

Differentielle Regulation der Chemokin- synthese in Alveolarepithelzellen durch Stickstoff- und Sauerstoffradikale

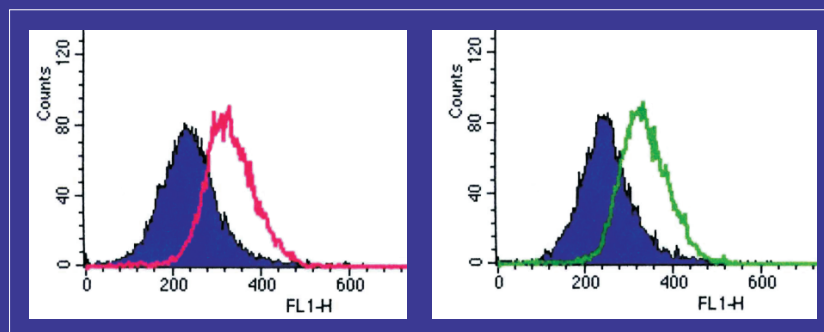
INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Friederike Christiane Bayer

aus Gießen

Gießen 2003



WVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

ISBN 3-89687-672-4

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

**Differentielle Regulation der Chemokinsynthese
in Alveolarepithelzellen durch Stickstoff- und
Sauerstoffradikale**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Friederike Christiane Bayer
aus Gießen

Gießen 2003

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der
Medizinischen Klinik II und Poliklinik
des Universitätsklinikums Gießen
Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Gutachter: Prof. Dr. E. Beck

Tag der Disputation: 26.04.2004

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	2
Einleitung	4
Fragestellung	8
Methoden	9
A549 Zellkultur	9
Isolation humaner Alveolarepithelzellen (HAEpC)	9
HAEpC Zellkultur	10
Herstellung argininfreien Mediums	11
In vitro Stimulationsversuche	11
Eingesetzte Substanzen	11
IL-8 und MCP-1 ELISA	12
Ribonuklease Protection Assay (RPA)	13
mRNA Isolierung	14
Arbeitsschritte des IL-8- und MCP-1-RPA	15
Durchflusszytometrische Analyse von ONOO ⁻	16
Statistik	16
Ergebnisse	17
Differentielle Regulation der Chemokinsynthese in A549 Zellen	17
Einfluss des NO-Donators SNAP auf die zytokininduzierte Chemokinsynthese	17
Zeitreihen	22
Einfluss von endogen produziertem NO auf die zytokin- induzierte Chemokinsynthese	26
Einfluss der Radikale NO, O ₂ ⁻ und ONOO ⁻ auf die zytokininduzierte Chemokinsynthese	28
Einfluss der Radikale NO, O ₂ ⁻ und ONOO ⁻ auf die spontane Chemokinsynthese	36
Differentielle Regulation der Chemokinsynthese in HAEpC	41
Diskussion	45
Zusammenfassung	52
Anhang	54
Literaturverzeichnis	58
Danksagung	64
Lebenslauf	65

ABKÜRZUNGEN

ABTS	2,2'-Azino-di-3-Äthyl-benzthiatolin-Sulfonsäure-6-diammoniumsalz
AP-1	Aktivierungs Protein-1
Avidin-HRP	Avidin-horse-radish-peroxidase
Bromo-cGMP	8-Bromo-Cyclo-Guanylatmonophosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DMNQ	2,3-Dimethoxy-1,4-naphtoquinone
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPI	Diphenyleneidonium Chloride
Ebselen	2-Phenyl-1,2-Benzisoselenazol-3(2H)-one
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FL	Fluoreszenz
GACU pool	Guanin-Adenin-Cytosin-Uracil-Mischung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAEpC	Human alveolar epithelial cells
HSA	Humanes Serumalbumin
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-8	Interleukin-8
kDa	Kilodalton
LNMA	N ^G -Monometyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
min	Minuten
ml	Milliliter

Abkürzungen

mRNA	messenger-RNA
n	Anzahl der Versuche
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidhydrogenphosphat
NF- κ B	nukleärer Faktor- κ B
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O ₂ ⁻	Superoxid
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
PAMPS	Pathogen assoziierte Mustermoleküle
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pg	Pikogramm
PTIO	2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
rIL-8	Rekombinantes Interleukin-8
rMCP-1	Rekombinantes Monocyte chemoattractant protein-1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	Ribonuklease Protection Assay
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SEM	Standard error of the mean
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamine
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRIS	Tris-Hydroxymethylethylendiamin
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
u	Units
UpM	Umdrehungen per Minute
W	Watt

EINLEITUNG

Die Rekrutierung von Leukozyten aus der pulmonalen Mikrozirkulation in das Lungenparenchym und den Alveolarraum ist eine Schlüsselreaktion in der Pathogenese entzündlicher Lungenerkrankungen. Der Einstrom distinkter Leukozytenpopulationen in das alveoläre Kompartiment wird durch die lokale Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Chemokine organisiert. Alveolarepithelzellen nehmen aufgrund ihrer Lokalisation zwischen alveolärem Luftraum und Gefäßkompartiment eine zentrale Position für die Regulation entzündlicher Prozesse in der Lunge ein. Sie sind in der Lage nach Stimulation durch die in der initialen Entzündungsphase alveolär freigesetzten proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α Chemokine wie Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) und "Monocyte chemoattractant protein-1" (MCP-1/CCL2) zu synthetisieren und zu sezernieren. Hierdurch werden Muster und Kinetik der Rekrutierung verschiedenener Leukozytenpopulationen aus dem Gefäßbett in den Alveolarraum determiniert.

Die chemotaktischen Polypeptide IL-8 und MCP-1 gehören zur Chemokin Supergen-Familie. Sie werden nach der Anordnung ihrer Zysteinreste zwei unterschiedlichen Subgruppen zugeordnet. IL-8 gehört zur Gruppe der CXC-Chemokine, MCP-1 zur Gruppe der CC-Chemokine. Obwohl IL-8 und MCP-1 in ihrer Aminosäuresequenz zu 21% übereinstimmen, wirken sie auf verschiedene Zellpopulationen chemotaktisch (1). IL-8 spielt nach derzeitigen Vorstellungen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Entzündungsreaktionen, die durch neutrophile Granulozyten dominiert werden. MCP-1 ist dagegen das zentrale Zytokin für die inflammatorische Rekrutierung von Monozyten aus der Gefäßbahn ins Gewebe (1-9). IL-8 und MCP-1 werden als Antwort auf mikrobielle Stimuli wie bakterielle Lipopolysaccharide (Endotoxin) oder proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α) zellulär exprimiert (1, 3). Beide Chemokine können von einer Vielzahl von Zellen produziert werden, wie zum Beispiel Epithelzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten (1-4, 7-10).

Die Beteiligung von Chemokinen an der Pathogenese entzündlicher Lungenerkrankungen ist inzwischen nachgewiesen. So konnten z.B. in unabhängigen Studien sowohl hohe IL-8- als auch hohe MCP-1-Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit von ARDS Patienten nachgewiesen werden (11-14). Demgegenüber sind die molekularen Mechanismen, welche die Genexpression und Liberierung dieser chemotaktischen Faktoren im Gewebekompartiment regulieren, noch nicht im Detail charakterisiert.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α sind integrale Komponenten der Zytokinkaskade, die als Wirtsantwort regelhaft durch sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Mustermoleküle ("Pathogen associated molecular patterns", PAMPs) wie z.B. Endotoxin ausgelöst wird. Sie spielen als "early mediators" eine wichtige Rolle für die lokale Initiation von Entzündungsprozessen. IL-1 β und TNF α werden in der Lunge vor allem durch Alveolarmakrophagen, die als sessile Phagozyten präferentiell mit sogenannten "Pattern-Recognition Rezeptoren" (Toll-like Rezeptoren, CD14) zur Erkennung von PAMPs ausgestattet sind, gebildet und induzieren ihrerseits die Synthese von IL-8 und MCP-1 in Alveolarepithelzellen (6, 7, 15, 16).

Darüberhinaus besitzen diese beiden proinflammatorischen Prototyp-Zytokine die Fähigkeit, in den von ihnen erreichten Zielzellen die Bildung von Radikalen zu verstärken (17-21). So sind auch pulmonale Epithelzellen in der Lage unter inflammatorischen Bedingungen NO und andere Radikale zu produzieren (22-24). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen der oxidativen Stressantwort gebildeten Stickstoff- und Sauerstoffradikale die Chemokinsynthese differentiell beeinflussen können (25, 26). So wurde in Endothel- bzw. Melanomzellen ein stimulierender Effekt von Stickstoffmonoxid (NO) auf die IL-8 Synthese und ein hemmender Effekt auf die MCP-1 Synthese nachgewiesen (10, 27, 28). Demgegenüber gab es bislang keine systematischen Untersuchungen über den Einfluss von NO auf die Chemokinsynthese in Alveolarepithelzellen. Auch der Einfluss von

Sauerstoffradikalen auf die Regulation der IL-8 und MCP-1 Synthese im Alveolarepithel war nicht untersucht.

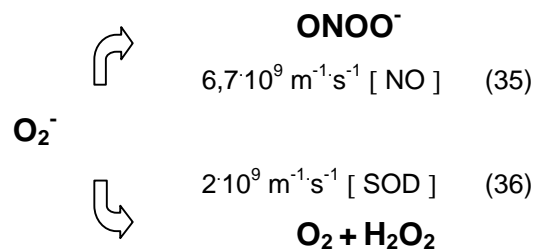
Das Stickstoffradikal NO ist langlebiger und weniger toxisch als lange Zeit angenommen (14, 15). Seine Eigenschaften schnell und isotrop durch Gewebe zu diffundieren, machen es zu einem idealen interzellulären Botenstoff. Da die Geschwindigkeiten der meisten NO-Reaktionen bekannt sind, weiß man, dass in vivo drei Reaktionen dominieren (29):

1. Die Aktivierung der Guanylatzyklase (cGMP-Bildung) - verantwortlich für die Signaltransduktion
2. Die Inaktivierung durch Reaktion mit Oxyhämoglobin
3. Die Oxidation zu Peroxynitrit (ONOO^-) durch Reaktion mit O_2^-

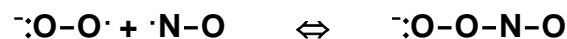
NO wird durch NO-Synthasen (NOS) gebildet, welche die Oxidation von L-Arginin zu Zitrullin katalysieren. NOS ist ein Enzym, das in vielen Geweben exprimiert wird. Dabei unterscheidet man konstitutive (cNOS) und induzierbare (iNOS) Formen (22, 30). Die cNOS führt zu einer niedrigen basalen NO-Produktion, wohingegen die iNOS große Mengen NO als Antwort auf inflammatorische Stimuli, wie zum Beispiel IL-1 β und TNF α produzieren kann. Alveolarepithelzellen exprimieren beide NOS-Formen (23, 24, 31).

Im aeroben Stoffwechsel werden beachtliche Mengen Superoxid (O_2^-) generiert. Man nimmt an, dass 1-5% des Sauerstoffverbrauchs zu O_2^- reduziert wird (32). Dennoch wird die O_2^- -Konzentration im Gewebe durch den raschen Abbau via Superoxid-Dismutase (SOD) gering gehalten (29). Es gibt verschiedene intrazelluläre Enzymsysteme, durch deren Reaktionen O_2^- -Radikale entstehen können. Dazu gehören die Flavoproteine NADPH- und NADH-Oxidase, Xanthin Oxidase, Cyclooxygenase und mitochondriale Enzyme der Atmungskette. Ihr jeweiliger Anteil an der intrazellulären O_2^- -Bildung ist nicht genau bekannt (33, 34).

NO ist das einzige Molekül im Organismus, das in so hohen Konzentrationen produziert wird und dessen Affinität zu O_2^- so groß ist, dass es in der Lage ist, mit der SOD um O_2^- zu konkurrieren. Eine kritische Grenze ist erreicht, wenn die NO-Konzentration der von SOD entspricht:



Man nimmt an, dass der Hauptmechanismus für die Toxizität von NO, die diffusionslimitierte Reaktion mit Superoxid (O_2^-) zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) ist (29):



Die Reaktion verläuft schnell und unter Freisetzung von Energie (22 kcal/mol) ab. Die große Gibbs Energie, die thermodynamisch der Hydrolyse von 3 ATP Molekülen entspricht, macht die Reaktion praktisch irreversibel. $ONOO^-$ ist ein binäres Molekül, das hauptsächlich entsteht, wenn Zellen gleichzeitig große Mengen an NO und O_2^- produzieren. Es ist ein potentes Oxidans, das mit einer Vielzahl von biologischen Molekülen reagieren kann. $ONOO^-$ zeichnet sich durch seine Stabilität aus und reagiert relativ langsam mit den meisten biologischen Molekülen. Durch Oxidation und Nitrosylierung von z.B. Tyrosinresten greift es in die Funktion von Proteinen ein (37, 38, 39). Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Nitrosylierung auch eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen in der Lunge spielt. Man hat Nitrotyrosinreste in Epithel- und Endothelzellen bei Patienten mit inflammatorischen Lungenenerkrankungen und ARDS gefunden (40, 41). Der Einfluss, der bei Entzündungsreaktionen in Zellen des Alveolarraums gebildeten Radikale auf die Chemokinsynthese ist von besonderem Interesse auch vor dem Hintergrund der therapeutischen NO-Applikation in Verbindung mit hohen Sauerstoffgaben beim akuten Lungenversagen.

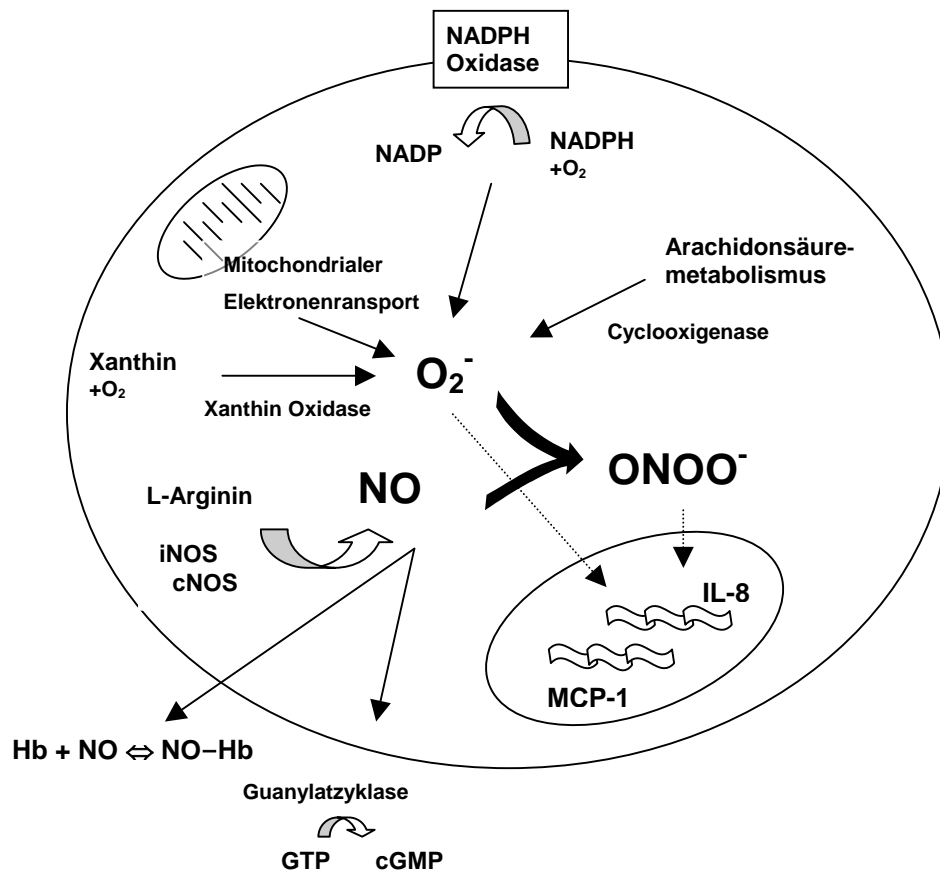


Abbildung 1. Schematische Darstellung einer Lungenalveolarepithelzelle
Potentielle Wege der Radikal-Entstehung und ihrer Reaktionen untereinander

FRAGESTELLUNG

Vor dem oben skizzierten Hintergrund wurden in der vorgelegten Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

Beeinflusst endogen produziertes oder exogen zugeführtes NO die spontane oder $IL-1\beta/TNF\alpha$ -induzierte Synthese der Chemokine $IL-8$ und $MCP-1$ in Alveolarepithelzellen?

Welchen Einfluss haben weitere Sauerstoffradikale wie O_2^- sowie die Down-Stream Reaktionsprodukte von Stickstoff- und Sauerstoffradikalen wie $ONOO^-$ auf die spontane und die durch die proinflammatorischen Zytokine $IL-1\beta$ und $TNF\alpha$ induzierte Synthese der Chemokine $IL-8$ und $MCP-1$ in Alveolarepithelzellen?

METHODEN

A549 Zellkultur

A549 Epithelzellen (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), eine Adenokarzinomzelllinie mit den Eigenschaften von humanen Typ II Lungenalveolarepithelzellen (42) wurden in HAMS F12-Nährmedium (mit 10% Fötalem Kälber Serum (FCS), 4mM L-Glutamin und einer 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Lösung) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Sie wurden zwei mal wöchentlich durch Trypsinisierung passagiert. Für die ELISA-Experimente wurden 2x10⁴ Zellen/well auf 24-well-Kulturplatten ausgesät und in HAMS F12-Nährmedium kultiviert. Für die RPA-Experimente wurden 1x10⁵ Zellen/well auf 6-well-Kulturplatten ausgesät und in HAMS F12-Nährmedium kultiviert.

Isolation Humaner Alveolarepithelzellen (HAEpC)

Um eventuelle Unterschiede von A549 Epithelzellen gegenüber humanen Alveolarepithelzellen zu untersuchen, wurden für einige exemplarische Versuche humane Alveolarepithelzellen (HAEpC) Typ II isoliert.

Humane Typ II Alveolar-Epithelzellen (HAEpC/Human Alveolar Epithelial cells) wurden, wie zuvor beschrieben, mit einigen Modifikationen isoliert (42-46). Von einem Lobektomiepräparat (Institut für Pathologie und Klinik für Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen, genehmigt von der lokalen Ethik-Kommission der JLU Gießen) wurde tumorfreies und möglichst tumorfernes Lungengewebe entnommen. Das Gewebe wurde in einer HEPES-gepufferten Salzlösung zerkleinert und unter dem Zusatz von Dispase II (2,5mg/ml) in der Anwesenheit von 2mM Calcium und 1,3mM Magnesium für ca. 90 Minuten bei 37°C im Rüttelwasserbad verdaut.

Die digestierte Gewebsmasse wurde nachfolgend sequentiell über mehrere Netze mit 100µm-, 60µm- und 20µm-Porengröße filtriert und das Filtrat auf einem Ficoll Dichtegradienten (2500UpM, 15 Minuten bei RT) zentrifugiert.

Die großzügig abgenommene Interphase wurde nach drei Waschschrritten pelletiert. Nach Einstellung der Zellzahl auf $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml wurden $3 \cdot 10^7$ Zellen mit 300 μ l anti-CD45 magnetischen Beads für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zell-Bead-Suspension wurde für weitere 20 Minuten bei 4°C in einen Magneten eingespannt, um magnetisch markierte Leukozyten von HAEp-Zellen Typ II zu trennen. Die im Überstand befindlichen CD45-negativen Alveolarepithelzellen wurden dekantiert und pelletiert. Die so gewonnene Zellpopulation enthielt 82-90% Epithelzellen (durchflusszytometrische Reinheitskontrolle auf Expression des epithelspezifischen Antigen HEA-125) sowie 5-12% Alveolarmakrophagen und Lymphozyten (Durchflusszytometrische Erfassung über Streulichtparameter und Expression von CD45). Durch immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis der alkalischen Phosphatase, deren zytoplasmatische Expression in der Lunge spezifisch ist für Typ II Zellen (47, 48), ließ sich in Zytospin-Ausstrichen zeigen, dass 95-99% der isolierten Epithelzellpopulation einen Epithelzell Typ II Phänotyp besaßen.

HAEpC Zellkultur

Für die Versuche zur Chemokinbestimmung wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen/well auf 24 well-Platten ausgesät. Für die Experimente zur mRNA Bestimmung wurden $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/well auf 6 well-Platten ausgesät. Die Kulturplatten wurden vorher mit Kollagen Typ IV überschichtet, um die Adhärenz der Epithelzellen zu verbessern. Die humanen Epithelzellen wurden in HAMS F12 Medium (mit 10% FCS und einer 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin-B-Lösung) ohne Valin kultiviert, um Fibroblastenwachstum zu vermeiden. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Nach ca. 9 Tagen waren die Zellen konfluent und die Zellen wurden für weitere 2 Tage in Valin-haltigem Medium kultiviert.

Herstellung argininfreien Mediums

Die Aminosäure Arginin ist das Substrat für die NO Synthase (NOS). Um das Nährmedium als Quelle für die NO Synthase auszuschalten, wurde für die Experimente argininfreies Medium verwendet. Die Herstellung erfolgte mit RPMI 1640 Medium ohne Arginin, Cystin, Leucin, Methionin, Inositol, Glucose und Glutamin. Bis auf Arginin wurden alle Aminosäuren supplementiert und außerdem 10% FCS, 1% Glucose und eine 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin-B-Lösung zugesetzt.

In vitro Stimulationsversuche

Die konfluent gewordenen A549 Epithelzellen bzw. humanen Alveolarepithelzellen wurden mit verschiedenen Zytokinen, Radikaldonatoren und -inhibitoren stimuliert. Für die Experimente wurde das Nährmedium durch argininfreies Medium (s.o.) ersetzt. Das Endvolumen betrug jeweils 1ml/well. Die Zellkulturüberstände wurden nach einer Inkubationszeit von 20h abgenommen und die Chemokinkonzentrationen mittels ELISA bestimmt. Außerdem wurde mRNA aus den Zellen gewonnen und mittels RPA die IL-8 und MCP-1 Synthese quantifiziert. Bis zur Messung wurden die Überstände bei -20°C in Eppendorf Röhrchen (1,5 ml) eingefroren.

Eingesetzte Substanzen

Neben den Zytokinen IL-1 β und TNF α wurden folgende Radikaldonatoren und -inhibitoren eingesetzt:

NO-Donator:

SNAP (S-Nitroso-N-acetylpenicillamine) ist ein zellpermeabler NO-Donator

NO-Inhibitoren:

LNMMMA (N^G-Monomethyl-L-Arginin) ist als L-Arginin-Analogon ein kompetitiver Hemmer aller Isoformen der NO-Synthase und hemmt somit die endogene NO-Produktion.

PTIO (2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) ist ein stabiler NO-Scavenger, der freies NO inhibiert ohne Einfluß auf die NO-Synthasen.

O₂⁻-Donatoren:

DMNQ (2,3-Dimethoxy-1,4-naphtoquinone) ist ein zellpermeabler O₂⁻-Donator.

Xanthin/ Xanthin Oxidase, Xanthin Oxidase, ein Metalloflavoprotein, ist eine wichtige Quelle für freie Sauerstoffradikale. Das Enzym katalysiert die Reduktion von Sauerstoff (O₂) und führt zur Bildung von O₂⁻ und H₂O₂. Xanthin, das Substrat des Enzyms, ist ein Zwischenprodukt des Purinstoffwechsels.

O₂⁻-Inhibitor:

DPI (Diphenyleneidonium Chloride) ist ein Hemmstoff der mitochondrialen NADPH-Ubiquinon-Oxidoreduktase und hemmt somit eine wichtige O₂⁻-Quelle im Zellstoffwechsel.

ONOO⁻-Donator:

ONOO⁻, das Reaktionsprodukt aus NO und O₂⁻ ist ein zellpermeables Oxidans, das aus Isoamyl-Nitrit und H₂O₂ synthetisiert wurde (Herstellerangaben von Alexis).

ONOO⁻-Inhibitor:

Ebselen (1,2-Benzisoselenazol-3(2H)-one) ist ein ONOO⁻-Scavenger

IL-8 und MCP-1 ELISA

Die Chemokinkonzentrationen der Zellkulturüberstände wurden mit spezifischen kommerziell erhältlichen IL-8 und MCP-1 ELISAs bestimmt.

Die 96-well-ELISA Platten (Nunc Immunoplate Maxisorb) wurden über Nacht mit einem monoklonalen anti-humanen IL-8 bzw. MCP-1 Antikörper inkubiert, damit die Antikörper an das Plastik adsorbieren. Nachdem die Platten 3 mal mit PBS Tween (0.05% Tween, Sigma) gewaschen wurden, folgte eine Blockade mit 1% BSA und 5% Saccharose in PBS (200µl/well), um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach 1h Inkubation wurden die Platten erneut in drei Gängen gewaschen und die Proben aufgetragen. Mit rekombinantem humanem IL-8 bzw. MCP wurde eine Standardkurve

hergestellt. Die Standardkonzentrationen und die Proben wurden für 2h inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde als sekundärer Antikörper in jedes well ein biotinylierter anti-humaner IL-8 bzw. MCP-1 Antikörper gegeben und die Platten für 2 Stunden inkubiert. Die Platten wurden gewaschen und zur Farbentwicklung Avidin-horse-radish-peroxidase (100 μ l/well) hinzu gegeben. Nach 30 min Inkubation wurden die Platten gewaschen und die ABTS-Substratlösung hinzugegeben (200 μ l/well). ABTS wurde in Substratpuffer gelöst und mit 0.03% H₂O₂ aktiviert. Die Farbreaktion wurde durch Absorption bei 450nm photometrisch im ELISA-Reader gemessen.

Ribonuclease Protection Assay - RPA

Der Ribonuklease Protection Assay ist eine hoch sensitive und spezifische Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von spezifischer mRNA. Das Verfahren wurde durch die Entdeckung und Charakterisierung von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der Bakteriophagen SP6, T7 und T3 und der dazugehörigen Promoterregionen ermöglicht. Diese Polymerasen sind ideal für die Synthese von RNA-Sonden entsprechender DNA-Schablonen. Sie polymerisieren RNA in einer hohen Geschwindigkeit, transkribieren zuverlässig lange Sequenzen und sind spezifisch für die dazugehörigen Promotoren. cDNA-Fragmente von Interesse, z.B. hier die für IL-8 und MCP-1 kodierenden Regionen, können in ein Plasmid subkloniert werden, das Bakteriophagen-Promotoren enthält. Dieses Konstrukt kann dann als Schablone für die Synthese von radioaktiv markierten anti-sense-RNA-Sonden benutzt werden. Diese Sonde ist in der Lage, die aus den Zellen isolierte RNA spezifisch zu binden (Hybridisierung). Die nicht gebundene und freie Einzelstrang-RNA wird dann von RNAsen verdaut. Die verbleibende RNase-protected Doppelstrang-RNA wird gereinigt, auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Phosphorimaging quantifiziert.

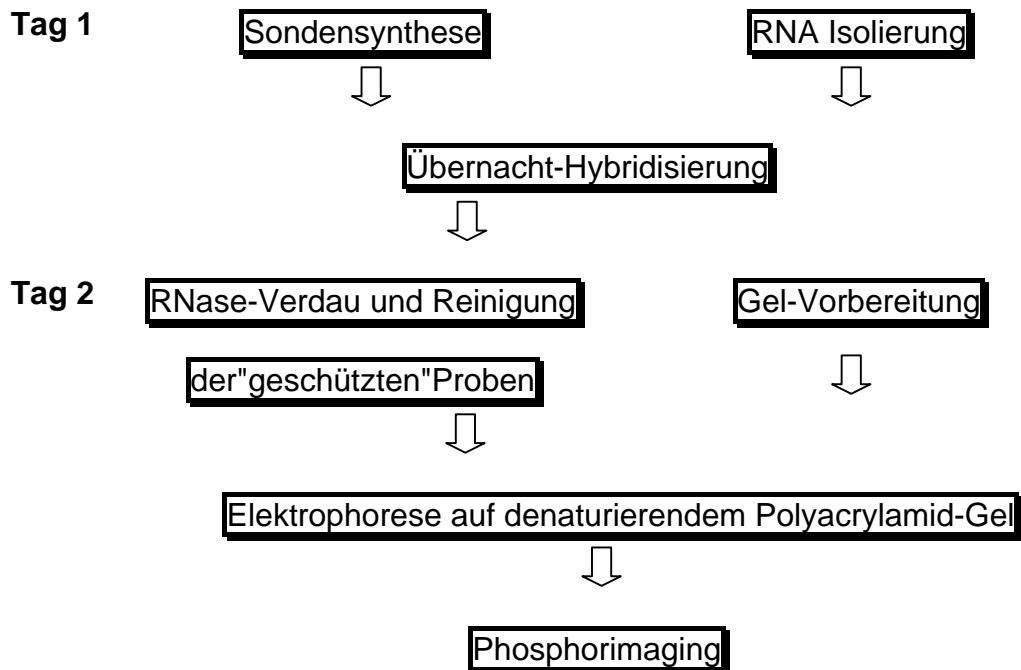
mRNA Isolierung

Für die Experimente zur mRNA Bestimmung wurden A549 Zellen auf 6-well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden wie in den Experimenten für die Chemokinbestimmung mittels ELISA stimuliert. Die Inkubationszeit betrug 4h.

Die mRNA aus den Epithelzellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit[®] von QIAGEN gewonnen. Die Proben wurden zuerst lysiert und homogenisiert. Zur Lyse wurde ein denaturierender Guanidinium und Isothiozyanat enthaltender Puffer (RLT-Puffer) verwendet, der zur sofortigen Inaktivierung von RNAsen führt und so die Isolierung intakter RNA gewährleistet. Dann wurde die Zellsuspension auf die RNeasy "shredder column" gegeben und zur Homogenisierung zentrifugiert. Dabei wurde die Suspension von hochmolekularen DNA-Strukturen und Zellkomponenten gereinigt.

Die Proben wurden nach Zusatz von 70% Äthanol auf eine RNeasy "Spin-Column" gegeben, wo die mRNA nach Zentrifugation an die Silikongel-Membran bindet und mehrere Waschgänge (mit RPE-Puffer) Verunreinigungen entfernten. Die mRNA wurde dann durch Zentrifugation mit RNase freiem Wasser aus der Silikongel-Membran gewaschen und in einem 1.5 ml Eppendorfröhrchen aufgefangen. Reinheit und Konzentration der mRNA wurde durch photometrische Messung bestimmt. Mit dem 2.5fachen Volumen 100% Äthanol bei -80°C für 1h wurde die mRNA gefällt. Nach Zentrifugation und Resuspension in Wasser wurden die mRNA Proben bis zur Quantifizierung im RPA bei -80°C eingefroren.

Arbeitsschritte des IL-8- und MCP-1-RPA



Für die Quantifizierung der aus den Epithelzellen gewonnenen mRNA wurde der RiboQuant® Multi Probe Rnase Protection Assay von PharMingen verwendet.

Mit einem Multi Probe Template Set für IL-8 und MCP-1 wurden ³²P markierte Sonden synthetisiert. Dies geschah in Gegenwart eines GACU Pools und einer T7 RNA Polymerase. Die Sonde wurde über Nacht mit 2-3µg der aus den Epithelzellen gewonnenen mRNA hybridisiert. Danach erfolgte die Zugabe von RNase und Proteinkinase K, um nichthybridisierte RNA zu verdauen. Die hybridisierte RNA wurde mit Chloroform extrahiert und in der Gegenwart von Ammonium Acetat durch Ethanol präzipitiert.

Dann wurden die Proben auf ein Acrylamid-Harnstoffgel geladen. Nach Elektrophorese bei 13W für etwa 60 Minuten wurde das Gel auf ein Filterpapier adsorbiert, unter Vakuum getrennt und bei -70°C gegenüber einem Film exponiert und außerdem mit einer Verstärkerfolie belegt. Die Auswertung erfolgte mittels Phosphorimaging.

Um die einzelnen Proben untereinander vergleichen zu können, wurden in jedem Template sogenannte "housekeeping" Gene (GAPDH und L32)

mitgeführt. Für jede Probe wurde aus dem Wert für den IL-8- oder MCP-1-mRNA Gehalt und dem Wert für den GAPDH mRNA Gehalt ein Quotient gebildet. Diese Quotienten erlauben dann den Vergleich zwischen den einzelnen Proben.

Durchflusszytometrische Analyse von ONOO⁻

Die Durchflusszytometrie erlaubt neben der Messung zellulärer Streulichtcharakteristika zur Zelldifferenzierung nach Markierung mit geeigneten Fluorochromen eine qualitative und quantitative Analyse der Fluoreszenzlichtemission zur Analyse physikalischer, biochemischer und immunologischer Eigenschaften von Zellen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit einem FACScan der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Die Messdaten wurden mit dem FACScan-Datenverarbeitungsprogramm analysiert und mit Hilfe der Cell Quest Research Software grafisch dargestellt.

Um intrazellulär das Radikal ONOO⁻ darzustellen, wurden A549 Epithelzellen wie oben beschrieben kultiviert und stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 4h wurden die Überstände abgenommen und mit Dihydrorhodamine (DHR) versetzt. Das Fluorochrom Dihydrorhodamin (DHR) wird spezifisch durch ONOO⁻ oxidiert. Dies lässt sich im Durchflusszytometer über die Fluoreszenzcharakteristika messen.

Statistik

Die Daten werden als Mittelwert +/- SEM von n unabhängigen Versuchen angegeben. Unterschiede zwischen Messergebnissen wurden mit Hilfe geeigneter parametrischer Testverfahren bestimmt (one-way ANOVA, Analysis of Variance, Tukey Test und ANOVA on Ranks, Dunns method). Dabei wurden P-Werte <0.05 (*) bzw. <0.001 (**) als statistisch signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SIGMAstat[®] für MS Windows[®].

ERGEBNISSE

Differentielle Regulation der Chemokinsynthese durch NO in A549 Epithelzellen

Einfluss des NO-Donators SNAP auf die zytokininduzierte Chemokinsynthese

A549 Epithelzellen wurden mit IL-1 β (0.1 ng/ml) in Gegenwart abgestufter Konzentrationen des NO-Donators S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) stimuliert. Nach 20h Inkubationszeit wurden die IL-8- und MCP-1-Proteinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen. Die folgenden Angaben sind Mittelwerte aus 8 unabhängigen Versuchen.

Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (0.1 ng/ml) führte zu einer Erhöhung der IL-8-Proteinkonzentration auf 30255 (+/-3755) pg/ml gegenüber Basalwerten von 410 (+/-31) pg/ml. Die Zugabe des NO-Donators SNAP führte zu einer weiteren dosisabhängigen Steigerung der IL-1 β -induzierten IL-8-Sekretion. Die höchste eingesetzte Dosis SNAP (2mM) bewirkte eine Erhöhung um 50% auf 67702 (+/-6551) pg/ml (Abbildung 2).

Die im gleichen Kulturüberstand gemessenen MCP-1-Proteinkonzentrationen der Zellkulturüberstände sind in Abbildung 3 dargestellt. Stimulation mit IL-1 β induzierte eine Erhöhung der MCP-1-Konzentration auf 8792 (+/-370) pg/ml gegenüber Basalwerten von 252 (+/-62) pg/ml. Zugabe von SNAP in steigenden Konzentrationen (0.125-2mM) führte zur einer dosisabhängigen Hemmung der IL-1 β induzierten MCP-1 Synthese. Die höchste eingesetzte SNAP-Dosis (2mM) reduzierte die MCP-1-Konzentration im Zellüberstand um 43% auf 3840 (+/-686) pg/ml.

Ergebnisse

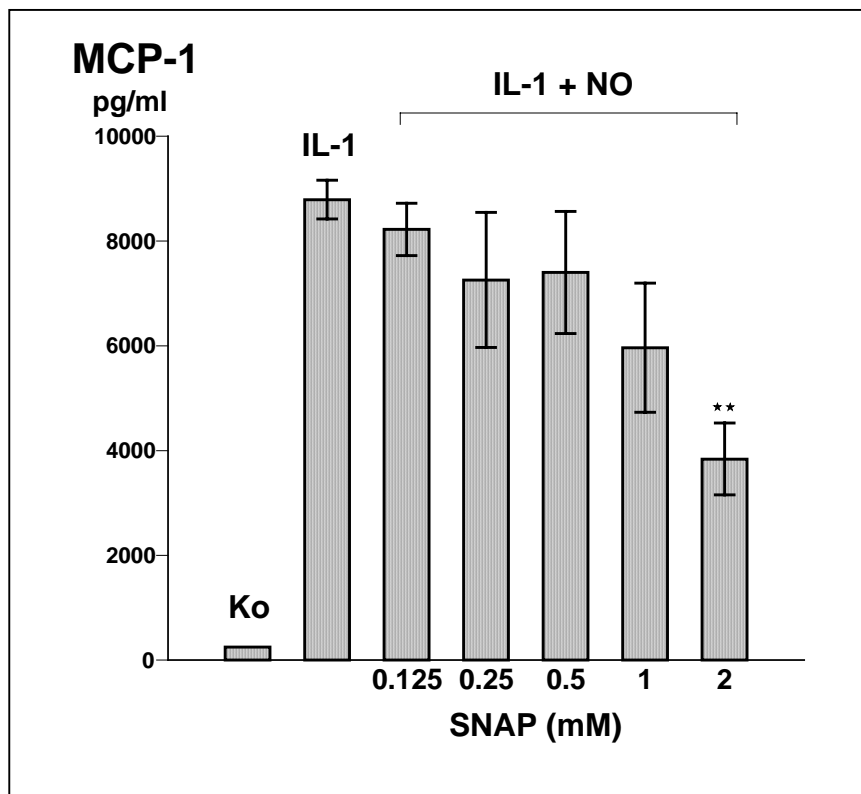
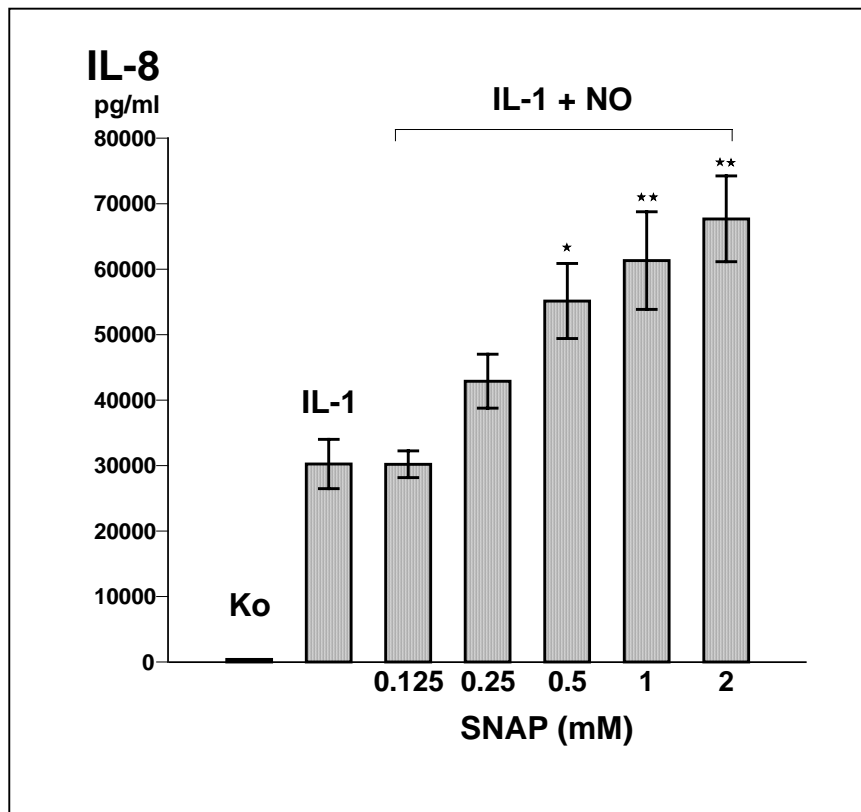


Abbildung 2 und 3 IL-8- bzw. MCP-1-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von A549-Zellen ohne Stimulation (Ko) und nach Stimulation mit IL-1 β (0.1 ng/ml) sowie Zugabe von SNAP in steigenden Konzentrationen (0.125-2 mM), n=8, **P<0.001 gegenüber Stimulation mit IL-1 β .

Ergebnisse

Um zu differenzieren, ob SNAP die Chemokinproduktion auf Ebene der Transkription oder der Translation beeinflusst, wurden A549 Epithelzellen wie oben beschrieben stimuliert, die Zellen nach 4h Inkubation zur mRNA-Gewinnung geerntet und die Chemokin-mRNA mittels Ribonuklease Protection Assay (RPA) quantifiziert.

Die Zugabe des NO-Donators SNAP (0.125-2 mM) zu der IL-1 β stimulierten Kultur führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung der IL-8-mRNA Synthese. Die Steigerung der IL-8-mRNA-Konzentration betrug mit der höchsten verwendeten Dosis SNAP das 2.24-fache gegenüber Stimulation mit IL-1 β allein (Abbildung 4).

Weiterhin wurde die MCP-1-mRNA im RPA quantitativ bestimmt. Die Zugabe von SNAP (0.125-2mM) zu der IL-1 β stimulierten Kultur führte zu einer dosisabhängigen Verminderung der MCP-1-mRNA. Bei zusätzlicher Gabe von 2mM SNAP war die MCP-1-mRNA-Konzentration gegenüber der Stimulation mit IL-1 β allein um den Faktor 0.33 vermindert (Abbildung 5).

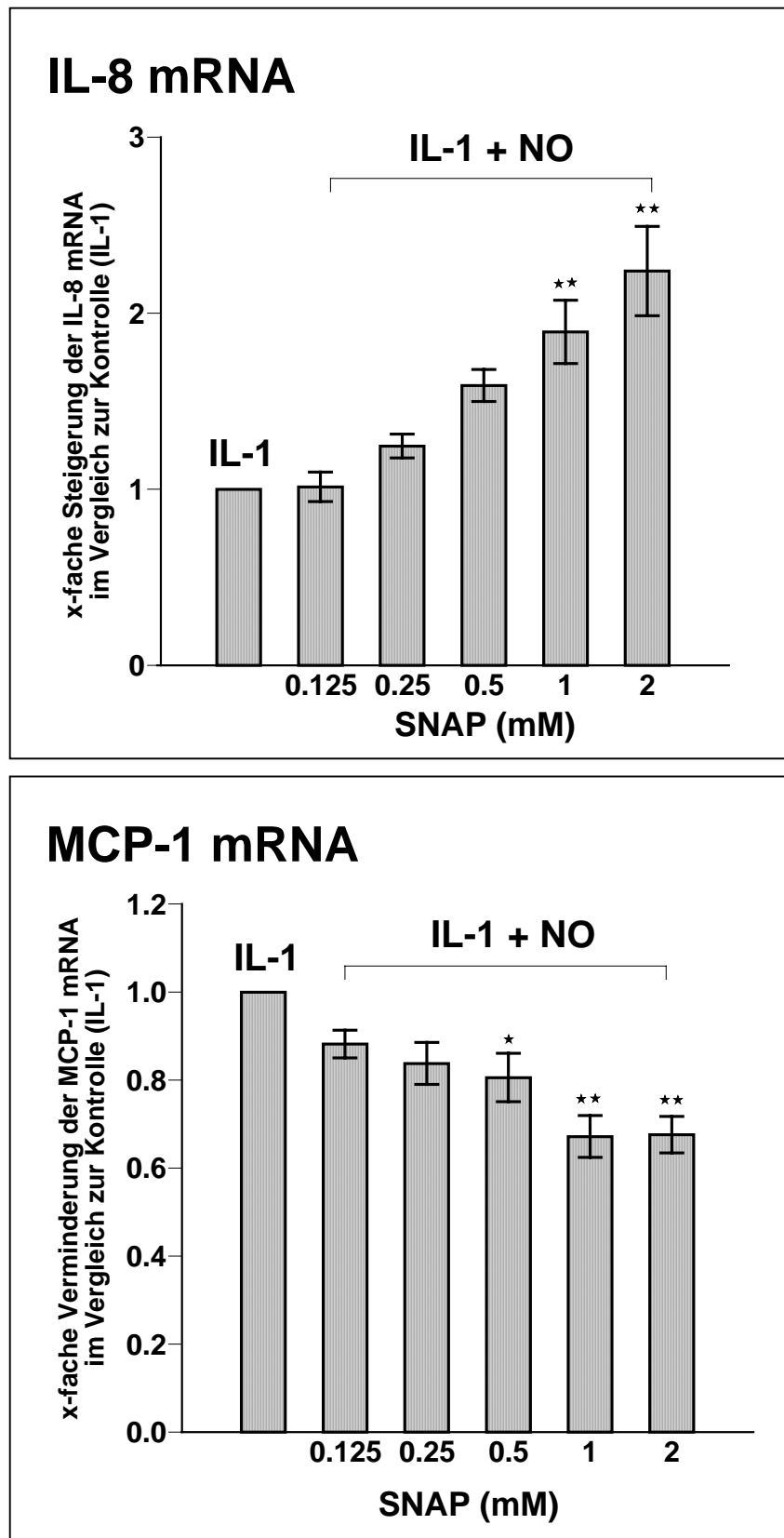


Abbildung 4 und 5 IL-8- bzw. MCP-1-mRNA-Konzentrationen nach Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (0.1 ng/ml) sowie Zugabe von SNAP in steigenden Konzentrationen (0.125-2 mM). Werte nach Quotientenbildung mit der jeweiligen GAPDH-mRNA-Konzentration als x-fache Steigerung/Hemmung im Vergleich zur Kontrolle (IL-1 β), n=5, **P<0.001, *P<0.05

Ergebnisse

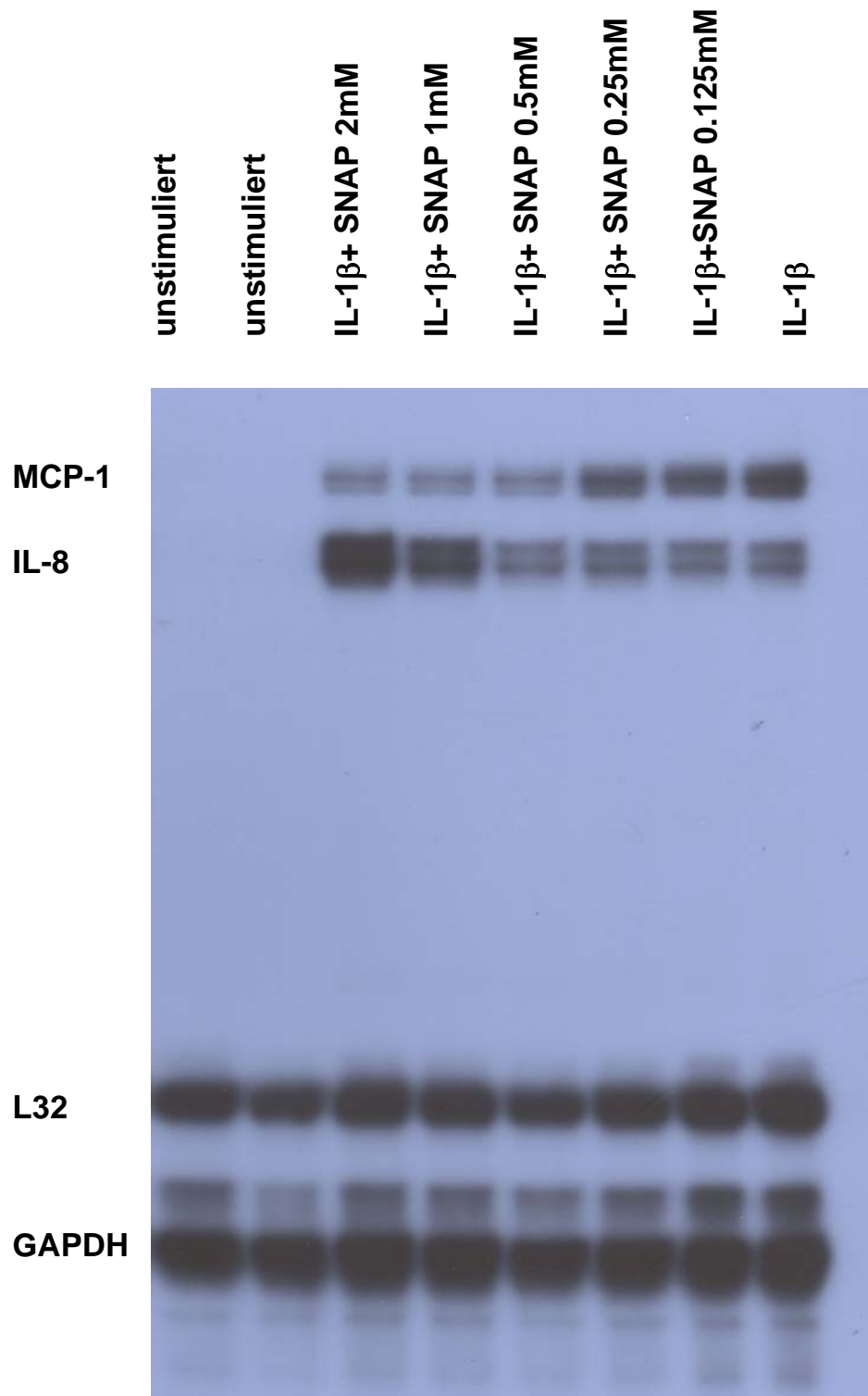


Abbildung 6 Repräsentativer RPA-Film zu Abbildung 4+5

Ergebnisse

Zeitreihen

Um die Kinetik der IL-8 und MCP-1 Synthese in A549-Zellen nach Zytokinstimulation zu erfassen wurden Zeitreihen durchgeführt. Gleichzeitig wurde in den Experimenten der Effekt von NO-Donatoren auf die IL-1 β bzw. TNF α induzierte Chemokinproduktion verglichen.

Hierzu wurden A549-Zellen mit IL-1 β (0.1 ng/ml) oder TNF α (1 ng/ml) mit und ohne SNAP (1mM) stimuliert. Die Überstände wurden nach 1, 2, 6, 8, 12, 16 und 20 h abgenommen und die IL-8- und MCP-1-Konzentration mittels ELISA bestimmt.

Unstimuliert produzierten A549 Epithelzellen über einen Zeitraum von 20h 610 pg/ml IL-8. Nach Stimulation mit IL-1 β bzw. TNF α kam es mit zunehmender Stimulationsdauer zu einem gleichmäßigen Anstieg der IL-8-Produktion auf 7000 pg/ml IL-8 bei Stimulation mit TNF α und 30000 pg/ml IL-8 bei Stimulation mit IL-1 β . Kostimulation mit 1mM SNAP führte zu jedem Zeitpunkt zu einer Erhöhung der IL-1 β und TNF α induzierten Chemokin-Antwort um 50-100% (Abbildung 7).

Ohne Zytokinstimulation ließen sich im Zellkulturüberstand von A549-Zellen nach 20h 213 ng/ml MCP-1 nachweisen. Die Zytokininduzierte MCP-1 Synthese zeigte einen gleichmäßigen Anstieg über den gesamten Zeitraum auf Werte bis zu 18000 pg/ml MCP-1 bei Stimulation mit TNF α und 40000 pg/ml bei Stimulation mit IL-1 β . Die IL-1 β bzw. TNF α induzierte MCP-1 Synthese war für alle Messwerte nach Zugabe von SNAP (1mM) um etwa 20% vermindert (Abbildung 8).

IL-1 β war über den gesamten Zeitraum ein stärkerer Stimulus als TNF α und wurde deshalb als proinflammatorischer Standard eingesetzt. In den Zeitreihen fand sich für den untersuchten Zeitraum ein linearer Anstieg der Chemokinkonzentrationen im Zellüberstand mit Maximalwerten nach 20 h.

Ergebnisse

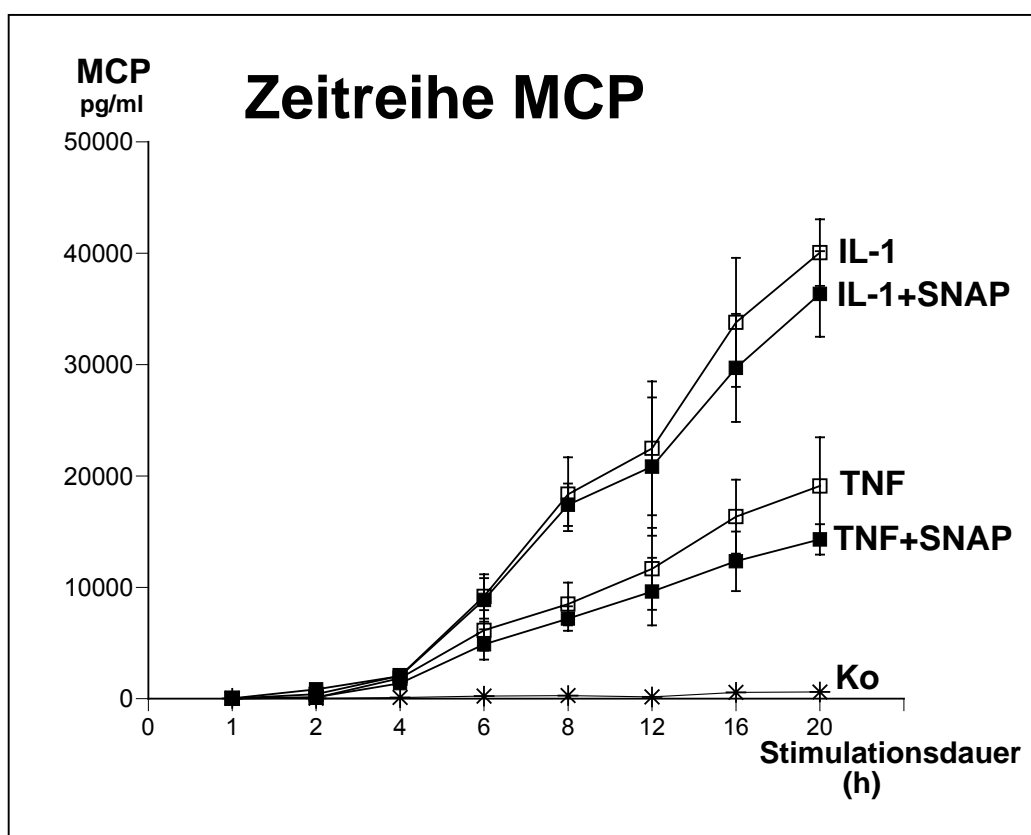
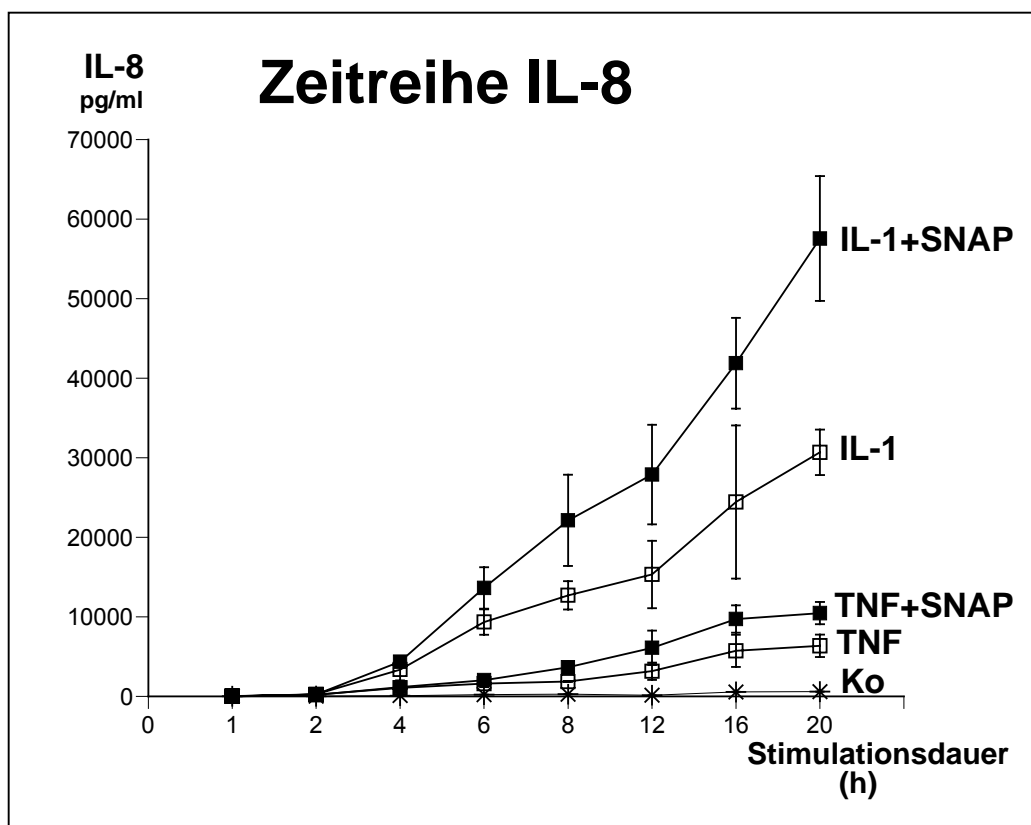


Abbildung 7 und 8 Zeitverlauf der IL-8 bzw. MCP-1 Synthese in A549-Zellen bei Stimulation mit IL-1 β (0.1ng/ml) und TNF α (1ng/ml) +/- 1mM SNAP, n=3

Ergebnisse

Die Kinetik der Chemokin-m-RNA Synthese wurde ebenfalls in Zeitreihen untersucht.

A549 Epithelzellen wurden mit IL-1 β mit und ohne SNAP (1mM) stimuliert und die Zellen nach 0, 1, 2, 4, 6, 10, 12 und 16h zur mRNA-Gewinnung und Bestimmung geerntet.

Die mRNA-Zeitreihen für IL-8 und MCP-1 zeigten deutlich, daß die mRNA Synthese beider Chemokine nach Stimulation mit IL-1 β nach 4h ein Maximum erreicht. Kostimulation mit dem NO-Donator SNAP führte während des gesamten Zeitraums zu einer deutlichen Erhöhung der IL-8-mRNA-Expression. Die Steigerung betrug nach 4h Stimulationsdauer das 2.4fache (Abbildung 9).

Demgegenüber fand sich bei Zugabe von SNAP ein Abfall der MCP-1-mRNA-Konzentration im gesamten Zeitverlauf. Die maximale MCP-1-mRNA-Konzentration nach 4h wurde durch Zugabe von SNAP um 50% reduziert (Abbildung 10).

Für die Experimente zur Chemokin-mRNA-Bestimmung in Alveolarepithelzellen wurde eine Stimulationsdauer von 4h gewählt.

Ergebnisse

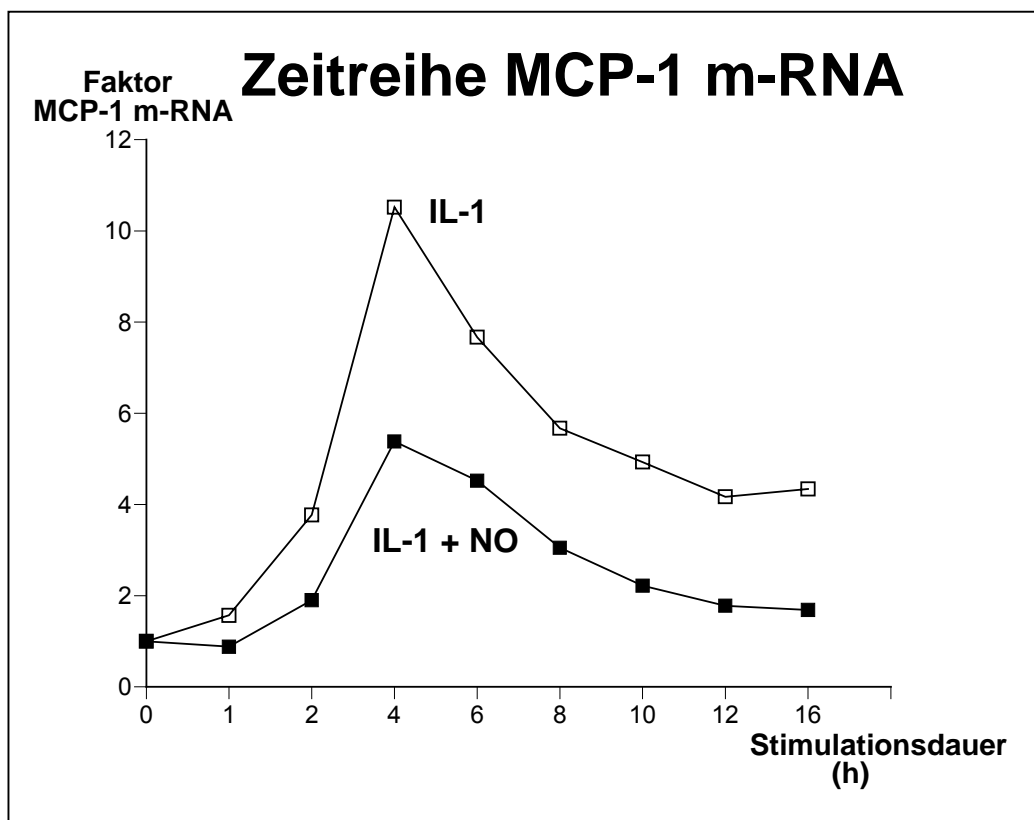
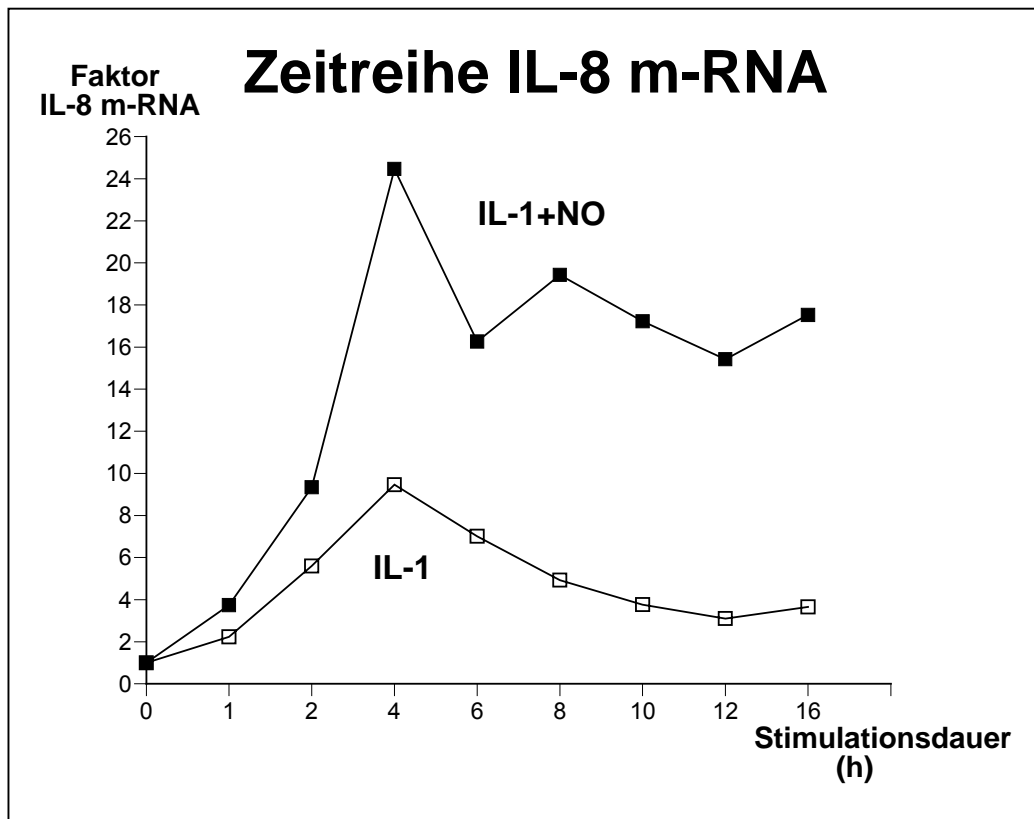


Abbildung 9 und 10 Zeitverlauf der IL-8-mRNA bzw. MCP-1-mRNA Synthese bei Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (0.1ng/ml) +/- SNAP (1mM), n=1, Werte nach Quotientenbildung mit der jeweiligen GAPDH-mRNA-Konzentration als x-fache Steigerung gegenüber der Kontrolle (A549 unstimuliert)

Einfluss von endogen produziertem NO auf die zytokininduzierte Chemokinsynthese

Wie in Abbildung 2 und 3 gezeigt wurde, führte exogenes NO zu einer dosisabhängigen Steigerung der zytokininduzierten IL-8 Synthese und einer dosisabhängigen Verminderung der MCP-1 Synthese. Um die Rolle von endogen produziertem NO für die zytokinabhängige Chemokinsynthese zu spezifizieren, wurde die Chemokinproduktion von A549-Zellen in Gegenwart von LNMMA (NG-Monomethyl-L-Arginin) untersucht.

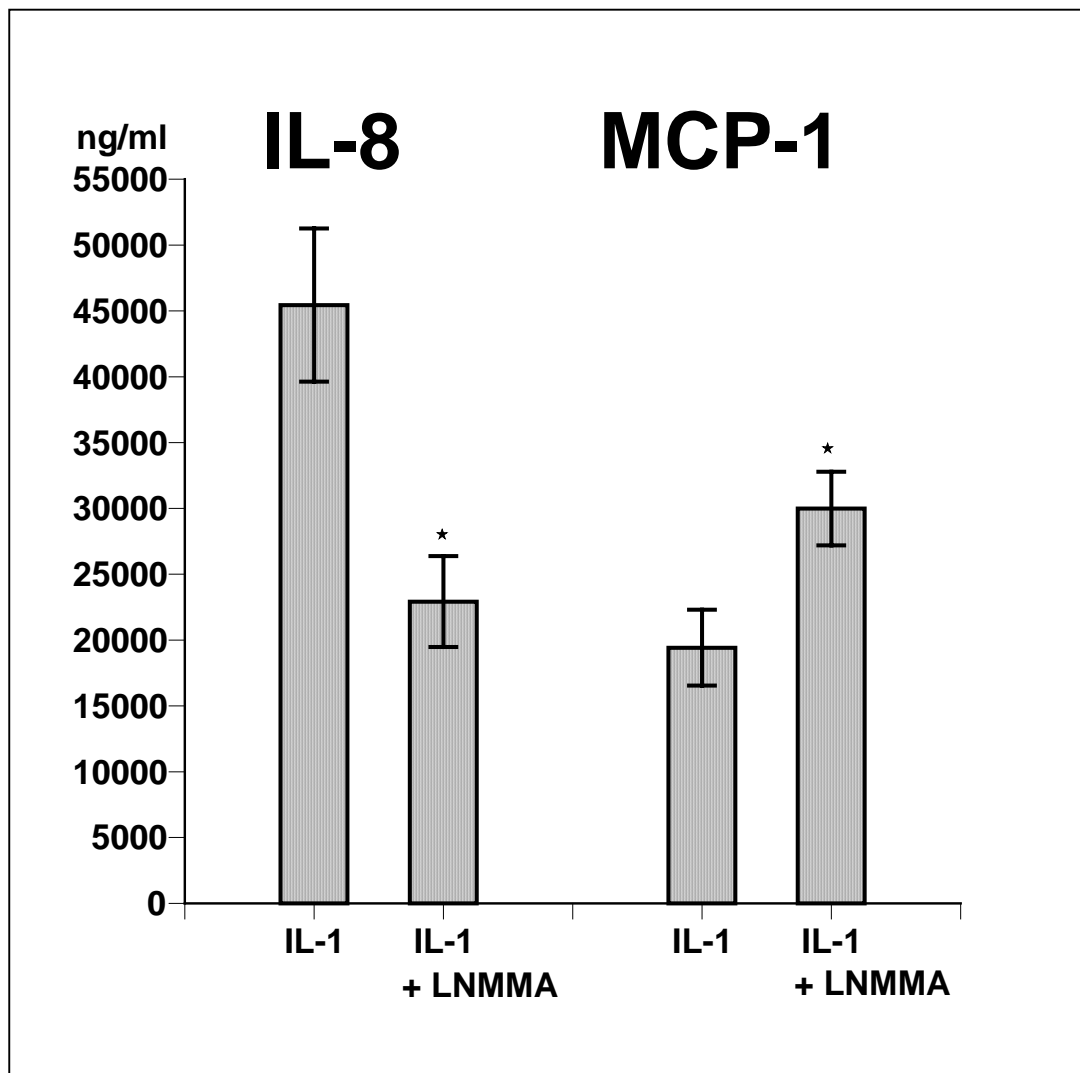


Abbildung 11 IL-8 und MCP-1 Synthese im Zellkulturüberstand nach Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (1ng/ml) und Zugabe von LNMMA (1mM), n=5, *p<0.05 im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 β ohne LNMMA

Ergebnisse

LNMMMA ist als L-Arginin-Analogon ein kompetetiver Hemmer aller Isoformen der NO-Synthase und hemmt somit die endogene NO-Produktion. Um das Nährmedium der Zellen als Quelle für NO auszuschließen, wurde bei allen Versuchen Arginin-freies Medium verwendet.

Die Inhibition der endogenen NO-Produktion durch LNMMMA (1mM) verminderte die durch IL-1 β (1ng/ml) induzierte IL-8-Produktion von 45444 (+/-5815) ng/ml auf 22928 (+/-3449) ng/ml IL-8, das entspricht einer Minderung um 50%. Die durch IL-1 β (1ng/ml) induzierte MCP-1-Produktion wurde durch LNMMMA um 54% von 19425 (+/-2872) ng/ml auf 29991 (+/-2788) ng/ml gesteigert (Abbildung 11). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass auch endogenes NO die zytokininduzierte IL-8 und MCP-1 Synthese gegenläufig beeinflusst.

Einfluß der Radikale Stickstoffmonoxid (NO), Superoxid (O_2^-) und Peroxynitrit ($ONOO^-$) auf die zytokininduzierte Chemokinsynthese

Die Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β führte, wie gezeigt, zu einer Erhöhung der IL-8-Produktion auf durchschnittlich 30000 pg/ml. Der NO-Donator SNAP induzierte eine weitere dosisabhängige Erhöhung um ca. 50%. NO vermittelt Effekte über Cyclo-Guanylatmonophosphat (cGMP), zum anderen aber auch durch die Bildung weiterer Radikale.

Um herauszufinden, welche Rolle die Radikale NO, O_2^- und $ONOO^-$ bei den beobachteten Vorgängen spielen, wurde mit Hilfe selektiver Radikaldonatoren und Radikalinhhibitoren systematisch ihr Einfluss auf die Regulation der zytokininduzierten zellulären Chemokinexpression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der NO-Scavenger PTIO, der O_2^- -Scavenger DPI und der $ONOO^-$ -Scavenger Ebselen die durch NO induzierte Steigerung der IL-8 Synthese dosisabhängig hemmen (Abbildung 12, 13 und 14).

PTIO (2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide), ein stabiler NO-Scavenger, der freies NO inhibiert ohne Einfluss auf die NO-Synthasen, bewirkte in der höchsten eingesetzten Dosierung von 1 mM, eine Hemmung der IL-8 Synthese von 56545 pg/ml (+/-4890) auf 31892 pg/ml (+/-5313).

DPI (Diphenyleneidonium Chloride) ist ein Hemmstoff der mitochondrialen NADPH-Ubiquinon-Oxidoreduktase und hemmt somit eine wichtige O_2^- Quelle im Zellstoffwechsel. In der höchsten eingesetzten Konzentration (10 μ M) führte DPI zu einer Hemmung der IL-8 Synthese von 72420 (+/-8305) pg/ml auf 23000 (+/-2904) pg/ml.

Ebselen (1,2-Benzisoselenazol-3(2H)-one), ein $ONOO^-$ -Scavenger, konnte die durch NO induzierte IL-8 Steigerung von 78806 pg/ml (+/-13635) auf 37882 pg/ml (+/-8063) hemmen.

Ergebnisse

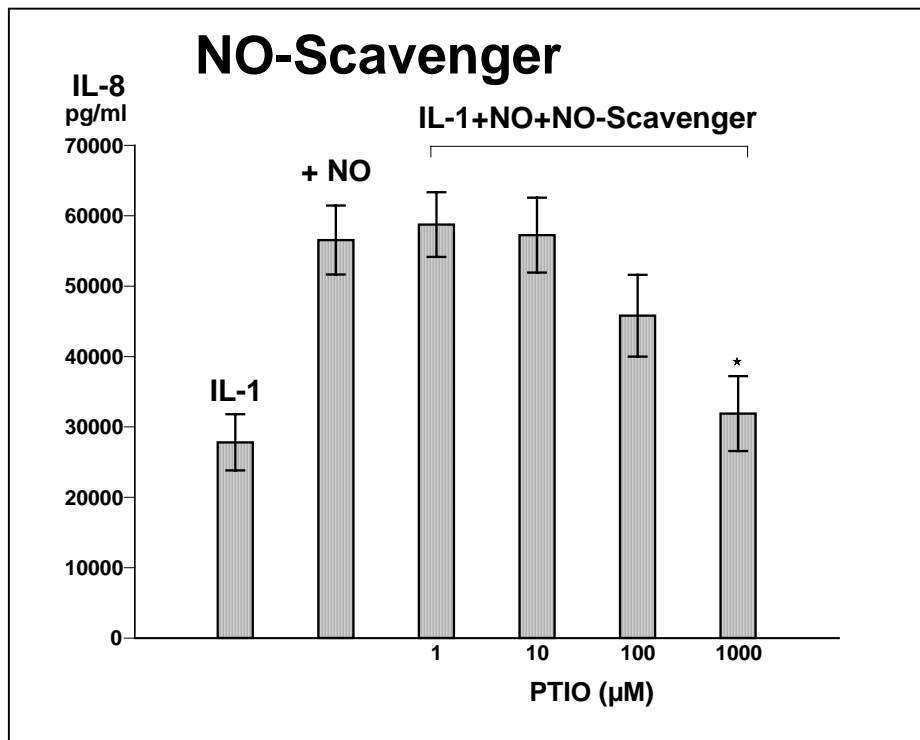


Abbildung 12 IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (0.1ng/ml) und Zugabe von SNAP (2mM) und Zugabe von PTIO in steigenden Konzentrationen (1-1000 μ M), ANOVA, n=3, *p<0.05 im Vergleich zu Stimulation mit IL-1 β und SNAP

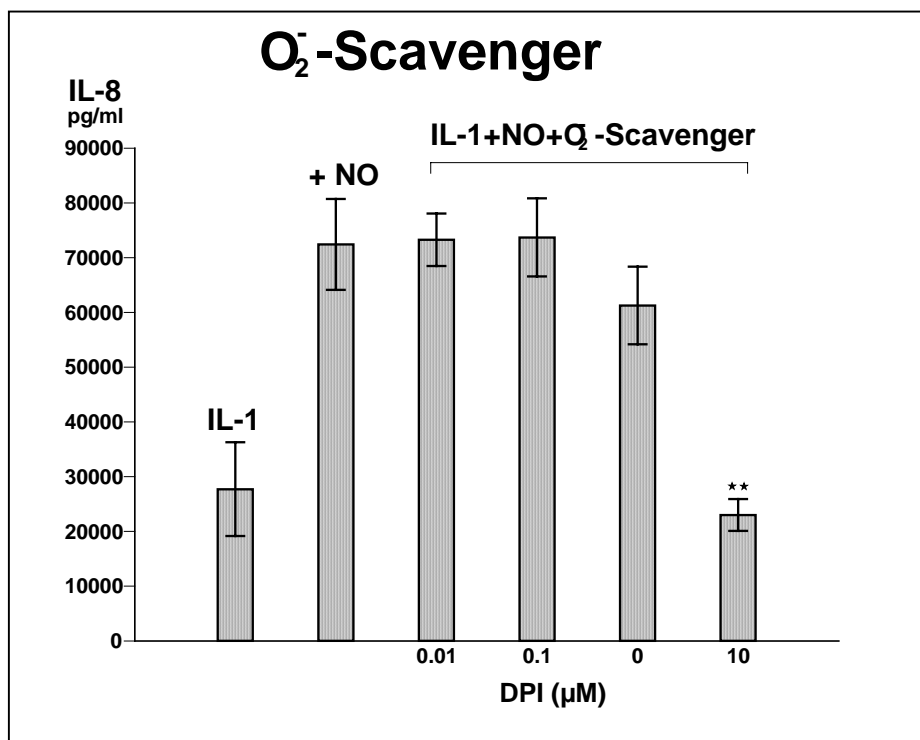


Abbildung 13 IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (0.1ng/ml) und Zugabe von SNAP (2mM) und Zugabe von DPI in steigenden Konzentrationen (0.01-10 μ M), n=3, **p<0.001 im Vergleich zu Stimulation mit IL-1 β und SNAP

Ergebnisse

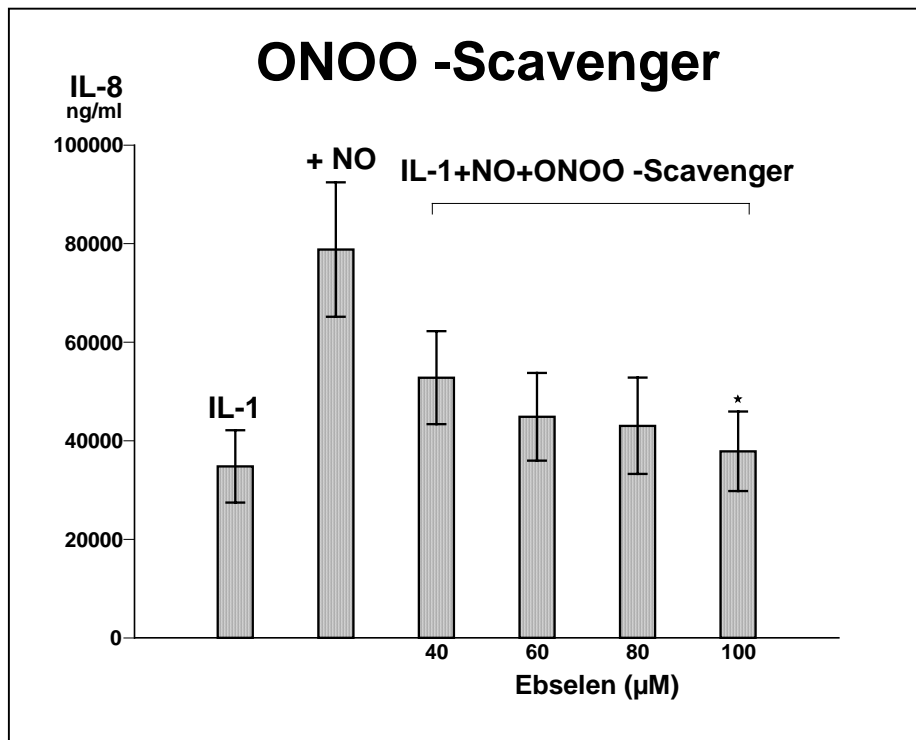


Abbildung 14 IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (0.1ng/ml) und Zugabe von SNAP (2mM) und Zugabe von Ebselen in steigenden Konzentrationen (40-100 μ M), n=3, *p<0.05 im Vergleich zu Stimulation mit IL-1 β und SNAP

Die DPI induzierte Hemmung spricht dafür, dass endogenes O₂⁻ für die NO induzierte Steigerung der IL-8 Synthese unbedingt notwendig ist. Die Hemmung durch Ebselen stützt die Hypothese, dass die Reaktion von NO und O₂⁻ zu ONOO⁻ für die unter NO beobachtete Steigerung der IL-1 β induzierten Expression von IL-8 in Alveolarepithel verantwortlich ist.

In der Tat konnte eine intrazelluläre ONOO⁻ Bildung nach NO-Gabe mittels FACScan in A549-Zellen nachgewiesen werden. Das Fluorochrom Dihydrorhodamine (DHR) weist weitgehend spezifisch ONOO⁻ nach. Die Oxidation von DHR durch ONOO⁻ führt zu einem charakteristischen Fluoreszenzlicht im Durchflusszytometer.

A549-Zellen wurden mit 0.1 ng/ml IL-1 β +/- SNAP stimuliert. Nach 4h wurde das Fluorochrom DHR zugegeben und die Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen. Die Co-Inkubation von A549-Zellen mit IL-1 β /TNF α und SNAP führte zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität gegenüber Stimulation mit IL-1 β /TNF α allein (Abbildung 15+16).

Ergebnisse

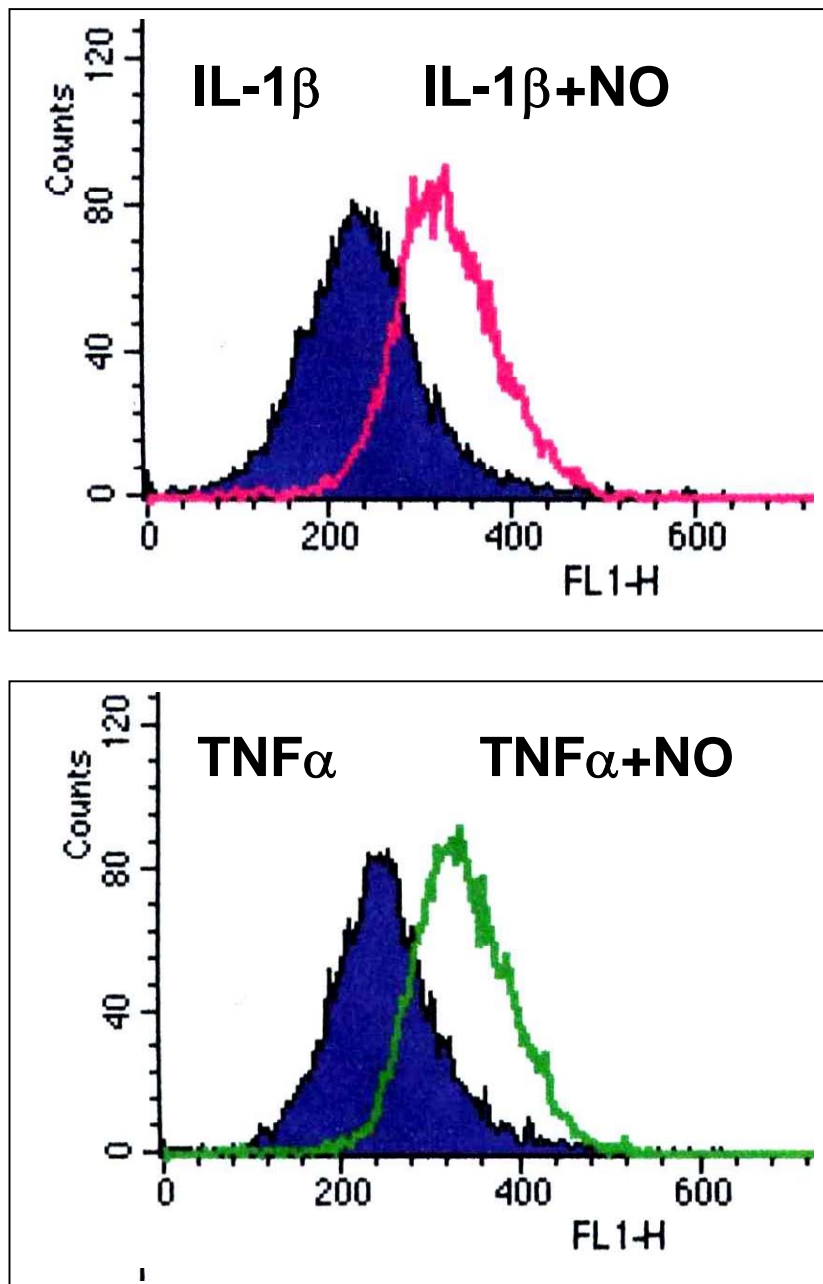


Abbildung 15+16 Durchflusszytometrischer Nachweis der ONOO^- -Produktion mit DHR 123 über typische Fluoreszenzlichtcharakteristika

Ergebnisse

Analoge Versuche wurden durchgeführt, um den Einfluss von NO, O_2^- und $ONOO^-$ auf die MCP-1 Synthese zu untersuchen.

Die durch IL-1 β induzierte MCP-1-Produktion in A549-Alveolarpithelzellen wurde, wie in Abbildung 3 gezeigt, durch zusätzliche Gabe von SNAP (2mM) um ca. 60% gehemmt. Hemmung der endogenen NO Synthese durch LNMMA hingegen führte zu einer Steigerung der MCP-1-Produktion. Um zu klären, ob $ONOO^-$, von dem zuvor gezeigt wurde, daß es für die Steigerung der IL-8 Synthese verantwortlich ist, auch die Supression der MCP-1 Synthese vermittelt, wurde synthetisiertes $ONOO^-$ eingesetzt.

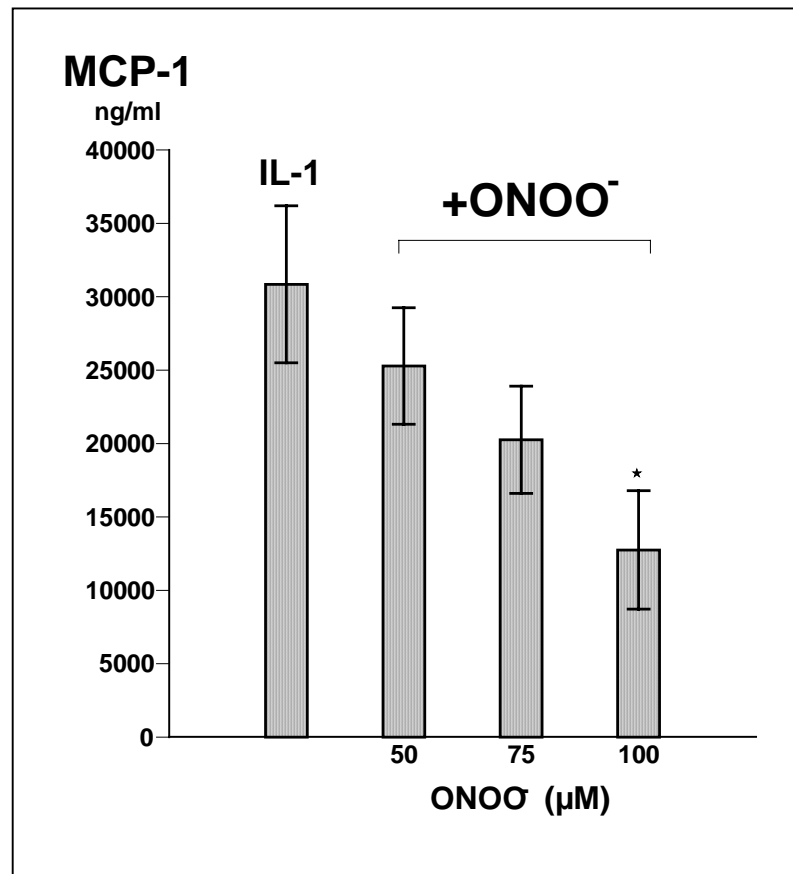


Abbildung 17 MCP-1 Synthese im Zellkulturüberstand nach Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (1ng/ml) und ONOO $^-$ in steigenden Konezentrationen (50-100 μ M), n=5, *p<0.05 im Vergleich zu Stimulation mit IL-1 β

Ergebnisse

Auch exogen appliziertes ONOO^- war in der Lage die IL-1 β induzierte MCP-1 Synthese von 30852 pg/ml (+/-5342) um 60% auf 12751 pg/ml (+/-4034) zu hemmen (Abbildung 17). ONOO^- , das Reaktionsprodukt aus NO und O_2^- ist ein zellpermeables Oxidans, das aus Isoamyl-Nitrit und H_2O_2 synthetisiert wurde (Herstellerangaben von Alexis).

Die Inhibition der ONOO^- -Bildung durch Zugabe des O_2^- -Scavengers DPI führte jedoch unerwarteter Weise nicht zur Aufhebung der NO vermittelten Suppression der MCP-1 Synthese (Daten nicht gezeigt). Vielmehr ließ sich zeigen, daß der O_2^- -Scavenger DPI die IL-1 β induzierte MCP-1-Produktion von 20168 pg/ml (+/-1726) um 40% auf 11209 pg/ml (+/-682) hemmen konnte (Abbildung 19).

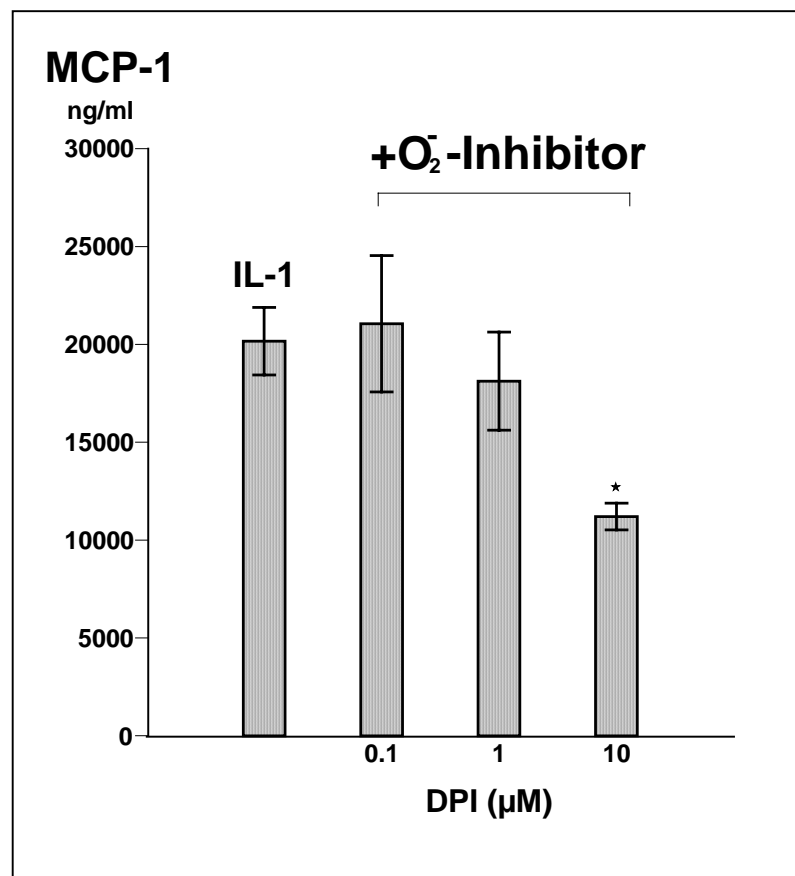


Abbildung 19 MCP-1 Synthese im Zellkulturüberstand nach Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (1ng/ml) und DPI in steigenden Konzentrationen (0.1-10 μM), n=5, *p<0.05 im Vergleich zu Stimulation mit IL-1 β

Ergebnisse

Umgekehrt führte die Zugabe von DMNQ (2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone), ein zellpermeabler O_2^- -Donator zu einer Erhöhung der zytokininduzierten MCP-1 Synthese von 19425 pg/ml (+/-2872) um 60% auf 30191 pg/ml (+/-3049, Abbildung 18).

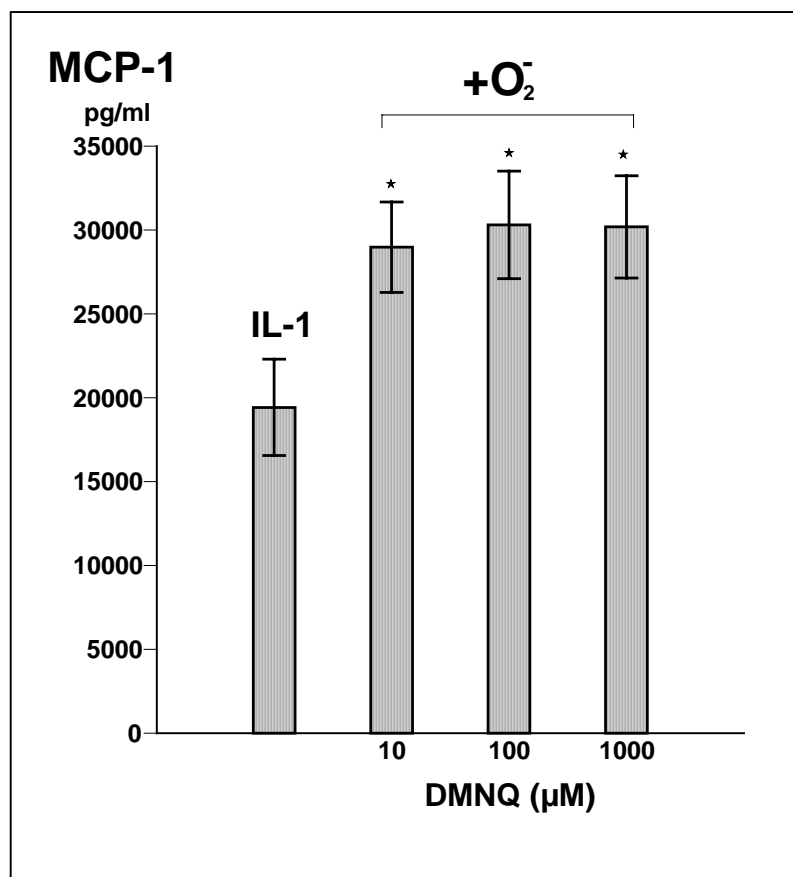


Abbildung 18 MCP-1 Synthese im Zellkulturüberstand nach Stimulation von A549-Zellen mit IL-1 β (1ng/ml) und DMNQ in steigenden Konzentrationen (10-1000 μ M), n=5 *p<0.05 im Vergleich zu Stimulation mit IL-1 β

Ergebnisse

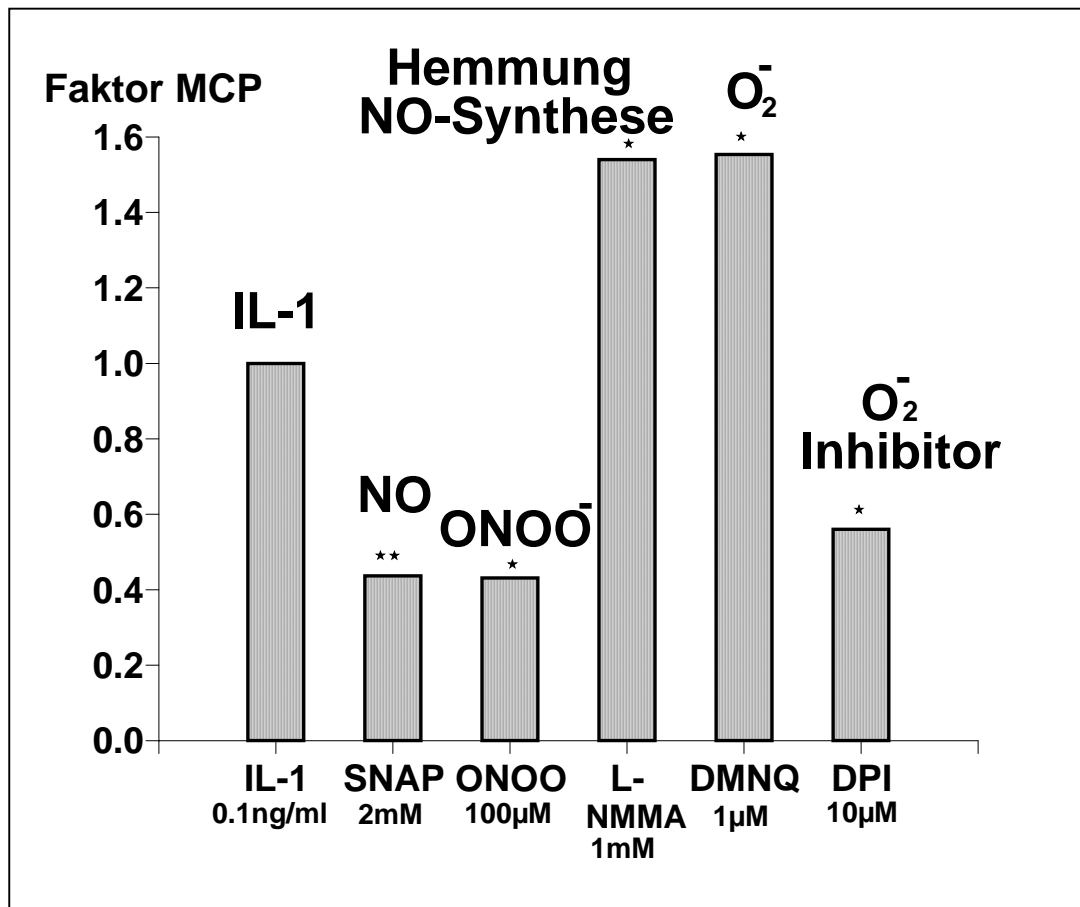


Abbildung 20 MCP-1 Zusammenfassung

Zusammenfassend ließ sich zeigen, daß nicht nur NO sondern auch ONOO⁻ zu einer Hemmung der IL-1 β -induzierten MCP-1 Synthese führten. Die isolierte Erhöhung des O₂⁻-Angebots durch Hemmung der endogenen NO Synthese hingegen führte zu einer Steigerung der MCP-1 Synthese. Wurde die Generierung von O₂⁻ durch den Scavenger DPI inhibiert, führte dies entsprechend zu einer Hemmung der MCP-1 Synthese (Abbildung 20).

Die Zusammenfassung in Abb. 20 zeigt noch einmal, dass bei der Regulation der zytokininduzierten MCP-1 Synthese in A549-Zellen O₂⁻ stimulierende, NO und ONOO⁻ hingegen hemmende Effekte hat.

Einfluss der Radikale Stickstoffmonoxid (NO), Superoxid (O₂⁻) und Peroxynitrit (ONOO⁻) auf die spontane Chemokinsynthese

Um zu untersuchen, ob die Effekte der Radikale NO, O₂⁻ und ONOO⁻ auf die zytokininduzierte Chemokinsynthese auch bei der Regulation der spontanen Chemokinsynthese in Alveolarepithel zu beobachten sind, wurden auch in den unstimulierten Zellkulturen systematisch die selektiven Radikaldonatoren und Radikalinhhibitoren eingesetzt.

Der NO-Donator SNAP führte auch ohne Zytokinstimulation zu einer dosisabhängigen Erhöhung der spontanen IL-8-Produktion auf 1285 (+/-77) pg/ml gegenüber basalen Werten von 310 (+/-27) pg/ml (Abbildung 21).

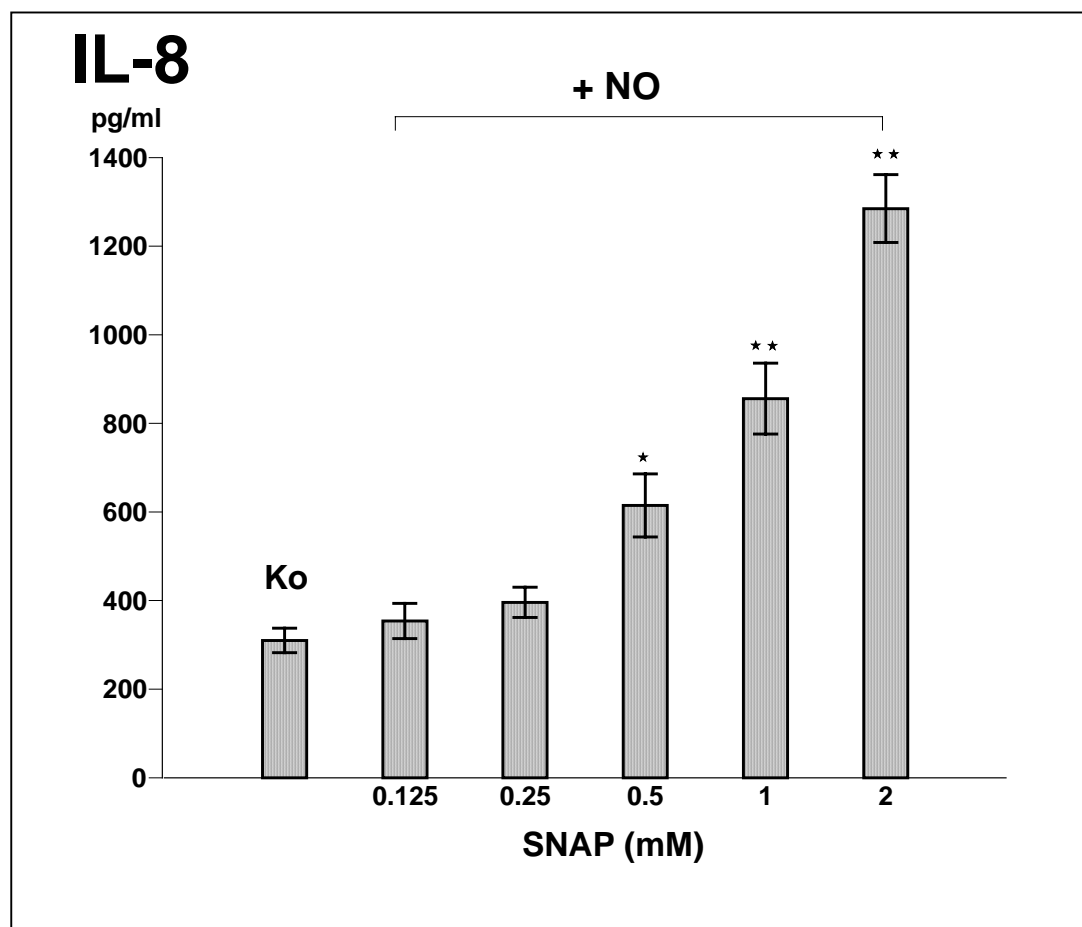


Abbildung 21 IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Zugabe von SNAP in steigenden Konzentrationen (0.125-2mM), n=7, **P<0.001, *P<0.05 gegenüber der Kontrolle (A 549 unstimuliert)

Ergebnisse

Umgekehrt führte die Hemmung der endogenen NO Synthese durch LNMMA in einer Dosierung von 1mM zu einer Verminderung der IL-8-Produktion um 55%. Der Befund, dass der ONOO⁻-Scavenger Ebselen in einer Dosierung von 100 µM die basale IL-8 Synthese um 37% reduzierte (Abbildung 22), führte zu der Vermutung, daß ONOO⁻, das Reaktionsprodukt aus NO und O₂⁻ auch für die Steigerung der spontanen IL-8 Synthese verantwortlich ist. In der Tat führte exogen zur A549 Zellkultur hinzugefügtes ONOO⁻ zu einer noch deutlicheren Steigerung der IL-8 Synthese. Auch hier kam es zu einer dosisabhängigen Steigerung der IL-8-Produktion. In der höchsten eingesetzten Dosis von 100µM führte ONOO⁻ zu einer Steigerung auf das 5,87 fache gegenüber basalen Werten (Abbildung 22).

Die Bedeutung der Radikale NO und ONOO⁻ bei der Regulation der IL-8 Synthese konnte in weiteren Versuchen bestätigt werden. Es zeigte sich, dass sowohl die Hemmung der endogenen NO Synthese, als auch das Blocken von ONOO⁻ zu einer Abnahme der basalen IL-8-Produktion führte. Das Konzept, dass endogenes NO auch bei der Regulation der spontanen IL-8 Synthese von A549-Zellen eine wichtige Rolle spielt und vermutlich die Reaktion von NO mit O₂⁻ zu ONOO⁻ als Schlüsselreaktion anzusehen ist, wurde durch den Einsatz von O₂⁻-Donatoren weiter bestätigt.

Die Substanzen 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ) und Xanthin/Xanthin Oxidase sind O₂⁻-Donatoren. DMNQ ist ein zellpermeabler O₂⁻-Donator. Xanthin Oxidase, ein Metalloflavoprotein, ist eine wichtige Quelle für freie Sauerstoffradikale. Das Enzym katalysiert die Reduktion von Sauerstoff (O₂) und führt zur Bildung von O₂⁻ und H₂O₂. Xanthin, das Substrat des Enzyms ist ein Zwischenprodukt des Purinstoffwechsels.

Bei Stimulation von A549-Zellen mit den O₂⁻-Donatoren Xanthin/Xanthin Oxidase und DMNQ kam es zu einer signifikanten und dosisabhängigen Erhöhung der IL-8-Sekretion. DMNQ führte zu einer Erhöhung auf das 1.61-fache gegenüber basalen Werten, bei Xanthin/Xanthin Oxidase kam es sogar zu einer Steigerung um das 2.44-fache.

Ergebnisse

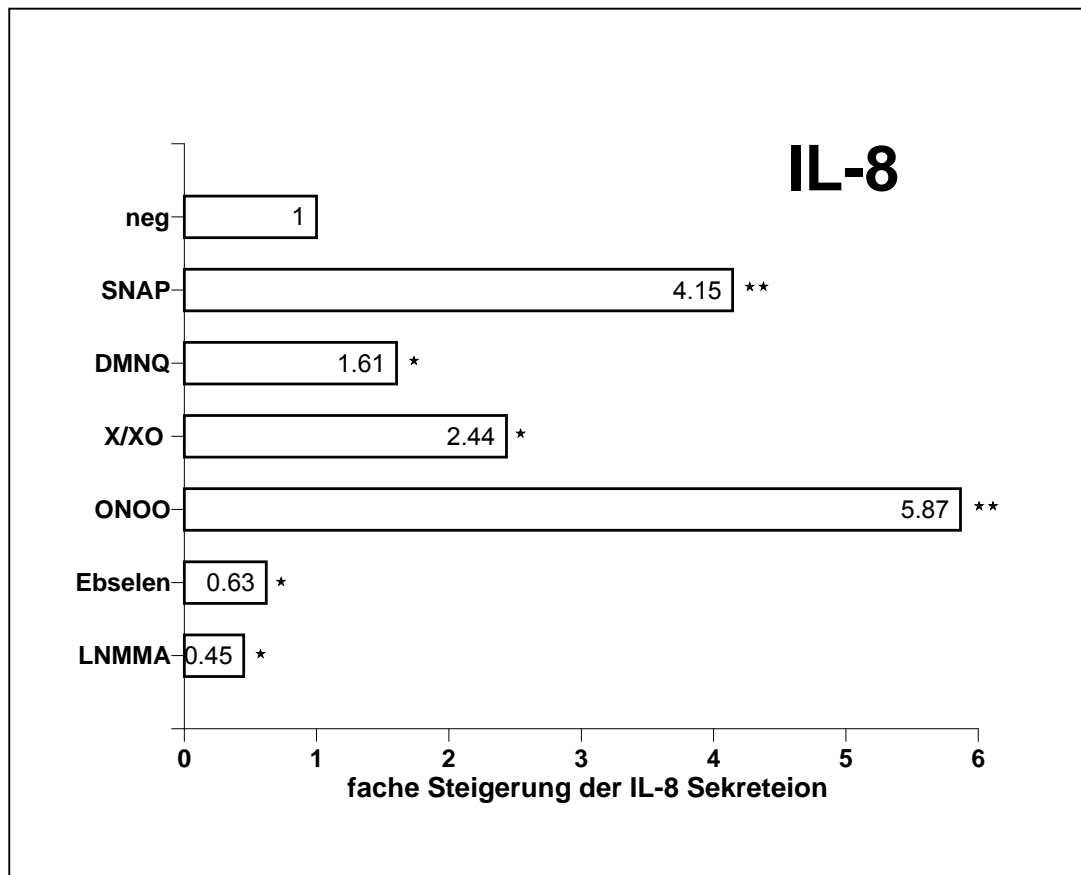


Abbildung 22 IL-8-Konzentration im A549 Zellkulturüberstand nach Zugabe von SNAP (2mM, n=7), DMNQ (100µM, n=5), Xanthin (400µM)/Xanthin Oxidase (0.5u, n=6), ONOO⁻ (100µM, n=7), Ebselen (100µM, n=4) und LNMMA (1mM, n=5), Werte als Quotient x/Kontrolle (Kontrolle: A549 unstimuliert), **P<0.001, *P<0.05

Weitere Versuche haben gezeigt, dass ONOO⁻ als Reaktionsprodukt von NO und O₂⁻ für die Steigerung der IL-8 Synthese verantwortlich zu sein scheint.

Die gleichzeitige Zugabe des NO-Donators SNAP und der O₂⁻-Donatoren Xanthin/Xanthin Oxidase bzw. DMNQ zu A549-Zellen führte zu einer signifikanten Steigerung der IL-8 Synthese im Vergleich zur Stimulation mit den Einzelsubstanzen (Abbildung 23).

1 mM SNAP führte zu einer Erhöhung der IL-8 Synthese auf 894 (+/-130) pg/ml. Xanthin (400µM)/Xanthin Oxidase führte zu einer Erhöhung auf 967 (+/-180) pg/ml.

1mM SNAP und Xanthin (400µM)/Xanthin Oxidase (0.5u) bzw. 2mM SNAP und 100µg DMNQ führten zu einer Steigerung der IL-8-Produktion auf 1572

Ergebnisse

(+/-183) pg/ml bzw. auf 1805 (+/-116) pg/ml gegenüber den Einzelsubstanzen. Damit wurde nahezu die Steigerung der IL-8 Synthese nach Zugabe von exogenem ONOO^- (100 μM) auf Werte von 2166 (+/-100) pg/ml erreicht.

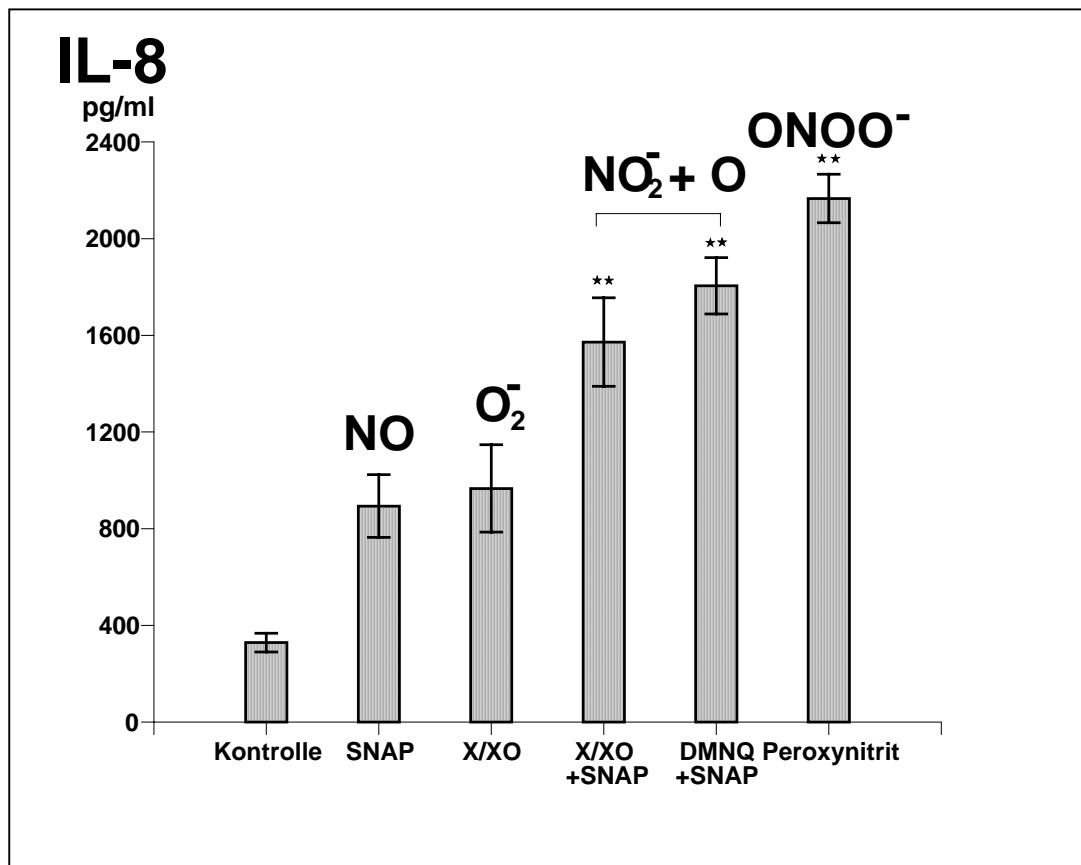


Abbildung 23 IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand von A549-Zellen nach Zugabe von SNAP (1mM) und Xanthin (400 μM)/Xanthin Oxidase (0.1u) sowie ihrer Kombination, außerdem Zugabe von SNAP (2mM) und DMNQ (1 μM) in Kombination und Zugabe von ONOO^- (100 μM), n=6, **p<0.001 im Vergleich zu Stimulation mit X/XO(0.1u)

Analoge Versuche wurden durchgeführt, um den Einfluss von NO, O_2^- und ONOO^- auf die MCP-1 Synthese zu untersuchen. Es zeigte sich, dass auch unter spontanen Bedingungen sowohl NO als auch ONOO^- zu einer Hemmung der MCP-1 Synthese führt, O_2^- jedoch eine Steigerung zur Folge hat.

Ergebnisse

Die Hemmung der endogenen NO Synthese durch LNMMA führte zu einer Steigerung der MCP-1 Synthese um 62%. Der NO-Scavenger PTIO steigerte die spontane MCP-1 Synthese in einer Dosierung von 10 μ M um 25%.

Durch exogen hinzugefügtes O₂⁻ wurde eine Steigerung der MCP-1 Synthese von A549-Zellen beobachtet. Der O₂⁻-Donator DMNQ führte in einer Dosierung von 0.01 μ M zu einer Steigerung der MCP-1-Produktion um 85%.

Demgegenüber führte die Hemmung der O₂⁻-Produktion durch DPI zu einer Abnahme der MCP-1 Synthese. 10 μ M DPI führten zu einer Abnahme der MCP-1 Synthese um 58% gegenüber basalen Werten (Abbildung 24).

Die Ergebnisse zeigen, dass die bei der zytokininduzierten MCP-1 Synthese beobachteten Einflüsse von NO, O₂⁻ und ONOO⁻ auch bei der spontanen MCP-1 Synthese nachzuweisen sind.

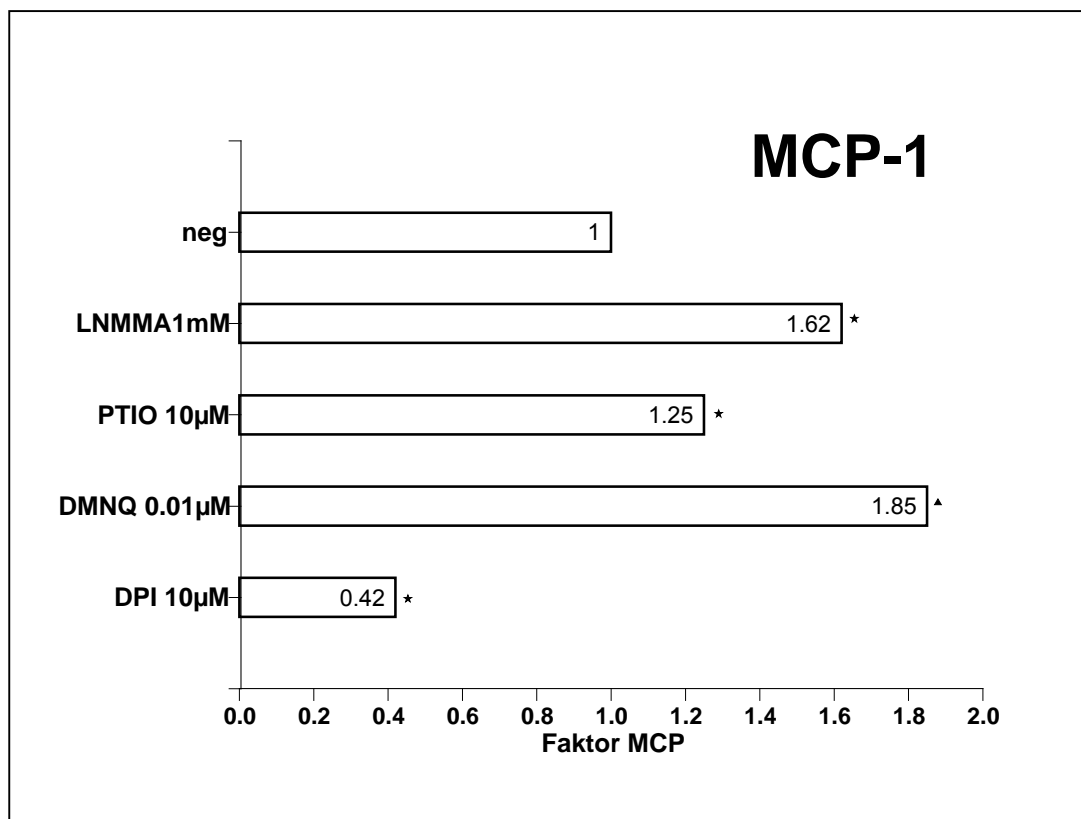


Abbildung 24 MCP-1-Konzentration im Zellkulturüberstand von A549-Zellen nach Zugabe von LNMMA (1mM, n=5), PTIO (10 μ M, n=6), DMNQ (0.01 μ M, n=5) und DPI (10 μ M, n=5), Angaben als Quotient x/Kontrolle (Kontrolle: A549 unstimuliert). ANOVA, Tukey Test, *P<0.05, ANOVA on Ranks, Dunns Methode, \blacktriangleleft P<0.05

Differentielle Regulation der Chemokinsynthese in Humanen Alveolarepithelzellen (HAEpC)

Da von Tumorzellen abgeleitete permanente Epithelzelllinien wie A549 möglicherweise erhebliche Unterschiede zu primären Alveolarepithelzellen (HAEpC) aufweisen, wurden die wesentlichen Versuche mit isolierten primären Alveolarepithelzellen wiederholt.

HAEpC produzierten unter gleichen Bedingungen weniger IL-8 als A549 Epithelzellen, jedoch deutlich mehr MCP-1. Die Kinetik der Chemokinsekretion nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ war jedoch vergleichbar.

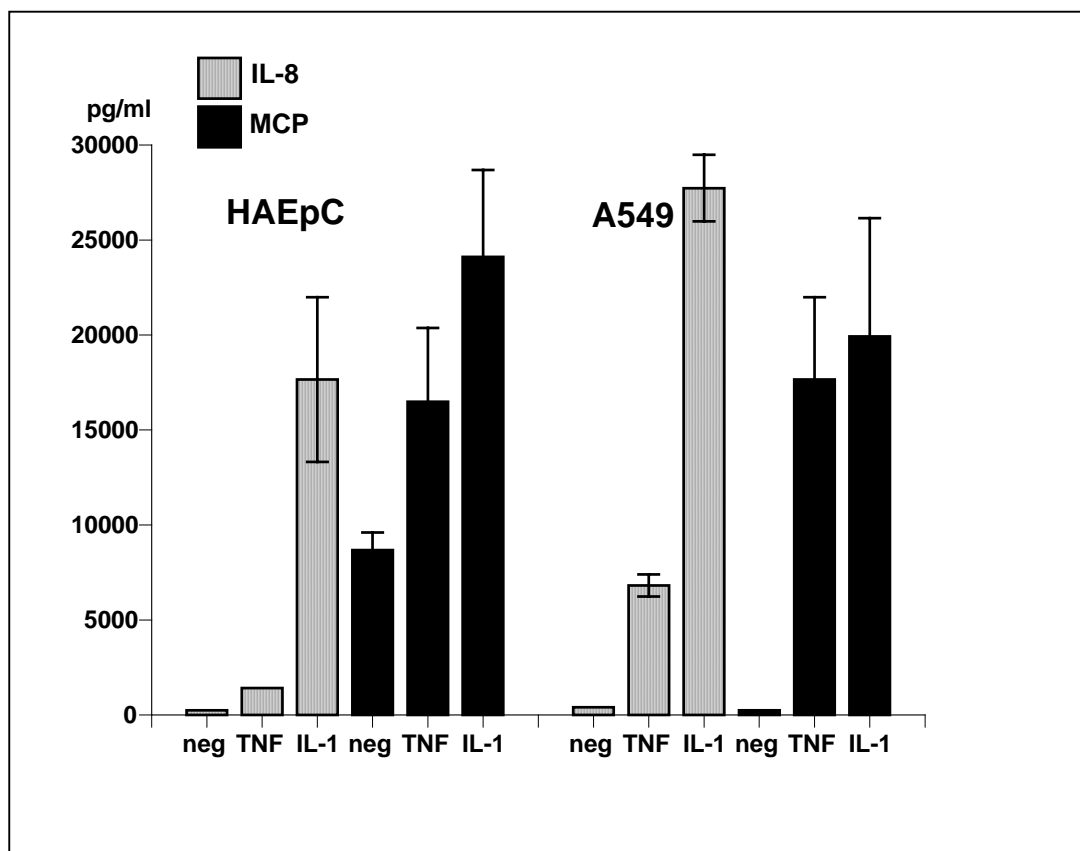


Abbildung 25 Vergleich der zytokininduzierten IL-8 und MCP-1 Synthese von HAEpC (n=3) und A549 Epithelzellen (n=9). IL-8- und MCP-1-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (1 ng/ml) und $\text{IL-1}\beta$ (0.1 ng/ml). Kontrolle: A549 bzw. HAEpC unstimuliert.

Ergebnisse

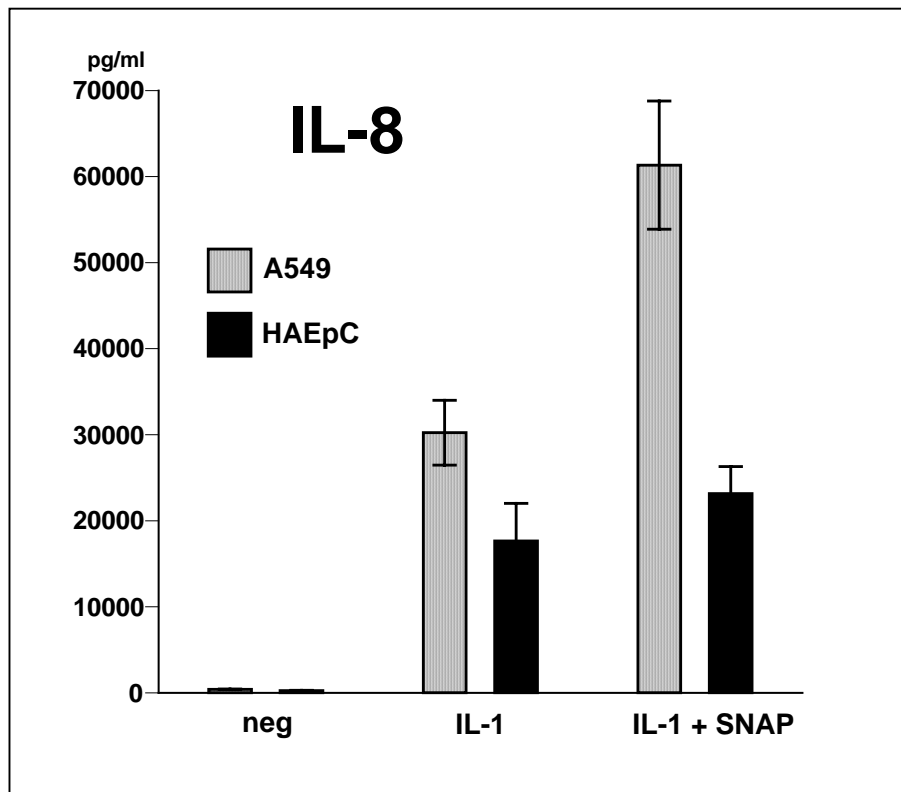


Abbildung 26 Vergleich der IL-8 Synthese in isolierten humanen Epithelzellen (HEApC) und A549-Zellen nach Stimulation mit IL-1 β (0.1ng/ml) und Zugabe von SNAP (1mM), n=3

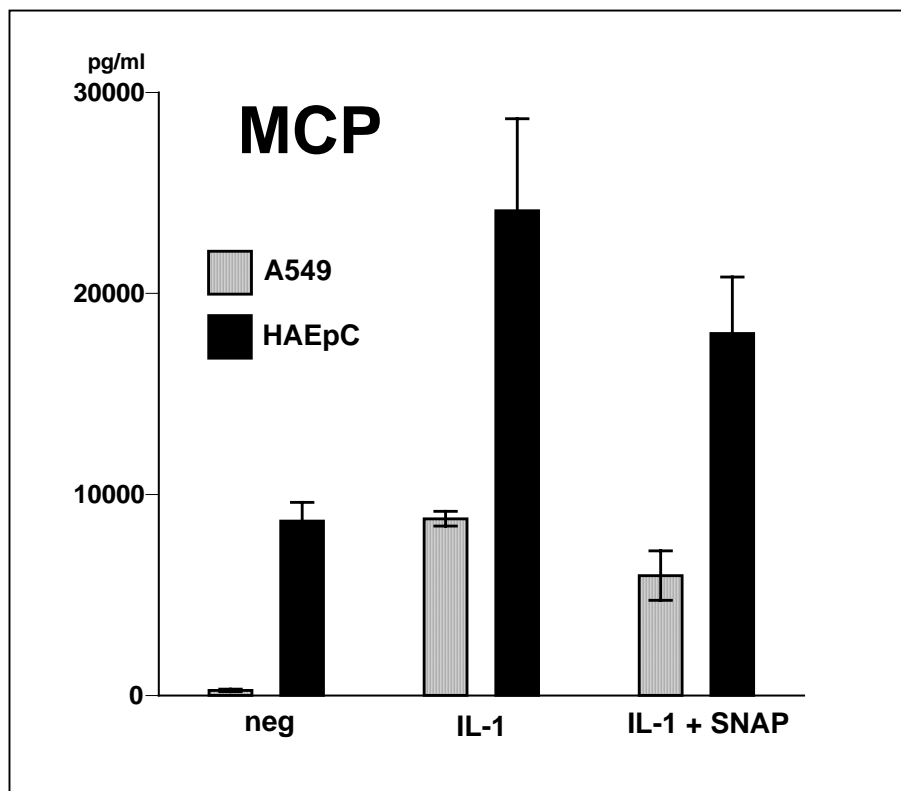


Abbildung 27 Vergleich der MCP-1 Synthese in isolierten humanen Epithelzellen (HEApC) und A549-Zellen nach Stimulation mit IL-1 β (0.1ng/ml) und Zugabe von SNAP (1mM), n=3

Ergebnisse

Nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (1ng/ml) bzw. $\text{IL-1}\beta$ (0.1 ng/ml) kam es zu einer deutlichen Steigerung der IL-8 und MCP 1 Synthese. Auch in HAEPc war $\text{IL-1}\beta$ ein stärkerer Stimulus als $\text{TNF}\alpha$ (Abbildung 25).

Wie in A549 Epithelzellen konnte die zytokininduzierte IL-8 Synthese in HAEPc durch NO dosisabhängig gesteigert werden. Es kam zu einer Erhöhung der durch $\text{IL-1}\beta$ induzierten IL-8 Synthese von 17657 (+/-4340) ng/ml auf 23152 (+/-3126) ng/ml bei Zugabe von 1mM SNAP (Abbildung 26). Die $\text{IL-1}\beta$ -induzierte MCP-1 Synthese verminderte sich bei Zugabe von SNAP von 24115 (+/-4573) ng/ml auf 18013 (+/-2799) ng/ml (Abbildung 27).

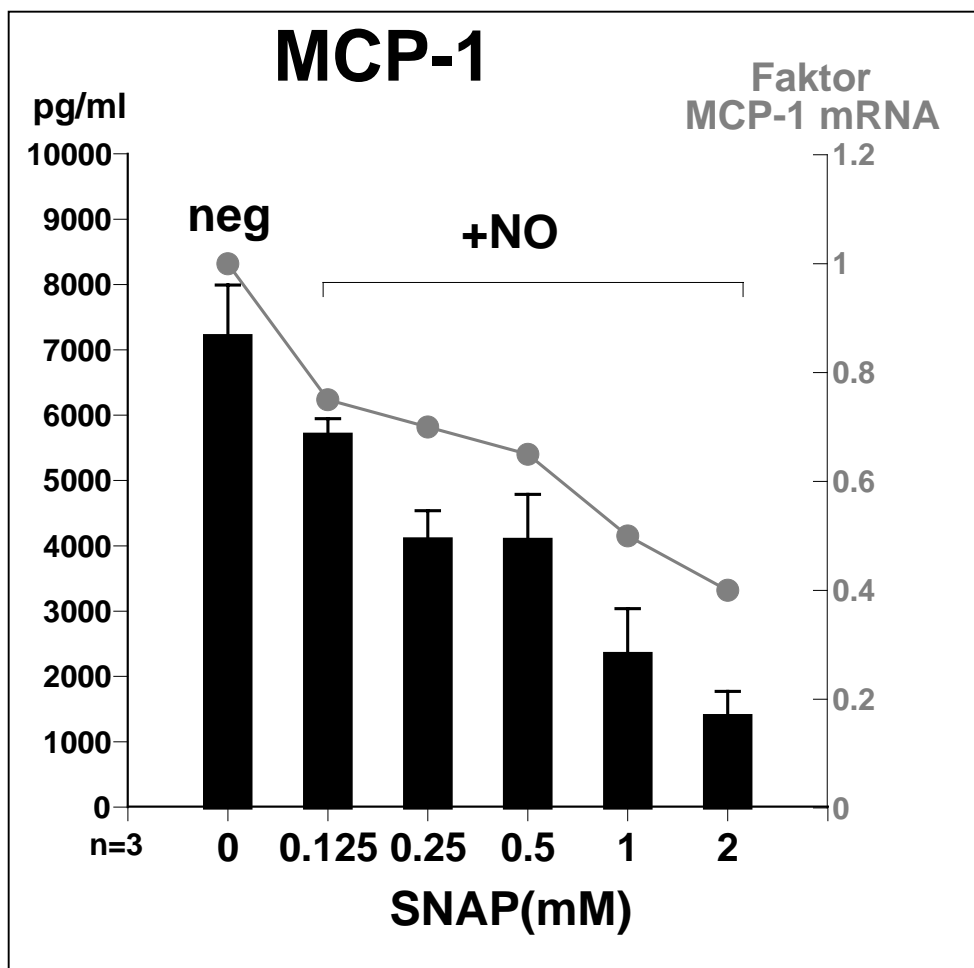


Abbildung 28 MCP-1 Synthese im Zellkulturüberstand und MCP-1-mRNA-Produktion von HAEPc nach Zugabe von SNAP in steigenden Konzentrationen (0.125-2 mM), m-RNA-Werte nach Quotientenbildung mit der jeweiligen GAPDH-mRNA als x-fache Hemmung im Vergleich zur Kontrolle (HEApC unstimuliert), n=3, **P<0.001, *P<0.05

Ergebnisse

HAEpC sezernierten spontan hohe Konzentrationen MCP-1 in den Kulturüberstand. Diese spontane MCP-1 Synthese konnte durch den NO-Donator SNAP dosisabhängig gehemmt werden. 2mM SNAP führten zu einer signifikanten Hemmung der spontanen MCP-1 Synthese von 8679 pg/ml (+/-926) um 80% auf 1698 pg/ml (+/-444). Diese Inhibition konnte auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden. 2mM SNAP hemmten die spontane MCP-1-mRNA Synthese um 60% (Abbildung 28).

Die differentielle Regulation der Chemokinsynthese durch NO - Steigerung der IL8 Sekretion versus Inhibition der MCP-1 Synthese - ist somit auch in primären Alveolarepithelzellen vorhanden.

Diskussion

Leukozytenrekrutierung in den Alveolarraum bei pulmonaler Inflammation benötigt interzelluläre Kommunikation zwischen sessilen und mobilen Zellen. So wird die Migration von Granulozyten und mononukleären Phagozyten in das alveoläre Kompartiment durch die lokale Synthese chemotaktischer Faktoren und die differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen dirigiert. Am Zusammenspiel dieser Prozesse, das zur Emigration der Entzündungszellen aus dem vaskulären Kompartiment in den Alveolarraum führt, ist das pulmonale Epithel als integrale Komponente der kapillär-alveolären Barriere zentral beteiligt.

Die vorgelegte Arbeit untersucht die für den Leukozytenrekrutierungsprozess essentielle Funktion des Alveolarepithels, nach Aktivierung durch inflammatorische Stimuli spezifische chemotaktische Faktoren für Leukozyten zu sezernieren. Dazu wurden Experimente mit A549 Zellen, einer Tumorzellreihe mit funktionellen Eigenschaften von Typ II Alveolarepithelzellen, und mit primären humanen Alveolarepithelzellen (HAEpC) durchgeführt.

Inflammatorische Bedingungen wurden experimentell durch Stimulation der Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF α simuliert. Dies erfolgte vor dem Hintergrund von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die gezeigt haben, dass die direkte Stimulation von A549-Epithelzellen mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) keine IL-8 Produktion auslöst, die Stimulation mit dem Zellüberstand LPS-stimulierter Alveolarmakrophagen jedoch zur Chemokinsynthese führt, die durch neutralisierende Antikörper gegen TNF α und IL-1 β wieder aufgehoben werden konnte (26). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Alveolarmakrophagen nach Kontakt mit Pathogen-assoziierten Mustermolekülen (PAMPs) die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α sezernieren, die dann in weiteren Zellen des Alveolarraums die Synthese chemotaktischer Zytokine aktivieren können.

Wir konnten zeigen, dass rekombinantes IL-1 β und TNF α zeit- und dosisabhängig die IL-8 und MCP-1 Synthese in A549-Zellen induziert. Eine unabhängige Studie hat eine vergleichbare Kinetik der TNF α induzierten IL-8-Protein und -mRNA-Produktion in A549-Zellen über einen Zeitraum von 24h beschrieben (26).

Zentraler Befund unserer Untersuchungen war die Beobachtung, dass die Zugabe des NO-Donators SNAP die zytokininduzierte Chemokinsynthese von IL-8 und MCP-1 differentiell beeinflusst. Exogen zugeführtes NO führte unter inflammatorischen Bedingungen zu einer dosisabhängigen Steigerung der IL-8 Synthese und zu einer dosisabhängigen Hemmung der MCP-1 Synthese. Umgekehrt führte die Hemmung der endogenen NO-Produktion durch LNMMA zu einer Steigerung der MCP-1 Synthese bei gleichzeitiger Hemmung der IL-8 Synthese. Entsprechende Veränderungen ließen sich auch für die mRNA-Synthese der beiden Chemokine nachweisen. Es handelt sich hier also um Effekte, die auf Transkriptionsebene wirksam werden.

Durch selektive Radikaldonatoren und -inhibitoren wurde der Einfluss von NO, O₂⁻ und ihrem Reaktionsprodukt ONOO⁻ auf die IL-8 und MCP-1 Synthese systematisch untersucht. Exogen appliziertes NO steigert zwar unter inflammatorischen Bedingungen die IL-8 Synthese, Voraussetzung hierfür scheint jedoch die gleichzeitige Synthese von O₂⁻ und die Reaktion beider Radikale zu ONOO⁻ zu sein. Dafür spricht, dass die durch NO induzierte Steigerung der zytokininduzierten IL-8 Synthese durch den NO-Scavenger PTIO aber auch durch den ONOO⁻-Scavenger Ebselen sowie durch den O₂⁻-Scavenger DPI gehemmt wurde. Außerdem konnte durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, dass der NO-Donator SNAP nach Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF α eine gesteigerte ONOO⁻-Synthese in Alveolarepithelzellen auslöst .

Der Einfluss von Stickstoff- und Sauerstoffradikalen auf die MCP-1 Synthese zeigt ein komplexeres Muster. Während NO und ONOO⁻ die MCP-1 Synthese hemmen, steigert O₂⁻ die Synthese dieses für Monozyten spezifischen Chemotaktins. Die O₂⁻ generierenden Systeme Xanthin/Xanthin Oxidase und DMNQ führten jeweils zu einer signifikanten Steigerung der

zytokininduzierten MCP-1 Synthese. Umgekehrt führte die Hemmung der endogenen O_2^- -Produktion durch den NADPH-Oxidase-Hemmer DPI zu einer Hemmung der MCP-1 Synthese.

Neben der zytokininduzierten Chemokinsynthese verfügen Alveolarepithelzellen auch über eine konstitutive Chemokinsynthese. Es konnte gezeigt werden, dass auch hier $ONOO^-$ in die IL-8 Synthese eingreift. Die gleichzeitige Stimulation von A549 Zellen mit einem O_2^- -Donator und dem NO-Donator SNAP führte zu einer signifikanten Steigerung der IL-8 Synthese gegenüber den Einzelsubstanzen. Diese Steigerung entspricht nahezu der IL-8 Erhöhung, die durch exogen hinzugegebenes $ONOO^-$ induziert wird.

Auch für die MCP-1 Synthese konnte gezeigt werden, dass die basale Synthese durch Stickstoff- und Sauerstoffradikale in gleicher Weise beeinflusst wird, wie die inflammatorisch induzierte Chemokinproduktion. So wurde die basale MCP-1 Synthese durch die O_2^- -Donatoren DMNQ und Xanthin/Xanthin Oxidase dosisabhängig erhöht und durch NO bzw. $ONOO^-$ gehemmt.

Es gibt nur wenige Studien, die die Chemokinsynthese in primären Alveolarepithelzellen untersucht haben (49). Da permanente von Tumorzellen abgeleitete Epithelzelllinien wie A549 Unterschiede zu primären humanen Alveolarepithelzellen (HAEpC) aufweisen können, wurden die Hauptexperimente exemplarisch mit primären Epithelzellen wiederholt. Auch in HAEpC wurde die IL-8 und MCP-1 Synthese durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α stimuliert, wobei, wie in A549-Zellen, IL-1 β der stärkere Stimulus war. Analog zu den Versuchen in A549-Zellen führte exogenes NO unter inflammatorischen Bedingungen auch in primären Alveolarepithelzellen zu einer Steigerung der IL-8 Synthese und einer Hemmung der MCP-1-Produktion. Die Regulation durch Radikale scheint also in A549-Zellen und primären Epithelzellen prinzipiell gleich zu sein.

Interessanterweise produzierten HAEpC im Vergleich zu A549 Zellen basal größere Mengen MCP-1 und weniger IL-8. Die hohe basale MCP-1 Synthese

ließ sich auf Protein- und mRNA-Ebene dosisabhängig und signifikant durch exogenes NO hemmen.

Unabhängige Studien haben gezeigt, dass periphere und proximale Epithelzellen des Respirationstraktes in vivo eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) besitzen, diese aber innerhalb von 24h verlieren, wenn die Zellen aus der gewohnten Lungenumgebung entnommen und in vitro kultiviert werden (24, 50). Eine geringere oder sogar fehlende Aktivität der induzierbaren NO-Synthase könnte durch ein Überwiegen der O_2^- Radikale die hohe MCP-1 Synthese bedingen, und gleichzeitig der Grund für die im Vergleich zu A549 Epithelzellen niedrige IL-8-Produktion in HAEpC sein.

Unter den Radikalen ist Stickstoffmonoxid (NO) das am besten untersuchte und charakterisierte Mediatormolekül. Wie schon in der Einleitung erwähnt, weiß man, dass in vivo drei Reaktionen des NO Moleküls dominieren:

1. Die Aktivierung der Guanylatcyclase (cGMP Bildung) - verantwortlich für cGMP-abhängige Signaltransduktion
2. Die Destruktion durch Oxyhämoglobin
3. Die Transformation zu $ONOO^-$ durch Reaktion mit O_2^-

In Vorversuchen zeigte Bromo-cGMP, ein zellpermeables, stabiles cGMP-Analogon, keinen Einfluss auf die basale oder die zytokininduzierte IL-8 und MCP-1 Synthese in A549 Epithelzellen. Dies wurde in unabhängigen Studien bestätigt: so blieb die Erhöhung der endothelialen cGMP-Konzentration durch Zugabe eines cGMP-Analogon ohne Effekt auf die MCP-1-mRNA-Expression in Endothelzellen (10). Auch die NO-induzierte IL-8-mRNA-Expression in Neutrophilen erwies sich als cGMP unabhängig (51).

Die Destruktion von NO durch Oxyhämoglobin konnte nicht im Detail analysiert werden, da Hämoglobin nicht nur als NO-Scavenger sondern auch als O_2^- -Donator wirkt. Dementsprechend ließen sich in Vorversuchen dosisabhängig sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte von Hämoglobin auf die Chemokinsynthese nachweisen.

Demgegenüber scheint die Reaktion von NO zu Sekundärradikalen für die differentiellen Effekte auf die Chemokinsekretion entscheidend zu sein.

Der von uns angewendete Nachweis von ONOO⁻ durch die Oxidation von DHR 123 zu Rhodamin gilt als spezifisch und sensitiv (21, 52). Unabhängige Studien haben gezeigt, dass weder NO noch O₂⁻ zu einer Oxidation von DHR 123 führen (21, 52, 53). Analog zu unseren Ergebnissen wurde mit dieser Methode gezeigt, dass LPS in humanen Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten eine dosisabhängige Peroxynitrit-Produktion induziert, die durch den NO-Synthase-Hemmer L-NAME inhibiert wird (21).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Radikale NO, O₂⁻ und ihr Reaktionsprodukt ONOO⁻ auf komplexe Weise in die Regulation der IL-8 und MCP-1 Genexpression eingreifen. Chemokingenexpression wird hauptsächlich auf Ebene der Transkription reguliert (4, 54-57), es wurden aber auch posttranskriptionelle Mechanismen beschrieben (58, 59). Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass die differentielle Regulation der IL-8 bzw. MCP-1 Synthese durch Radikale in A549 und primären pulmonalen Epithelzellen auf der Transkriptionsebene wirksam wird. Die transkriptionelle Regulation im Zellkern wird durch eine Klasse von Proteinen vermittelt, die man als Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Sie regulieren durch spezifische Bindung an DNA-Sequenzen die Genaktivität.

Reversible Phosphorylierungsreaktionen wurden lange Zeit als alleinige chemische Schlüsselreaktion der Signaltransduktion zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren angesehen. Neuere Befunde zeigen jedoch, dass auch Oxidations-Redox-Reaktionen eine zentrale Rolle für die Signaltransduktion und Genregulation haben können (60-63).

Die Promotorregionen des IL-8 und MCP-1 Gens enthalten Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, unter anderem den nukleären Faktor-κB (NF-κB) und das Aktivierungs Protein-1 (AP-1) (4, 64-66). NF-κB und AP-1 sind induzierbare, redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, die die differentielle Expression vieler Gene regulieren, deren Produkte in Entzündungsreaktionen involviert sind. Dazu gehören z.B. Zytokine und Adhäsionsmoleküle. Dabei zeigen sich sowohl stimulus- als auch

zellspezifische Unterschiede. Der Austausch von Reduktionsäquivalenten scheint jedoch eine integrale Komponente der Signaltransduktion zu sein, wobei die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung bzw. Deaktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Radikale führen bislang nur unzureichend untersucht sind.

Entzündungsvorgänge führen zur Radikalbildung in den Zellen des Alveolarraums. Auch pulmonales Epithel produziert Sauerstoff- und Stickstoffradikale unter inflammatorischen Bedingungen (16-18, 60, 67). Durch ihren Einfluss auf die Chemokinsynthese haben Verschiebungen des Gleichgewichts zwischen den Radikalen möglicherweise erhebliche biologische Konsequenzen.

Studien der letzten Jahre haben ergeben, dass hohe intraalveoläre MCP-1-Konzentrationen zu einem Einstrom von Monozyten aus dem vaskulären Kompartiment in den Alveolarraum führen (13, 68). In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass intratracheal appliziertes MCP-1 die Migration von Monozyten durch die alveolokapilläre Barriere in den Alveolarraum induzierte (69, 70). Bei Patienten mit ARDS verschiedenster Ursache wurden deutlich erhöhte MCP-1 Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit gemessen. Die Höhe der MCP-1 Konzentration korrelierte mit dem Schweregrad des Lungenversagens (13, 71). Für IL-8 wurde gezeigt, dass die Höhe der IL-8-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von Risiko-Patienten einen prognostischen Faktor für die Entwicklung eines ARDS darstellt (12, 72). Die IL-8-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von Patienten mit manifestem ARDS ist deutlich und anhaltend erhöht, korreliert jedoch nicht mit der Prognose (11, 71).

Der differentielle Einfluss von Stickstoff- und Sauerstoffmolekülen auf die Chemokinsynthese scheint unter anderem von Interesse zu sein vor dem Hintergrund der therapeutischen NO-Applikation in Verbindung mit hohen Sauerstoffgaben beim akuten Lungenversagen.

Therapeutisches Ziel des Einsatzes von inhalativem NO ist es, die pulmonale Perfusion selektiv zu beeinflussen und die Störung der hypoxischen

Vasokonstriktion beim akuten Lungenversagen zu überwinden. Klinische Studien zum ARDS demonstrieren, dass die Kombination von inhaliertem NO und inhaliertem Sauerstoff und zusätzliche Maßnahmen wie Bauchlagerung und PEEP-Beatmung die Oxygenierung verbessern (73-75). Eine Steigerung der Überlebensrate durch diese Maßnahmen konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise führt die NO-Inhalation bei Patienten mit ARDS zu einer Reduktion der IL-8-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von ARDS-Patienten (76). Es fehlen jedoch größere Studien, die den Einfluss der inhalativen Sauerstoff- und NO-Therapie auf die Chemokinsynthese untersuchen.

ZUSAMMENFASSUNG

Alveolarepithelzellen beteiligen sich durch Sekretion von Chemokinen und Expression von Adhäsionsmolekülen aktiv am Prozess der Leukozytenrekrutierung in den Alveolarraum. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Radikale Stickstoffmonoxid (NO), Superoxid (O_2^-) und ihrem Reaktionsprodukt Peroxynitrit ($ONOO^-$) auf die spontane sowie auf die durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α induzierte Synthese der Chemokine IL-8/CXCL8 und MCP-1/CCL2 in Alveolarepithelzellen untersucht. Dazu wurden die Stickstoff- und Sauerstoffradikalkonzentrationen durch geeignete Kulturbedingungen (NO/ O_2^- -Donatoren, Radikal-Scavenger, NOS/NADPH-Oxidase-Inhibitoren) gezielt verändert und in den Überständen stimulierter und unstimulierter Alveolarepithelzellen die IL-8- und MCP-1-Proteinkonzentrationen mittels ELISA sowie die mRNA-Konzentrationen dieser Chemokine mittels Ribonuklease Protection Assay (RPA) quantifiziert. Neben der Epithelzellreihe A549 mit den Eigenschaften von Typ II Alveolarepithelzellen wurden auch primär isolierte humane Alveolarepithelzellen aus tumorfreiem Pneumektomiegewebe untersucht. Sowohl in A549- als auch in primären Alveolarepithelzellen wurde die Chemokinsynthese durch Stickstoff- und Sauerstoffradikale differentiell moduliert: Die IL-8 Synthese wurde durch exogen appliziertes NO dosisabhängig gesteigert, die Synthese von MCP-1 hingegen inhibiert. Umgekehrt reduzierte die Inhibition der endogenen NO-Produktion durch den NO-Synthase Inhibitor L-NMMA die inflammatorisch getriggerte IL-8 Synthese und steigerte die MCP-1 Synthese. Die Steigerung der IL-8 Produktion durch NO wurde nur bei gleichzeitiger Synthese von O_2^- und dadurch möglicher Transformation von NO zu $ONOO^-$ beobachtet. Peroxynitrit vermittelte auch die Inhibition der MCP-1 Synthese, die isolierte Erhöhung des Superoxidangebotes induzierte hingegen eine Steigerung der MCP-Produktion. Die differentielle Regulation der Chemokinsynthese in A549 und primären humanen Alveolarepithelzellen durch NO und O_2^- ließ sich auch auf transkriptioneller Ebene nachweisen.

Zusammenfassung

Unsere in vitro Ergebnisse zeigen, dass im inflammatorischen Milieu Stickstoff- und Sauerstoffradikale die Rekrutierung verschiedener Leukozytenpopulationen durch differentielle Beeinflussung der Chemokinsynthese modulieren können. Dies scheint von besonderem Interesse vor dem Hintergrund der therapeutischen NO-Applikation in Verbindung mit hohen Sauerstoffgaben beim akuten Lungenversagen.

ANHANG

Zusammensetzung von Pufferlösungen und Medien

Dulbecos Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS^{-/-}) 0.2g/l KCl, 0.2g/l KH₂PO₄, 8g/l NaCl, 0.09g/l Na₂HPO₄ · 7H₂O

ELISA

ELISA-Wachpuffer PBS mit 0.05% Polysorbinat (Tween)

ELISA-Blockierungslösung 1% BSA, 5% Saccharose in PBS

Diluent 0.1% BSA und 0.05% Tween in Tris-NaCl, pH 7.3

Substratpuffer 8.2g Na-Acetat-Trihydrat und 6.9g NaH₂PO₄ · H₂O in 1l dH₂O gelöst, pH 4.2 und 0.03% H₂O₂

Epithelzellisolation

Stammlösung 7.96g/l NaCl, 0.4g/l KCl, 1.11g/l Glucose, 0.46g/l Na₂HPO₄, 2.38g/l HEPES, 2mM CaCl₂ · 2H₂O, 1.3mM MgSO₄ · 7H₂O, pH 7.2

Lösung I 0.5l Stammlösung und 1.25g Dispase II

Lösung II 0.5l Stammlösung und 5mg DNase

RPA

RLT-Puffer 50mM Tris-Cl, pH 8.0, 140mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5% NP-40

Bezugsquellen und Materialien

ABTS	Böhringer Mannheim, D-Mannheim
Aminosäuren	Gibco, D-Karlsruhe
Amphotericin B	Sqibb-von Heyden, D-München
Aqua destillata	Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen
Avidin-Horse-Radish-Peroxydase	Zymed, San Francisco, USA
Biotinylierter anti-humaner IL-8	R&D Systems
Antikörper	
Bromo-cGMP	Calbiochem, D-Bad Soden
CD45 Dynabeads®	Dynal, Oslo, Norwegen
Collagen Typ IV	Sigma, D-München
DHR	Calbiochem, D-Bad Soden
Dispase II	Böhringer Mannheim, D-Mannheim
Dithiotreitol (DTT)	Gibco, D-Karlsruhe
DMNQ	Alexis, D-Grünberg
DPI	Alexis, D-Grünberg
EDTA	Merck, D-Darmstadt
Einwegmaterial aus Polypropylen, Polyethylen, Polystyrol	Eppendorf, D-Hamburg, Falcon, D- Heidelberg
Ebselen	Calbiochem, D-Bad Soden
ELISA Platten	Nunc-Immuno Plate Maxisorb
Ethanol 100%	Riedel-deHaen, D-Seelze
FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco, D-Karlsruhe
Glucose 100%	Gibco, D-Karlsruhe
HÄM'S F12 Nutrient Mixture	Gibco, D-Karlsruhe
HÄMS F12 ohne Valin	Gibco, D-Karlsruhe
HEA 125	Camon, D-Wiesbaden
Hemoglobin	Calbiochem, D-Bad Soden
HSA (Humanes Serumalbumin)	Sigma, D-München
IL-1 β	R&D Systems, D-Wiesbaden
IL-8-ELISA-Kit	R&D Systems, D-Wiesbaden
Kaliumcarbonat	Sigma, D-München

Anhang

LNMMMA	Calbiochem, D-Bad Soden
Magnesiumchlorid	Merck, D-Darmstadt
Monoklonaler anti-humaner IL-8 Antikörper	R&D Systems
Natriumchlorid 0,9%	Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen,
ONOO ⁻	Calbiochem, D-Bad Soden
PBS ^{-/-} 10%	PAA, D-Cölbe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, D-Heidelberg
Percoll [®] Dichtezentrifugationsmedium	Sigma, D-München
PTIO	Calbiochem, D-Bad Soden
RiboQuant [®] Multi-Probe RNase	Pharmingen, D- Hamburg
Protection Assay	
Rneasy-Kit	Qiagen GMBH, D-Hilden
RPMI 1640 ohne L-Glutamine	Gibco, D-Karlsruhe
Salmonella abortus LPS	Sigma, D-München
SNAP	Calbiochem, D-Bad Soden
TNF α	R&D Systems, D-Wiesbaden
Tween-20 (Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate)	Sigma, D-München
[α - ³² P]UTP	Amersham
Xanthin/Xanthin Oxidase	SIGMA, D-München

Herstellernachweis von Geräten

Brutschrank	Heraeus Instruments, D-Hanau
ELISA-Plattenphotometer	Molecular Devices, D-Ismaning
ELISA-Washer	Tecan, D-Crailsheim
FACStar ^{PLUS} Durchflußzytometer	Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien, USA
FACStarPLUS, Durchflußzytometer	Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien, USA
Lichtmikroskop	Leica, D-Wetzlar
PCLYSIS Software	Becton Dickinson, D-Heidelberg

Anhang

pH-Meter	Scott, D-Hofheim
Photometer	Perkin Elmer, D-Weiterstadt
Pipetten	Eppendorf, D-Hamburg; Abimed, D-Langenfeld
Rüttelgerät	Janke & Kunkel, D-Staufen
Zentrifugen	Heraeus, D-Hanau

LITERATURVERZEICHNIS

1. **Liebler J. M., S. L. Kunkel, M. D. Burdick, T. J. Standiford, M. W. Rolfe, R.M. Strieter.** 1994. Production of IL-8 and Monocyte chemotactic peptide-1 by peripheral blood monocytes. Disparate responses to Phytohemagglutinin and Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 152(1):241-49
2. **Brown Z., M. E. Gerritson, W. W. Carley, R. M. Strieter, S. L. Kunkel, J. Westwick.** 1994. Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma. *Am. J. Pathol.* 145(4):913-21
3. **Watson M. L., S. P. Grix, N. J. Jordan, G. A. Place, S. Dod, J. Leithead, C. T. Poll, T. Yoshimura, J. Westwick.** 1998. Interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 production by cultured human airway smooth muscle cells. *Cytokine* 10(5):346-52
4. **Roebuck K. A., L. R. Carpenter, V. Lakshminarayanan, S. M. Page, J.N. Moy, L. L. Thomas.** 1999. Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- κ B. *J. Leukoc. Biol.* 65:291-98
5. **Barret J. R.** 1997. Chemokines. *Blood* 90(3):909-28
6. **Baggiolini M., B. Dewald, B. Moser.** 1997. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15:675-705
7. **De Forge L. E., J. S. Kenney, M. L. Jones, J. S. Warren, D. G. Remick.** 1992. Biphasic Production of IL-8 in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood. *J. Immunol.* 148:2133-41
8. **Harada A., N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida, K. Matsushima.** 1994. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 56:559-64
9. **Baggiolini M., A. Walz, S. L. Kunkel.** 1989. Neutrophil-activating peptide/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84:1045-49
10. **Zeiber A. M., B. Fisslthaler, B. Schrey-Utz, R. Busse.** 1995. Nitric Oxide Modulates the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Cultured Human Endothelial Cells. *Circ. Res.* 76(6):980-86
11. **Jorens P. G., J. Van Damme, W- De Backer, L. Bossaert, R. F. De Jong, A. G. Herman, M. Rampart.** 1992. Interleukin 8 (IL-8) in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS) and patients at risk for ARDS. *Cytokine* 4:592-97
12. **Donnelly S. C., R. M. Strieter, S. L. Kunkel, A. Walz, C. R. Robertson, D. C. Carter, I. S. Grant, A. J. Pollock, C. Haslett.** 1993. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient group. *Lancet* 341:643-47
13. **Rosseau S., P. Hammerl, U. Maus, H.D. Walmrath, H. Schütte, F. Grimminger, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2000. Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279:L25-35

14. **Schutte H., J. Lohmeyer, S. Rosseau, S. Ziegler, C. Siebert, H. Kielisch, H. Pralle, F. Grimminger, H. Morr, W. Seeger.** 1996. Bronchoalveolar and systemic cytokine profile in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. *Eur. Respir. J.* 9(9);1858-67
15. **Takeuchi O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, S. Akira.** 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169:10-14
16. **Fujishima S., A. R. Hoffman, T. Vu, K.J. Kim, H. Zheng, D. Daniel, Y. Kim, E.F. Wallace, J.W. Larrick, T.A. Raffin.** 1993. Regulation of neutrophil interleukin-8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1-beta. *J. Cell. Physiol.* 154(3);478-85
17. **Remick D.G., L. Villarete.** 1996. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. *J. Leukoc. Biol.* 59(4):471-75
18. **Meier B., H. H. Radeke, S. Selle, M. Younes, H. Sies, K. Resch, G. G. Habermehl.** 1989. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. J.* 263:539-45
19. **Matsubara T., M. Ziff.** 1994. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J. Immunol.* 137:3295-98
20. **Heiman A., D. Allen-Gipson.** 2000. Cytokines potentiate human eosinophil superoxide generation in the presence of N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester. *Int. J. Immunopharmacol.* 22(2);171-81
21. **Gagnon C., F. Leblond, J. Filep.** 1998. Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes and lymphocytes challenged with lipopolysaccharide. *FEBS Lett.* 431;107-10
22. **Gaston B., J. M. Drazen, J. Loscalzo, J. S. Stamler.** 1994. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149:538-51
23. **Koichiro A., C B. Chee, B. Gaston, C. M. Lilly, C. Gerard, J. M. Drazen, J. S. Stamler.** 1994. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:10089-93
24. **Guo F. H., H. R. De Raeve, T. W. Rice, D. J. Stuehr, F. B. Thunnissen, S. C. Erzurum.** 1995. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(17):7809-13
25. **De Forge L. E., A. M. Preston, E. Takeuchi, J. Kenney, L. A. Boxer, D. G. Remick.** 1993. Regulation of Interleukin 8 Gene Expression by Oxidant Stress. *J. Biol. Chem.* 268:25568-76
26. **Standiford T. J., S. L. Kunkel, M. A. Basha, S. W. Chensue, J. P. Lynch III, G. B. Towes, J. Westwick, R. M. Strieter.** 1990. Interleukin-8 Gene Expression by a Pulmonary Epithelial Cell Line. A Model for Cytokine Networks in the Lung. *J. Clin. Invest.* 86:1945-53
27. **Andrew P. J., H. Harant, I. J. Lindley.** 1995. Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transkriptional level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:949-56
28. **Villarete L. H., D.G. Remick.** 1995. Nitric oxide regulation of IL- 8 expression in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211;671-76
29. **Beckmann J. S., W. H. Koppenhol.** 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271(5):C1424-37

30. **Moncada S., A. Higgs.** 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329:2002-12.
31. **Asano K., C. B. Chee, B. Gaston, C. M. Lilly, C. Gerard, J. M. Drazen, J. S. Stamler.** 1994. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:10089-93
32. **Imlay J. A., I. Fridovich.** 1991. Assay of metabolic superoxide production in Escheria coli. *J. Biol. Chem.* 266:6957-65
33. **Muzaffar S., J. Y. Jeremy, G. D. Angelini, K. Stuart-Smith, N. Shukla.** 2003. Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. *Thorax* 58(7); 598-604
34. **Freeman B. A., P. C. Panus, S. Matalon, B. J. Buckley, R.R. Baker.** 1993. Oxidant injury to the alveolar epithelium: biochemical and pharmakologic studies. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 54; 1-39
35. **Huie R. E., S. Padamja.** 1993. The reaction rate of nitric oxide with superoxide. *Free Radical Res. Commun.* 18:195-99
36. **Cudd A., I. Fridovich.** 1982. Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 257:11443-47
37. **Wizemann T. M., C. R. Gardner, J. D. Laskin, S. Quinones, S. K. Durham, N. L. Goller, S. T. Ohnishi, D. L. Laskin.** 1994. Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 56:759-64
38. **Szabó C., A. L. Salzmann, H. Ischiropoulos.** 1995. Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Lett.* 363:235-38
39. **Reiter C. D., R. J. Teng, J. S. Beckman.** 2000. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 275;32460-66
40. **Kooy N. W., J. A. Royall, Y. Z. Ye, D. R. Kelly, J. S. Beckman.** 1995. Evidence for in vivo peroxynitrite production in acute human lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:1250-54
41. **Haddad I. Y., G. Pataki, P. Hu, C. Galliani, J. S. Beckmann, S. Matalon.** 1994. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J. Clin. Invest.* 94:2407-13
42. **Watson M. I., G. P. Lewis, J.. Westwick.** 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. cancer* 17:62
43. **Cunningham A.C., J. A. Kirby.** 1995. Regulation and function of adhesion molecule expression by human alveolar epithelial cells. *Immunology* 86:279-86
44. **Cunningham A. C., D. S. Milne, J. Wilkes, J. H. Dark, T. D. Tetley, J. A. Kirby.** 1994. Constitutive expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelial cells (type II pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findings. *J. Cell. Sci.* 107:443-49
45. **Dobbs L. G.** 1990. Isolation and culture of alveolar tpe II cells. *Am. J. Physiol.* 258;L134-47

46. **Papadopoulos T., L. Ionescu, J. Dämmrich, H. Toomes, H. Kl. Müller-Hermelink.** 1990. Type I and type IV collagen promote adherence and spreading of human type II pneumocytes in vitro. *Lab. Invest.* 62;562-69
47. **Miller B. A., R. E. Chapin, K. E. Pinkerton, L. B. Gilmore, R. R. Maronpot, G. E. Hook.** 1987. Quantitation of silica-induced type II cell hyperplasia by using alkaline phosphatase histochemistry in glycol methacrylate embedded lung. *Exp. Lung Res.* 12:135-48
48. **Edelson J. D., J. M. Shannon, R. J. Mason.** 1988. Alkaline phosphatase: a marker of alveolar type II cell differentiation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:1268-75
49. **Kwon O. J., B. T. Au, P. D. Collins, I. M. Adcock, J. C. Mak, R. R. Robbins, K. F. Chung, P.J. Barnes.** 1994. Tumor necrosis factor-induced interleukin-8 expression in cultured human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 267:L398-405
50. **Pechkovsky D.V., G. Zissel. T. Goldman, M. Einhaus, H. Taube Magnussen, M. Schlaad, J. Muller-Quernheim.** 2002. Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282;L684-92
51. **Corriveau C.C., P.J. Madara, A.L. Van Dervort, M.M. Tropera, R.A. Wesley, R. L. Danner.** 1998. Effects of nitric oxide on chemotaxis and endotoxin-induced interleukin-8 production in human neutrophils. *J. Infect. Dis.* 177;116-26
52. **Szabo C., A. Salzman, H. Ischiropoulos.** 1995. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett.*25;372:229-32
53. **Kooy N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, J. S. Beckman.** 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 16;149-56
54. **Kunsch C., C. A. Rosen.** 1993. NF-kappaB subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol. Cell Biol.* 13:6137-46
55. **Kunsch C., R. K. Lang, C. A. Rosen, M. F. Shannon.** 1994. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF- κ B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J. Immunol.*153:153-64
56. **Ping D., P. L. Jones, J. M. Boss.** 1996. TNF regulates the in vivo occupancy of both distal and proximal regulatory regions of the MCP-1/Je gene. *Immunity* 4:455-69
57. **Martin T., P. M. Cardarelli, G. C. Parry, K. A. Felts, R. R. Cobb.**1997. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative expression of NF-kappaB and AP-1. *Eur. J. Immunol.* 27:1091-97
58. **Roger T., T. Out, N. Mukaida, K. Matsushima, H. Jansen, R. Lutter.** 1998. Enhanced AP-1 and NF-kappaB activities and stability of IL-8 transcripts are implicated in IL-8 m-RNA superinduction in lung epithelial H292 cells. *Biochem. J.* 330:429-35
59. **Villarete L. H., D. G. Remick.** 1996. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interleukin-8. *Am. J. Pathol.* 149:1685-93
60. **Lakshminarayanan V., D. W. Benoi, H. R. H. Costa, K. A. Roebuck.** 1997. Differential Regulation of Interleukin-8 and Intercellular Adhesion Molecule-1 by H₂O₂ and Tumor Necrosis Factor- α in Endothelial and Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 272;32910-18

61. **Janssen-Heininger Y. M., I. Macara, B. T. Mossman.** 1999. Cooperativity between Oxidants and Tumor Necrosis Factor in the Activation of Nuclear Factor (NF)- κ B. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20(5)942-52
62. **Suzuki Y. J., H. J. Forman, A. Sevanian.** 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 22:269-85
63. **Schreckk R., K. Albermann, P. A. Baeuerle.** 1992. Nuclear factor κ B: An oxidative-stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic. Res. Commun.* 17:221-37
64. **Wung B. S., J. J. Cheng, H. J. Hsieh, Y. J. Shyy, D. L. Wang.** 1997. Cyclic strain-induced monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells involves reactive oxygen species activation of activator protein 1. *Circ. Res.* 81(1):1
65. **Brasier A.R., M. Jamaluddin, A. A. Casola, W. Duan, O. Shen, R. P. Garafalo.** 1998. A promotor recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappa B1, and c-Rel transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273; 3551-3556
66. **Zouki C., L. Jozef, S. Quellet, Y. Paquette, J. G. Filep.** 2001. Peroxynitrite mediates cytokine induced IL-8 gene expression and production by human leucozytes. *J. Leukoc. Biol.* 69;815-824.
67. **Lang J. D., P. J. McArdle, P. J. O'Reilly, S. Matalon.** 2002. Oxidant-Antioxidant Balance in Acute Lung Injury. *Chest* 122; 314-320
68. **Rosseau S, J- Selhorst, K. Wiechmann, Katja Leissner, U. Maus, K. Mayer, F. Grimminger, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2000. Monocyte Migration through the Alveolar Epithelial Barrier: Adhesion Molecule Mechanisms and Impact of Chemokines. *J. Immunol.* 164;427-35
69. **Maus U., J. Huwe, L. Ermert, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2002. Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165; 95-1100
70. **Maus U., S. Herold, H. Muth, R. Maus, L. Ermert, N. Weissmann, S. Rosseau, W. Seeger, F. Grimminger, J. Lohmeyer.** 2001. Monocyte recruited into the alveolar space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol* 208;58-68
71. **Goodman R.B., R.M. Strieter, D.P. Martin, K. P. Martin, K. P. Steinberg, J. A. Milberg, R. J. Maunder, S. L. Kunkel, A. Walz, L: D. Hudson, T. R. Martin.** 1996. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154; 602-11
72. **Hirany N., F. Antoniecilli, R. M. Striter, M. S. Wiesener, P. J. Ratcliffe, C. Haslett, S. C. Donnelly.** 2001. The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human makrophages - a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome. *Mol. Med.* 7; 685-97
73. **Jean D., B. Maitre, J. Tankovic, M. Meignan, S. Adnot, C. Brun-Buisson, A. Harf, C. Delcaux.** 2002. Beneficial effects of nitric oxide inhalation on pulmonary clearance. *Crit. Care Med.* 30;442-47

74. **Germann P., G. Poschel, C. Leitner, G. Urak, B. Frayniak, G. Roder, A. Kaider, R. Sladen.** 1998. Additive effect of nitric oxide inhalation on the oxygenation benefit of the prone position in the adult respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 89; 1401-6
75. **Kaisers U., T. Busch, M. Deja, B. Donaubaueer, K. J. Falke.** 2003. Selective pulmonary vasodilation in acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 31;337-42
76. **Chollet-Martin S., C. Gatecel, N. Kermarrec, M. A. Gougerot-Pocidallo, D. M. Payen.** 1996. Alveolar neutrophil functions and cytokine levels in patients with the adult respiratory distress syndrome during nitric oxide inhalation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153;949-956

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lohmeyer und Frau Dr. Rosseau für die sehr gute fachliche Betreuung und die ständige Bereitschaft zur Diskussion. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Seeger und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung von Geräten, Räumlichkeiten, Materialien und Substanzen.

Ebenso danken möchte ich Frau Moderer (MTA) und Frau Maus (MTA), die durch ihre routinierte technische Hilfe beim Durchführen der Experimente einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieses Projektes leisteten.

Schließlich sei den Kollegen aus der Chirurgie und der Pathologie gedankt, für die Bereitstellung von tumorfreiem Pneumektomiegewebe.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bayer
Vornamen	Friederike Christiane
Geburtsdatum	28.01.1975
Geburtsort	Gießen
Adresse	Ebelstraße 27 35392 Gießen
Telefon	0641-2503765

Schulbildung

1981 bis 1985	Goethe-Schule-Buseck
1985 bis 1991	Gesamtschule Busecker-Tal
1991 bis 1994	Gesamtschule Gießen Ost
Abschluß	Abitur

Au-Pair-Zeit

Juli 1994 bis August 1995	Au-Pair in Winchester, Großbritannien
---------------------------	---------------------------------------

Hochschulstudium

seit Oktober 1995/96	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
August 1997	Ärztliche Vorprüfung
August 1998	I. Staatsexamen
April 2001	II. Staatsexamen
Mai 2002	III. Staatsexamen

Auslandssemester

WS 98/99	Auslandssemester an der Queens Medical School, University of Nottingham, Nottingham, Großbritannien
----------	---

Famulaturen

Feb. 98 bis April 98	Department of Medicine, West Wales General Hospital, Camarthen, Wales, Großbritannien
----------------------	---

Lebenslauf

- März 1999 Department of Paediatrics, City Hospital, Nottingham, Großbritannien
- August 1999 Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Erlangen-Nürnberg
(Leitung: Prof. Dr. med. H. Iro)
- September 1999 Praxis Dr. med. J. Kellner, Dinslaken
(Facharzt für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde)

Praktisches Jahr

- April 2001 bis Juni 2001 Abteilung für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Leitung: Prof. Dr. med. W. Seeger)
- Juni 2001 bis August 2001 Department of Medicine, Toronto Western Hospital, Toronto, Canada
(Leitung: Dr. D. Panisko)
- August 2001 bis Dezember 2001 I. Sebeszeti Klinika (I. Chirurgische Klinik) der Semmelweis-Universität Budapest, Ungarn
(Leitung: Dr. med. L. Flautner)
- Dezember 2001 bis März 2002 Abteilung für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Leitung: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann)

Ärztin im Praktikum

- Juni 2002 bis Dezember 2003 Ärztin im Praktikum am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger)

Dissertation

- April 1999-März 2001 Experimenteller Teil der Dissertation mit dem Thema: Differentielle Regulation der Chemokinsynthese in Alveolarepithelzellen durch Stickstoff- und Sauerstoffradikale
- November 2000 Vorstellung bei der Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pulmonologie, Charité, Berlin