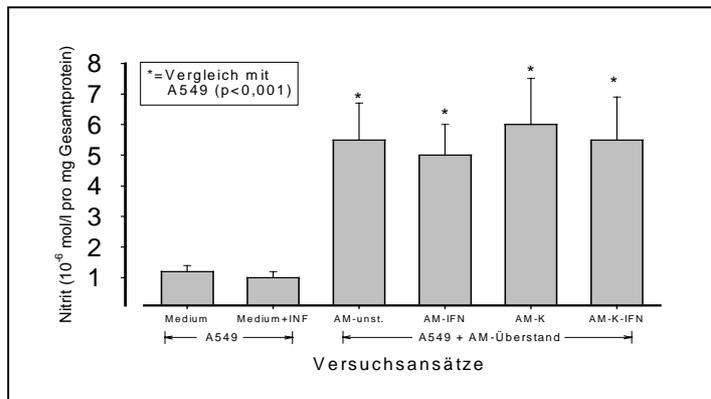


**Abbildung 7:** Steigerung der NO-Produktion in A549-Zellen durch Kulturüberstände (ÜS) von Lipopolysaccharide (LPS)-stimulierter Alveolar-makrophagen (AM). Außerdem: ÜS + L-NAME ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l). Angaben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. L-NAME = spezifischer iNOS-Inhibitor, AK = Antikörpermischung gegen TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ , kein Zus. = A549 in Medium ohne Zusatz oder Exposition.

verwendete Zytokinmischung, nicht aber durch die Stäube zur NO-Produktion und zur iNOS-Transkription anregen. Dieses Ergebnis ließ den AM eine besondere Rolle bei der iNOS-Induktion zukommen. Als Produzenten proinflammatorischer Zytokine könnten sie eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der NO-Antwort von bronchoepithelialen Zellen spielen. Dieser Aspekt wurde hier evaluiert. Dazu wurden AM mit LPS stimuliert

und anschließend der zellfreie, konditionierte Kulturüberstand zusammen mit A549-Zellen (4. Passage) für 30 h inkubiert und deren NO-Produktion quantifiziert. Der konditionierte AM-Zellkulturüberstand steigerte die NO-Synthese von A549-Zellen ( $p < 0,001$ ). AM vermögen über das Zytokinnetzwerk einen adäquaten Stimulus für die iNOS-Induktion in A549-Zellen zu bilden. Als Negativkontrollen wählten wir a) den spezifischen iNOS-Inhibitor L-NAME und b) Antikörper gegen die oben erwähnte Zytokinmischung TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ . Beide Negativkontrollen resultierten in einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktion der zellulären NO-Produktion. Die Ergebnisse nach Antikörperzugabe bestätigten erneut den stimulativen Einfluß der genannten drei Zytokine auf die iNOS-Induktion und NO-Produktion in A549-Zellen.

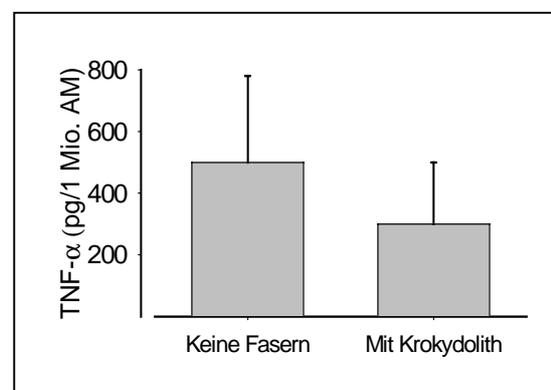
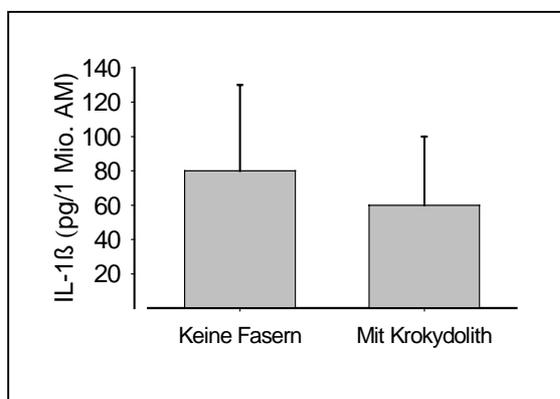
#### 4.6 Einfluß konditionierter Kulturüberstände krokydolithexponierter AM auf die NO-Produktion von A549-Zellen



**Abbildung 9:** Die aus den BAL gewonnenen AM wurden für 24 h mit oder ohne (Medium) Krokydolith (K) 8 µg/cm<sup>2</sup> inkubiert. Die AM wurden ohne (=unstim.) und mit Krokydolith mit und ohne IFN-γ (IFN) exponiert. Die Kulturüberstände wurden dem A549 Zellmedium hinzugefügt. Nach 30 h quantifizierten wir NO in den Kulturmedien der A549-Zellen. Angaben in Mittelwert±Standardabweichung.

Die Sekretionsprodukte der AM vermögen A549-Zellen zur NO-Produktion anzuregen. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß die Krokydolithexposition den Aktivitätsgrad von AM erhöht [3,26,32]. Wir versuchten nun die Frage zu beantworten, ob staubaktivierte AM bronchoepitheliale Zellen zur NO-Produktion anregen können. Dazu wurden AM mit Krokydolith (8 µg/cm<sup>2</sup>) für 24 h exponiert, wiederum der Kulturüberstand A459 Zellen zugegen und die NO-Produktion nach 30 h quantifiziert.

Folgende Kontrollen wurden durchgeführt: nicht-exponierte A549-Zellen, A549-Zellen mit IFN-γ (10 mg/ml) angereichertem AM-Kulturüberstand, nicht-stimulierte AM, TNF-α/IL-1β/IFN-γ-Antikörper und L-NAME. Von jedem Patienten (AM aus der BAL) ergaben sich 4 Versuchsansätze. Der AM-Überstand vermochte, wie schon ausgeführt, die NO-Produktion der A549-Zellen zu stimulieren, aber die zusätzliche Krokydolithexposition der AM führte zu



**Abbildung 8:** Alveolarmakrophagen (AM) produzieren sowohl IL-1β (linke Graphik) als auch TNF-α (rechte Graphik). Die Produktion beider Zytokine war durch eine in vitro Inkubation (24 h) mit Krokydolithasbest nicht zusätzlich steigerbar.

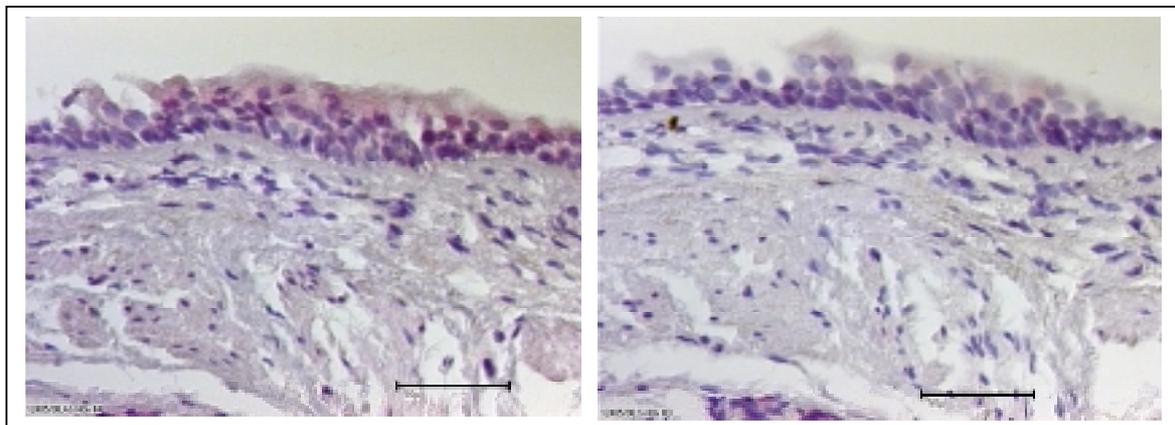
keiner zusätzlichen NO-Steigerung. Auch der Zusatz von  $\text{INF } \gamma$  zu den konditionierten Medien hatte keinen zusätzlichen stimulatorischen Einfluß auf die Erhöhung der NO-Produktion gegenüber den unexponierten Kulturüberständen. Die o.g. Antikörper und L-NAME hatten den gleichen schon in Abb. 7 dargestellten Effekt.

#### **4.7 IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ Produktion kultivierter Alveolarmakrophagen**

Zusätzlich quantifizierten wir in den AM-Überständen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  mittels spezifischer ELISAs. Dabei wurden pro Patient zwei Kulturansätze mit je 1 Mio. AM/ml angelegt. Der erste Ansatz erfolgte ohne Krokydolithzugabe (= unstimuliert), während im zweiten Ansatz die AM auf  $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Krokydolithasbest kultiviert wurden. Die Krokydolithexposition führte nicht zu einer zusätzlichen Zytokinsteigerung der AM. Damit wird die fehlende zusätzliche NO-Stimulation von A549-Zellen in unserem Versuchsansatz durch das Unvermögen von AM erklärbar unter einer Krokydolithexposition vermehrt IL-1 $\beta$  (Abb. 9a) bzw. TNF- $\alpha$  (Abb. 9b) extrazellulär zu sezernieren.

#### **4.8 Nachweis der iNOS mRNA in Bronchialschleimhautbiopsien**

Zur Bestätigung der Induzierbarkeit einer iNOS Expression *in vivo* und zur morphologischen Lokalisation wurde an Bronchialschleimhautbiopsien mittels *in situ* Hybridisierung die iNOS-



**Abbildung 10:** Bronchialschleimhautbiopsie eines Nichtraucher (keine berufliche Staubexposition). Unter Verwendung der iNOS antisense cRNA-Sonde ergibt sich bei diesem Patienten ein negatives Ergebnis (kein iNOS mRNA-Nachweis; linke Graphik). Negativkontrolle mit Hybridisierung unter Verwendung der iNOS sense cRNA Sonde (rechte Graphik).

mRNA intrazellulär nachgewiesen. Bronchoepitheliale Zellen sind *in vivo* prinzipiell in der Lage iNOS mRNA zu bilden [13,16,21]. Die Abbildungen 10 und 11 zeigen exemplarisch die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung an zwei unterschiedlichen Patienten. Wir konnten nachweisen, daß offenbar nicht bei allen Patienten im Bronchialepithel iNOS exprimiert ist. Die in Abb. 10 gewonnene Bronchialschleimhautbiopsie stammte von einem rauchenden nichtberuflich staubexponierten Patienten. Die mit der iNOS antisense cRNA-Sonde durchgeführte *in situ* Hybridisierung zeigt kein Signal, d.h. iNOS mRNA konnte nicht nachgewiesen werden. In Abb. 11 ist exemplarisch die *in situ* Hybridisierung eines nichtrauchenden Kohlemischstaub-exponierten Patienten dargestellt. Es zeigen sich neben anthrakotischen Einlagerungen (linke Graphik) positive iNOS mRNA-Expressionssignale. Da die *in situ* Hybridisierung kein quantitatives sondern lediglich ein qualitatives Verfahren ist, kann hier nur der morphologische Eindruck wiedergegeben, nicht aber eine qualitative Aussage getroffen werden. Northern Blot-Analysen ließen sich aus den kleinen bronchoskopisch gewonnenen Proben wegen der zu geringen Zellausbeute nicht durchführen.

Von den insgesamt 19 evaluierten Patienten (siehe Tab. 2) waren nichtstaubexponierte Nichtraucher und Raucher häufiger negativ (7 von 9), während in den Bronchialschleimhautbiopsien staubexponierter Patienten (Asbest, Kohlemischstäube)

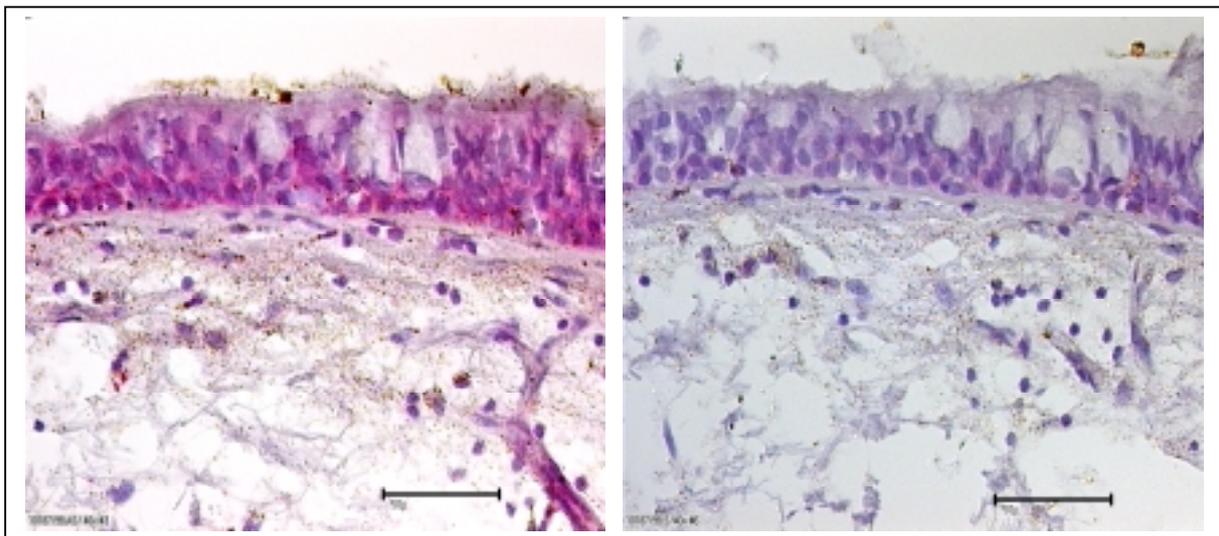


Abbildung 11: Bronchialschleimhautbiopsie eines Kohlemischstaub-exponierten Patienten (Nichtraucher). Die linke Graphik zeigt überwiegend im Bronchialepithel lokalisierte positive iNOS-Hybridisierungssignale (antisense cRNA-Sonde). Die rechte Graphik zeigt die Negativkontrolle (Hybridisierung mit der iNOS sense cRNA Sonde).

unabhängig von ihrem Raucherstatus häufiger (8 von 10) iNOS-positiv waren (Abb. 12). Unterschiede in Abhängigkeit zum Raucherstatus ließen sich nicht erkennen.

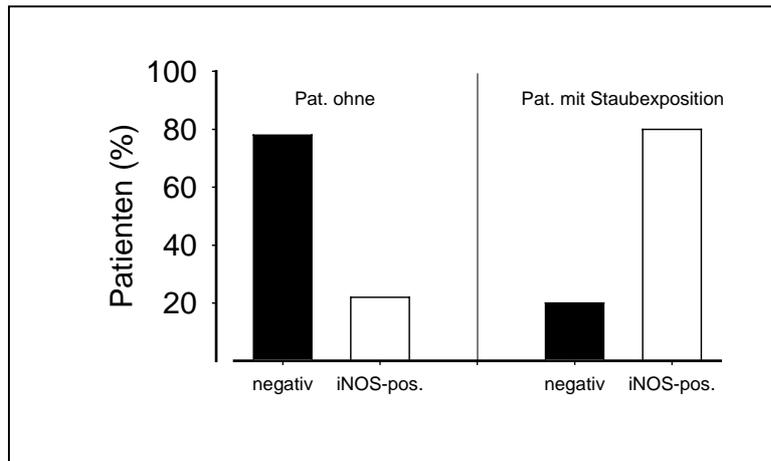


Abbildung 12: Vergleichende Darstellung positiver und negativer Befunde in der *in situ* Hybridisierung von Bronchialschleimhautbiopsien. Staubexponierte Patienten zeigen häufiger iNOS-positive Befunde.

## 5 Diskussion

Bei einer Reihe akuter und chronischer pulmonaler Entzündungsprozesse, wie z.B. beim Asthma bronchiale, Bronchiektasen, dem *adult respiratory distress syndrome* (ARDS) und bei bakteriellen Entzündungen findet sich eine vermehrte Expression der iNOS mit konsekutiver Steigerung der NO-Synthese. Folge hiervon können sowohl schädigende als auch protektive Mechanismen (Steigerung der Immunabwehr) sein [13]. Die prooxidative Wirkung verschiedener Stäube, insbesondere aber von Asbestfasern, ist hinreichend bekannt [12,14,18,20,23]. Ob auch unter einer Staubbelastung Stickoxide vermehrt freigesetzt werden und somit im staubvermittelten Entzündungsgeschehen in der Lunge pathogen wirken, ist dagegen unbekannt. Ziel dieses Forschungsvorhabens war es daher, den Einfluß von verschiedenen Stäuben (Krokydolithasbest, Quarz) auf die iNOS-Regulation in bronchoepithelialen Zellen und deren Regulationsmechanismen zu evaluieren.

Es zeigte sich, daß von den verfügbaren bronchoepithelialen Zelllinien offenbar die SV-40 Transformation zu einer Einschränkung der steigerbaren iNOS-Expression führte, da durch Zytokine (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ ) A549 gut, die BESA 2B Zellen aber nur bei einem hohen Zytokinstimulus NO zu produzieren und sezernieren in der Lage waren. Sowohl die Hemmbarkeit dieses Effektes mit L-NAME als auch die Northern Blot-Analysen beweisen,

daß das NO aus der iNOS katalysierten Reaktion stammt. Hiermit werden Ergebnisse von Dweik et al (1996) bestätigt, die aber bisher nur als Abstract publiziert sind [4].

Die hier vorgestellten Untersuchungen fokussierten sich auf die Regulation der iNOS-Expression, wobei wir die Hypothese belegen konnten, daß erst die Interaktion mit den Sekretionsprodukten der AM in bronchoepithelialen Zellen zu einer iNOS-Induktion führt. Wir fanden also Hinweise für den Regelkreis von AM als Steuerungszelle und der bronchoepithelialen Zellen als Effektorzelle unter Expositionsbedingungen. Die Existenz eines solchen auf die zelluläre NO-Produktion von bronchoepithelialen Zellen bezogenen Regelkreises erschien nach unseren bisherigen Ergebnissen und tierexperimentellen Ergebnissen wahrscheinlich [29].

Für eine Steigerung der iNOS-Expression ist eine differenzierte Stimulation mit verschiedenen Zytokinen nötig, die *in vivo* nur durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen und deren Sekretionsprodukte erreichbar ist [34]. Die Komplexität der iNOS-Stimulation spiegelt sich auf DNA-Ebene in dem komplizierten Aufbau des iNOS-Promotorbereichs wieder. Diese Region enthält mehrere *IFN- $\gamma$  response* Elementbindungsstellen, eine NF kappa B-Bindestelle, eine *A activator site* und Sequenzmotive für die Bindung von *TNF-response* Elementen. Für die Aktivierung dieser Promotorelemente sind besonders zwei Transkriptionsfaktoren (Transkriptionsfaktoren NF kappa B und IRF-1 [Interferon-regulatory factor 1]) bedeutsam, die durch bestimmte Stimuli (Zytokine, aber auch oxidativer Stress) zur vermehrten DNA-Bindung angeregt werden können. Nur eine gleichzeitige Bindung an die verschiedenen Sequenzmotive des jeweiligen Promotors induziert dann letztendlich die Transkription der iNOS mRNA [1,28,29]. Die Exposition der A549-Zellen mit den Stäuben alleine (ohne Zytokinzusatz, unter alleiniger Zugabe von *IFN- $\gamma$* ) erbrachte keine zusätzliche Steigerung der NO-Produktion und der iNOS-Expression, was die Komplexität des iNOS-Stimulationsmodus unterstreicht. Die gewählten Kontrollen belegen a) den regulativen Einfluß der drei Zytokine *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$*  und *IL-1 $\beta$*  (Koinkubation mit den entsprechenden Antikörpern des AM-Überstandes), und b) den Entstehungsmechanismus, wobei iNOS als das für die NO-Produktion maßgebliche Enzym anzusehen ist (Koinkubation mit L-NAME).

Zum Verständnis einer staubinduzierten iNOS-Regulation in bronchoepithelialen Zellen sind daher Zytokin-produzierende Zellen zu berücksichtigen. Aus Arbeiten der letzten fünf Jahre weiß man, daß die von mononukleären Zellen freigesetzten Mediatoren (Zytokine) die iNOS-Expression in bronchoepithelialen Zellen steuern können [29]. Die von humanen mononukleären Zellen selbst freigesetzten Stickoxidgehalten waren dabei durch Zytokine nicht weiter steigerbar, womit wir mit den an humanen AM erhobenen Daten früher an humanen aus dem Blut isolierten Monozyten im Prinzip bestätigen konnten [25,36]. Eine eindeutige Erklärung für dieses, im Vergleich zu mononukleären Zellen von Nagern divergente Ergebnis, gibt es derzeit nicht. Möglicherweise hängt dieses Phänomen jedoch mit dem im Vergleich zu Nagern unterschiedlichen Aufbau der Promotorregion des iNOS-Gens zusammen [5,13,25,36].

Erstaunlich erscheint, daß in unserem ex vivo Ansatz die Staubexposition zu keiner Steigerung der NO-Synthese führt, aber in Bronchialschleimhautbiopsien staubexponierter Patienten gehäuft iNOS nachgewiesen werden kann. Allerdings ist dieser Vergleich aus mehreren Gründen problematisch, da erstens in den ex vivo Evaluationen aus methodischen Gründen eine Quantifizierung der iNOS nicht geführt werden konnte (zu geringe Probenmenge für Northern Blot-Analysen, zu geringe Expositionszeit im Vergleich zur in vivo Situation), zweitens ein Vergleich von der NO-Produktion auf der einen und der iNOS-Expression auf der anderen nicht schlüssig ist, und drittens ein in vitro Befund mit der in vivo Situation nur bedingt vergleichbar ist. Ungeachtet dessen scheint aber eine langjährige Staubexposition unabhängig vom Raucherstatus im Bronchialepithel nicht nur, wie vorher beschrieben, zu einer Induktion antioxidativer Schutzmechanismen sondern auch zu einer iNOS-Induktion zu führen [10,23]. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, daß NO bei der Staubexposition wahrscheinlich keine wesentliche pathophysiologische Rolle im Rahmen der prooxidativen Wirkung von Krokydolith und Quarz zu haben scheint, da in vitro ein entsprechender Effekt selbst unter Berücksichtigung der beiden verschiedenen Zelltypen AM und bronchoepithelialen Zellen nicht evident war.

## 6 Literatur

- 1 Adcock I. M., C. R. Brown, O. Kwon, P. J. Barnes: Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 199 (1994) 1518-1524
- 2 Daniel L. N., Y. Mao, V. Vallyathan, U. Saffiotti: Binding of the cationic dye, Janus Green B, as a measure of the specific surface area of crystalline silica in aqueous suspension. *Toxicol Appl Pharmacol* 123 (1993) 62-67
- 3 Donaldson K., X. Y. Li, S. Dogra, B. G. Miller, G. M. Brown: Asbestos-stimulated tumour necrosis factor release from alveolar macrophages depends on fibre length and opsonization. *J.Pathol.* 168 (1992) 243-248
- 4 Dweik R. A., F. H. Guo, T. F. Kaneko, S. C. Erzurum: Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in human lung epithelial cells. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 153 (1996) A173
- 5 Eissa N. T., A. J. Strauss, C. M. Haggerty, E. K. Choo, S.-C. Chu, J. Moss: Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA. *J.Biol.Chem.* 271 (1996) 27184-27187
- 6 Fahy J. V., E. Fleming, H. H. Wong, J. T. Liu, J. Q. Su, J. Reimann, R. B. Fick Jr., H. A. Boushey: The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 155 (1997) 1828-1834
- 7 Forrester K., S. Ambs, S. E. Lupold, R. B. Kapust, E. A. Spillare, W. C. Weinberg, E. Felley-Bosco, X. W. Wang, D. A. Geller, E. Tzeng, T. R. Billiar, C. C. Harris: Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93 (1996) 2442-2447
- 8 Gillissen A., A. Bartling, K. Rasche: Bronchoalveoläre Lavage. *Klinikarzt* 26 (1997) 50-56

- 9 Gillissen A., G. Höfken, M. Jaworska, D. Wickenburg, G. Schultze-Werninghaus: Regulative Mechanismen intrazellulärer Antioxidantien in Faser- und Staub-exponierten humanen bronchoepithelialen Zellen in vitro, ex vivo und in vivo. In: Horsch F., P. Friebel, A. Seidel, A. Wiebel (Hrsg.): 5. Statuskolloquium des PUG am 5. und 6. März 1996 im Forschungszentrum Karlsruhe. Projekt für Umwelt und Gesundheit (PUG) im Forschungszentrum, Karlsruhe, (1996) 41-60
- 10 Gillissen A., M. Jaworska, D. Wickenburg, J. Marks-Konczalik, I. Schmitz, G. Schultze-Werninghaus: Oxidantienmetabolismus und anti-oxidative Schutzmechanismen in staubbelasteten humanen Lungenzellen. In: Horsch F., P. Friebel, A. Seidel, A. Wiebel (Hrsg.): Projekt für Umwelt und Gesundheit (PUG). 4. Statuskolloquium des PUG am 15. und 16. März 1995 im Forschungszentrum Karlsruhe. Projekt für Umwelt und Gesundheit (PUG) im Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe, Germany, (1995) 219-241
- 11 Gillissen A., M. Jaworska, D. Wickenburg, G. Schultze-Werninghaus: Oxidantienmetabolismus und anti-oxidative Schutzmechanismen in staubbelasteten humanen Lungenzellen. In: Horsch F., P. Friebel, A. Seidel (Hrsg.): Projekt für Umwelt und Gesundheit (PUG). 3. Statuskolloquium des PUG 1994 im Kernforschungszentrum in Karlsruhe. Kernforschungszentrum in Karlsruhe, Karlsruhe, (1994) 217-225
- 12 Gillissen A., M. Jaworska, D. Wickenburg, G. Schultze-Werninghaus: Oxidantienmetabolismus und anti-oxidative Schutzmechanismen in staubbelasteten humanen Lungenzellen. Projekt für Umwelt und Gesundheit im Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe, 1996
- 13 Gillissen A., S. Löseke, S. Hippeli, M. Jaworska: Nitric oxide synthase gene expression in the bronchial epithelium. *Current Pneumology* 1 (1997) 20-30
- 14 Gillissen A., T. Wiethage: Zelluläre Reaktionen auf Mineralfasern. *Pneumologie* 50 (1996) 5-17
- 15 Greenberg S. S., J. Xie, J. Kolls, C. Mason, P. Didier: Rapid induction of mRNA for nitric oxide synthase II in rat alveolar macrophages by intratracheal administration of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 209 (1995) 46-53

- 16 Gutierrez H. H., B. R. Pitt, M. Schwarz, S. C. Watkins, C. Lowenstein, I. Caniggia, P. Chumley, B. A. Freeman: Pulmonary alveolar epithelial inducible NO synthase gene expression: regulation by inflammatory mediators. *Am.J.Physiol.* 268 (1995) L501-L508
- 17 Hippeli S., E. F. Elstner: OH-radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH-radical- and peroxyxynitrite-toxicity. *Z.Naturforsch.* in press (1997)
- 18 Janssen Y. M. W., J. P. Marsh, M. P. Absher, D. Hemenway, P. M. Vacek, K. O. Leslie, P. J. A. Borm, B. T. Mossman: Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. *J.Biol.Chem.* 267 (1992) 10625-10630
- 19 Janssen Y. M. W., B. van Houten, P. J. A. Borm, B. T. Mossman: Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab.Invest.* 69 (1993) 261-274
- 20 Kamp D. W., V. A. Israbian, S. E. Preusen, C. X. Zhang, S. A. Weitzman: Asbestos causes DNA strand breaks in cultured pulmonary epithelial cells: role of iron-catalyzed free radicals. *Am.J.Physiol.* 268 (1995) L471-L480
- 21 Kobzik L., D. S. Bredt, C. J. Lowenstein, J. Drazen, B. Gaston, D. J. Sugarbaker, J. S. Stamler: Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 9 (1993) 371-377
- 22 Lambert N. D., Y. Mao, V. Vallyathan, U. Saffiotti: Binding of the cationic dye, Janus Green B, as a measure of the specific surface area of crystalline silica in aqueous suspension. *Toxicol Appl Pharmacol* 123 (1993) 62-67
- 23 Marks-Konczalik J., A. Gillissen, M. Jaworska, S. Löseke, B. Voss, A. Fisseler-Eckhoff, I. Schmitz, G. Schultze-Werninghaus: Induction of manganese superoxide dismutase gene expression in bronchoepithelial cells after rockwool exposure. *Lung* 176 (1998) 165-180
- 24 Mochhala S., V. J. Chhatwal, S. T. Chan, S. S. Ngoi, Y. W. Chia, A. Ruaff: Nitric oxide synthase activity and expression in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 17 (1996) 1171-1174
- 25 Padgett E. L., S. B. Pruet: Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 186 (1992) 775-781

- 26 Quinlan T. R., J. P. Marsh, Y. M. W. Janssen, P. A. Borm, B. T. Mossman: Oxygen radicals and asbestos-mediated disease. *Environ.Health Perspect.* 102 (1994) 107-110
- 27 Respondek M., Th. Wiethage, K.-M. Müller: Pulmonale Reaktionsmuster auf künstliche Mineralfasern. Projekt für Umwelt und Gesundheit im Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe, 1995
- 28 Robbins R. A., P. J. Barnes, D. R. Springall, J. B. Warren, O. J. Kwon, L. D. Buttery, A. J. Wilson, D. A. Geller, J. M. Polak: Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 203 (1994) 209-218
- 29 Robbins R. A., J. H. Sisson, D. R. Springall, K. J. Nelson, J. A. Taylor, N. A. Mason, J. M. Polak, R. G. Townley: Human lung mononuclear cells induce nitric oxide synthase in murine airway epithelial cells in vitro: role of TNFalpha and IL- 1beta. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 155 (1997) 268-273
- 30 Sambrook J., B. F. Fritsch, T. Maniatis: *Molecular cloning. A laboratoric manual.* Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York, 2. Ausg. 1989
- 31 Southern E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol* 98 (1975) 503-517
- 32 Thomas G., T. Ando, K. Verma, E. Kagan: Asbestos fibers and interferon-gamma up-regulate nitric oxide production in rat alveolar macrophages. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 11 (1994) 707-715
- 33 Timbrell V., R. E. G. Rendall: Preparation of the UICC standard references sample asbestos. *Powder Technology* 5 (1971) 279-287
- 34 Watkins D. N., D. J. Peroni, K. A. Basclain, M. J. Garlepp, P. J. Thompson: Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 16 (1997) 629-639
- 35 Weller W. *Anthrako-Silikose.* Griebisch Druck GmbH, Hamm/Germany, 1977

36 Zembala M., M. Siedlar, J. Marcinkiewicz, J. Pryjma: Human monocytes are stimulated for nitric oxide release in vitro by some tumor cells but not by cytokines and lipopolysaccharide. *Eur.J.Immunol.* 24 (1994) 435-439