**Aus dem Institut für Immunologie**

**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer**

**des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg**

# Funktionelle Charakterisierung von BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Ratten

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin**

**dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg**

**vorgelegt von**

**Christoph Wedding, geb. Ölker aus Oberhausen**

**Marburg, 2008**

Angenommen vom

Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
am: 17.04.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. M. Rothmund |
| Referent: | PD Dr. Holger Garn |
| 1. Korreferent: | Prof. Dr. Dr. R. Bals |

# INHALTSVERZEICHNIS


**1 EINLEITUNG ..... - 5 -**

**1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ..... - 5 -**
1.1.1 Definition und Epidemiologie ..... - 5 -
1.1.2 Risikofaktoren und Prävention ..... - 7 -
1.1.3 Akute Exazerbation der COPD ..... - 10 -
1.1.4 Tiermodelle der COPD ..... - 11 -

**1.2 Makrophagen ..... - 17 -**
1.2.1 Makrophagen in der COPD ..... - 17 -
1.2.2 Der Radikalstoffwechsel von Makrophagen ..... - 19 -
1.2.3 Alveolarmakrophagen und Surfactant Protein-A ..... - 21 -

**1.3 Zielsetzung ..... - 24 -**

**2 MATERIAL UND METHODEN ..... - 26 -**

**2.1 Materialien ..... - 26 -**
2.1.1 Kits, Chemikalien, Primer und Verbrauchsmaterial ..... - 26 -

**2.2 Methoden ..... - 27 -**
2.2.1 Tiermodell und Gewinnung der BAL-Zellen ..... - 27 -
2.2.1.1 Versuchsbedingungen des Tiermodells ..... - 27 -
2.2.1.2 Gewinnung der BAL ..... - 27 -
2.2.1.3 Waschschritte und Erytrocyten-Lyse ..... - 28 -
2.2.1.4 Zellzählung ..... - 28 -
2.2.2 SP-A Wirkung auf Alveolarmakrophagen ..... - 30 -
2.2.2.1 24 h-Zellkultur ..... - 30 -
2.2.2.2 Zytokin-Bestimmung mittels ELISA ..... - 32 -
2.2.3 Oxidativer/Antioxidativer Metabolismus von Alveolarmakrophagen ..... - 35 -
2.2.3.1 Analysen der Superoxidradikalfreisetzung durch Alveolarmakrophagen ..... - 35 -
2.2.3.2 SOD-Funktionsassay ..... - 37 -
2.2.3.3 GPx-Funktionsassay ..... - 38 -
2.2.3.4 LDH-Zytotoxizitätsassay ..... - 39 -
2.2.3.5 Protein-Assay ..... - 40 -
2.2.3.6 RNA-Präperation ..... - 41 -
2.2.3.7 cDNA-Synthese ..... - 42 -
2.2.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ..... - 43 -

# 3 ERGEBNISSE ..... - 48 -

**3.1 Radikalfreisetzung von BAL-Zellen ..... - 48 -**

3.1.1 Superoxid-Produktion von BAL-Zellen nach $NO_2$-Exposition ..... - 49 -

3.1.3 Auswirkungen auf Zytotoxizität ..... - 56 -

3.1.4 mRNA-Expression von antioxidativen Enzymen ..... - 57 -

3.1.5 Enzymaktivitäten der Superoxiddismutase und Gluthation-Peroxidase ..... - 61 -

**3.2 SP-A-Wirkung auf BAL-Zellen ..... - 63 -**

3.2.1 Einfluss von SP-A auf die LPS-induzierte Freisetzung von TNFα ..... - 63 -

3.2.2 Einfluss von SP-A auf die LPS-induzierte Freisetzung von IL-10 ..... - 67 -

3.2.3 Einfluss von SP-A auf die LPS-induzierte Freisetzung von MCP-1 ..... - 70 -

# 4 DISKUSSION ..... - 74 -

**4.1 Radikalstoffwechsel von BAL-Zellen ..... - 74 -**

**4.2 Einfluss von SP-A auf die Zytokinfreisezung von BAL-Zellen ..... - 82 -**

# 5 ZUSAMMENFASSUNG ..... - 90 -

# 6 SUMMARY ..... - 92 -

# 7 LITERATURVERZEICHNIS ALPHABETISCH ..... - 94 -

# ANHANG ..... - 106 -

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Unter dem Begriff „Chronisch obstruktive Lungenerkrankung“ (engl.: chronic obstructive lung disease, COPD) werden eine Reihe von Atemwegserkrankungen zusammengefasst. Definiert wird die COPD von der „globalen Initiative für COPD“ (engl.: global initiative for chronic obstructive lung diseases, GOLD) als eine Erkrankung, die durch eine nicht vollständig reversible Atemflussbegrenzung charakterisiert ist, wobei diese chronisch progredient verläuft und mit einer abnormen Entzündungsantwort der Lunge auf schädliche Partikel oder Gase assoziiert ist (Pauwels et al. 2001).

Klinisch umfaßt die COPD die Ausbildung eines Emphysems und einer chronischen Bronchitis, wobei in den meisten Fällen diese beiden Prozesse parallel auftreten (Honig et al. 2001). Das Emphsem wird hierbei anatomisch als permanente und destruktive Vergrößerung der Lufträume distal der terminalen Bronchiolen definiert, wohingegen die Definition der chronischen Bronchitis eine klinische ist. Man versteht unter dieser Erkrankung das Vorhandensein von produktivem Husten, der nicht auf andere Ursachen zurückzuführen ist und über mindestens drei Monate in zwei aufeinanderfolgen Jahren auftritt.

Die COPD ist für den betroffenen Patienten eine sehr ernsthafte Erkrankung mit eingeschränkter Lebenserwartung und herabgesetzter Lebensqualität. Doch welche Wertigkeit hat diese Krankheit, wenn man den Blick vom Einzelfall auf die globale Bedeutung richtet? Wie häufig ist sie im Vergleich zu anderen Erkrankungen und welche Auswirkungen ergeben sich hieraus? Gibt es wegen der im Gesundheitswesen anfallenden hohen Kosten und aufgrund des Verlustes von Arbeitskraft auch Konsequenzen für die gesamte Gesellschaft? Wie kann man in diesen Prozess eingreifen und existieren Möglichkeiten, die für die Zukunft vorausgesagten Folgen der COPD durch Präventions- und Therapieverbesserungen abzumildern?

Die sogenannte „global burden of disease study“, wie von Lopez und Murray (1998) berichtet, hatte die Intention, eine Aussage über den Gesundheitsstatus von Populationen und die führenden Krankheitsgründe weltweit zu treffen. Hierbei versuchte man auf der Basis von objektiven epidemiologischen und demographischen

Methoden auch zukünftige Veränderungen in der Bedeutung einzelner Krankheiten zu prognostizieren, mit dem Ziel, durch frühzeitige Interventionen diese Entwicklung hin zu einer verbesserten öffentlichen Gesundheit zu führen. Hierbei ergaben sich interessante Erkenntnisse für die COPD. Bei der Messung der sogenannten „disability-adjusted life years“, definiert als Verlust eines gesunden Lebensjahres aufgrund von Behinderung oder Tod, zeigte sich, dass die COPD 1990 unter den weltweit führenden Erkrankungen auf dem zwölften Rang lag, aber für das Jahr 2020 als fünfthäufigste Erkrankung in dieser Kategorie gesehen wurde (Lopez et al., 1998). Um einen weiteren Eindruck des Stellenwertes der COPD zu bekommen, empfiehlt es sich auch, absolute Zahlen zu betrachten. In den USA litten 1996 gut 14 Millionen Menschen an einer chronischen Bronchitis, weitere 1,8 Millionen Menschen hatten ein Lungenemphysem (Adams et al. 1999). Neben der Prävalenz ist auch die Mortalität interessant, besonders wenn man die Entwicklung über die letzten Jahre verfolgt. Von gut 31 Millionen Menschen, die in den USA zwischen 1979 und 1993 verstarben, wurde bei ca. 2,5 Millionen Menschen (8,2 %) eine obstruktive Lungenerkrankung festgestellt, wobei diese bei über 1,1 Millionen Menschen als verursachende Todesursache gesehen wurde (Mannino et al., 1997). Hierbei wurde festgestellt, dass von 1979 bis 1993 die absolute Zahl der pro Jahr an einer COPD verstorbenen Männer um 51,8 %, die der verstorbenen Frauen gar um 197,2 % gestiegen ist. Ähnliche Daten fanden Lacasse et al. (1999) auch für Kanada. So war 1980 die COPD in 2,6 % der Todesfälle die verursachende Todesursache, bis 1995 stieg die Mortalität aufgrund einer COPD auf 4,1 % an, wobei dieser Anstieg auch hier v.a. durch die um 241 % angestiegene Mortalität bei Frauen verursacht wurde. In den aktuellsten Mortalitätsdaten für die USA wird die COPD für das Jahr 2001 nach Herzkrankheiten, bösartigen Tumorleiden und zerebrovaskulären Erkrankungen als die vierthäufigste Todesursache mit einer Prävalenz von 5,1 % angegeben (National Vital Statistics Reports 2003). Eine Krankheit mit diesen hohen Prävalenz- und Mortalitätsraten bekommt natürlich eine gesamtgesellschaftliche Bedeutung, wenn man bedenkt, welche immensen Kosten durch solch eine häufige Erkrankung verursacht werden. So berechneten Strassels et al. (2001) für das Jahr 1987, dass ein Patient mit COPD in den USA im Durchschnitt direkte medizinische Kosten von über 6500 US-Dollar verursacht, wovon gut 25 % direkt der chronisch obstruktiven Lungenkrankheit zugeschrieben werden konnten (>1600 US-Dollar). Für das Jahr 1987 gingen die Autoren für die USA von 12,7 Millionen Menschen mit chronischer Bronchitis und weiteren 2 Millionen Emphysematikern aus,

so dass in diesem Jahr in den Vereinigten Staaten über 18 Milliarden US-Dollar an direkten medizinischen Kosten durch die COPD entstanden. Neben den direkten Kosten fallen für die Gesellschaft aber noch weitere indirekte Kosten aufgrund verlorener Arbeitskraft an. Sin et al. (2002) konnten zeigen, dass im Vergleich zu Arbeitnehmern ohne COPD eine milde, gemäßigte oder schwere COPD mit einer jeweils vermehrten Arbeitsunfähigkeit bei betroffenen Patienten im Ausmaß von 3,4 %, 3,9 % bzw. 14,4 % assoziiert war. Dies bedeutet bei 9,4 Millionen US-Amerikanern im Arbeitsalter, die an einer COPD leiden, dass 1994 in den USA die Arbeitskraft von rund 366000 Arbeitnehmern verloren ging, was von den Autoren als ein Produktivitätsverlust von 9,9 Milliarden US-Dollar berechnet wurde.

### 1.1.2 Risikofaktoren und Prävention

Bei Kenntnis dieser Zahlen ist es natürlich von großem Interesse, ein besseres Verständnis der Ätiologie, der Pathogenese und der möglichen therapeutischen Beeinflussungsmöglichkeiten der COPD zu gewinnen, um das globale Ausmaß der Erkrankung besser eindämmen zu können. Ein Ansatz dazu untersuchte Charakteristika von Erwachsenen, die an COPD verstorben waren, um so Faktoren, die mit diesen COPD-Todesfällen assoziiert waren, aufzudecken (Meyer et al. 2002). Nicht überraschend war, dass Rauchen in Abhängigkeit von der Dosis als am stärksten assoziierter Faktor bei den COPD-Todesfällen im Vergleich zu den Untersuchungen von Verstorbenen ohne COPD in der Krankengeschichte festgestellt wurde. Als weitere Risikofaktoren wurden in dieser Studie Untergewicht und Asthma in der Anamnese identifiziert. Hingegen konnte für die Faktoren Ausbildung, Einkommen und Wohnumfeld keine Assoziation zur COPD-Mortalität gezeigt werden. Des Weiteren ist aber auch eine genetische Komponente der Erkrankung evident, wobei neben dem schon lange als emphysemverursachend bekannten Alpha-1-Antitrypsinmangel auch verschiedene andere Gene die Entwicklung einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung beeinflussen (Barnes 1999; Lomas et al. 2001).

Unbestritten ist aber inzwischen, dass Rauchen den Hauptrisikofaktor darstellt, der für mehr als 90 Prozent der COPD-Fälle in der westlichen Welt als verursachender Faktor angesehen wird (Silverman et al. 1996). Für das Jahr 2000 können dem Rauchen weltweit 4,83 Millionen Todesfälle zugeschrieben werden, was 12 % der totalen globalen Mortalität von Erwachsenen älter als 30 Jahre (hierbei 18 % bei Männern und

5 % bei Frauen) entspricht (Ezzati et al. 2003). Hiervon entfallen 2,69 Millionen Todesfälle auf Personen zwischen 30 und 69 Jahren, was zu einer hohen Anzahl von verlorenen Lebensjahren aufgrund frühzeitigen Todes führt. Als durch Rauchen verursachte tödliche Erkrankung war die COPD mit weltweit 0,97 Millionen Toten im Jahr 2000 nach Herz-Kreislauferkrankungen und noch vor Lungenkrebs die zweithäufigste Todesursache. In einer anderen Arbeit beschreiben Ezzati et al. (2002), dass Tabakkonsum in der entwickelten Welt der Hauptrisikofaktor bei der Verursachung von durch Behinderung oder Tod hervorgerufenen verlorenen Lebensjahren ist.

Aufgrund dieser engen Assoziation des Tabakrauchens und seinen Folgekrankheiten ist die positive Beeinflussung der Prävalenz des Tabakkonsums sicherlich die Hauptaufgabe bei der Bekämpfung der COPD. Seit Bekanntwerden der durch Rauchen verursachten Gesundheitsschäden in den sechziger Jahren sind auch viele Anstrengungen in dieser Richtung mit zum Teil beachtlichen Erfolgen unternommen worden. Wie Giovino (2002) beschreibt, ist die Prävalenz des Rauchens unter erwachsenen US-Amerikanern von 42,4 % 1965 auf 23,3 % im Jahre 2000 gesunken. Dabei hat sich jedoch das Rauchverhalten von Männern und Frauen, nachdem 1965 in den USA noch knapp 20 % mehr Männer als Frauen geraucht haben, mittlerweile nahezu angeglichen. Dies ist auch eine Erklärung für den eingangs beschriebenen wesentlich stärkeren COPD-Mortalitätsanstieg bei Frauen. Wie die epidemiologischen Daten zum Tabakkonsum von Giovino (2002) aber auch zeigen, ist die Prävalenzsenkung des Rauchens allenfalls ein Teilerfolg. Gerade das immer jüngere Einstiegsalter beim Rauchen ist alarmierend, 1998 war der mittlere Alterschnitt der erstmaligen Raucher in den USA gerade 15,4 Jahre. Wenn man die Art des Tabakkonsums betrachtet, galten Zigarren bisher im Vergleich zu Zigaretten noch als wesentlich sicherer, doch konnten Iribarren et al. (15) zeigen, dass auch dieser Tabakkonsum mit signifikant erhöhter Mortalität für COPD und andere mit Rauchen assoziierten Erkrankungen einhergeht. Dies spielt vor allem deshalb eine Rolle, da sich der Zigarrenkonsum aufgrund verstärkter Werbung zwischen 1993 und 1997 mehr als verdoppelt hat.

Trotz der unbestrittenen Bedeutung des Rauchens für die Entstehung der COPD sind zwei Aspekte relativierend anzuführen. Zum einen entwickeln nur rund 10 – 20 % der schweren chronischen Raucher eine COPD (Barnes 1999), zum anderen sind, in der genauen Größenordnung je nach Studie wechselnd, rund 16 % der an COPD

verstorbenen Menschen lebenslange Nichtraucher gewesen (Meyer et al. 2002). Daher gibt es Überlegungen, die gesamte Bevölkerung in Screening-Programmen auf das Vorhandensein einer COPD in einem frühen Stadium hin zu untersuchen. In einer niederländischen Früherkennungsstudie, beschrieben von van den Boom et al. (1998), wurden Lungenfunktionstests an breiten Teilen der Bevölkerung, bei denen bisher keine COPD und kein Asthma bekannt waren, durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es u.a. festzustellen, ob eine Früherkennung einen wirtschaftlichen Vorteil und einen Zuwachs an Gesundheit bedingen würde, da durch sekundäre Prävention mögliche irreversible Lungenfunktionsstörungen aufgehalten werden könnten. Erstaunlicherweise entdeckte man in über 40 % der getesteten Personen Symptome und objektive Zeichen einer COPD in unterschiedlich schwerer Ausprägung. Hierbei beliefen sich die Kosten pro aufgedecktem Fall auf 564 US-Dollar, was im Vergleich zu den Kosten anderer Krankheits-Screenings vergleichsweise günstig war. Ob ein möglicher frühzeitiger Therapiebeginn jedoch sinnvoll wäre und langfristig Kosten sparen würde, konnte von den Autoren hingegen noch nicht abschliessend beurteilt werden. Zu dieser Fragestellung geben auch Studienergebnisse anderer Autoren noch keine eindeutigen Antworten. So berichteten Pauwels et al. (1999), dass die frühzeitige Inhalation von Budenosid mit einer kurzzeitigen Verbesserung der Lungenfunktion bei Personen mit einer milden COPD, die weiterhin rauchten, verbunden war. Ein positiver Langzeiteffekt auf die fortschreitende Erkrankung konnte hingegen nicht beobachtet werden. Diese Einschätzung wurde auch von den Ergebnissen anderer Arbeiten bestätigt (van Gunsven et al., 2003).

Die bisherigen Ausführungen haben nun den großen Stellenwert der COPD für die Gesellschaft dargestellt. Interessant ist jedoch, dass sich diese enorme Bedeutung der Erkrankung nicht immer in den Forschungsanstrengungen der Länder widerspiegelt. So ergab eine Untersuchung in den USA, die die Ausgaben zur Erforschung der 29 wichtigsten Krankheiten in Zusammenhang mit der durch die jeweilige Erkrankung verursachten Bürde stellte, dass die zur Verfügung gestellten Forschungsmittel der Wichtigkeit der COPD nicht gerecht werden (Gross et al., 1999). Dies macht deutlich, dass eine verstärkte Erforschung der COPD zu einem weiterreichenden Verständnis der Erkrankung für die Zukunft sehr wünschenswert ist.

### 1.1.3 Akute Exazerbation der COPD

Akute Exazerbationen im Rahmen der COPD sind ein wichtiger Marker für den Krankheitsverlauf des Patienten. Vor der Auseinandersetzung mit diesem Thema ist es zunächst erforderlich, akute Exazerbationen näher zu definieren, da dieser Begriff nicht immer einheitlich gebraucht wird. Durchzusetzen scheint sich die von Rodriguez-Roisin (2000) formulierte Definition, die das Ergebnis eines Workshops „COPD: Working towards a greater understanding“ der „American Thoracic Society“ ist. Nach dieser ist eine akute Exazerbation „*eine anhaltende Verschlechterung des Befindens des Patienten, ausgehend vom stabilen Zustand und jenseits der normalen Tag-zu-Tag-Variationen, die akut im Beginn ist und einen Wechsel der regulären Medikation des Patienten mit einer zugrundeliegenden COPD notwendig macht*.“ Die akute Exazerbation stellt also häufig eine für die Patienten dramatische Verschlechterung des Wohlbefindens dar, wobei nicht nur die Lebensqualität der Patienten mit häufig auftretenden Exazerbationen sinkt (Seemungal et al. 1997), sondern dieser Zustand zumindest für Patienten mit schwerer COPD lebensbedrohlich werden kann. Wie von Connors et al. (1996) berichtet, verstarben 11 % der Patienten, die mit einer akuten Exazerbation im Rahmen einer COPD und einer Hyperkapnie von 50 mmHg oder mehr aufgenommen wurden. Ebenso bestand mit 49 % eine hohe Folge-Mortalität am Ende des zweijährigen Beobachtungszeitraums dieser Studie. Als ursächlich für die akute Exazerbation wird eine Interaktion von Bakterien, Viren, veränderter Luftqualität und wirtsspezifischen Faktoren angesehen, die zu verstärkter Entzündung der unteren Atemwege führt, was letztendlich die Ausprägung der charakteristischen Symptomatik bewirkt (White et al. 2003). Immer stärker kommt hierbei die Rolle von bakteriellen Infektionen in den Mittelpunkt der Diskussionen, wobei die Datenlage bezüglich der Bedeutung dieser Infektionen bisher oft kontrovers beurteilt wurde. Hirschmann (2000) führt aus, dass seiner Ansicht nach der Nachweis der Auslösung von akuten Exazerbationen durch bakterielle Infektionen nicht erbracht und auch eine positive Auswirkung einer Antibiotika-Therapie bisher nicht ausreichend evident sei. Diese Einschätzung wird von Murphy et al. (2000) vehement bestritten, vielmehr wird eine wichtige Rolle der Bakterien in diesem Zusammenhang gesehen, so dass eine Antibiotika-Therapie bei Vorliegen mehrerer Kardinalsymptome der akuten Exazerbation absolut indiziert sei. Hirschmann (2000) begründete seine These unter anderem auch damit, dass eine bakterielle Kolonisation im Stadium der akuten Exazerbation nicht häufiger vorkomme als im stabilen klinischen Zustand. Hierzu

stellten Sethi et al. (2002) die interessante Gegenthese auf, dass die Entstehung eines neuen Stammes eines pathogenen Bakteriums mit der Exazerbation der COPD assoziiert sei, was anhand molekularer Typisierung von Bakterien in einer prospektiven Studie von den Autoren bewiesen werden konnte. Auch konnten Wilkinson et al. (2003) zeigen, dass ein Erregerwechsel sowie eine steigende bakterielle Kolonisation der unteren Atemwege mit einer verstärkten Entzündung und einem beschleunigten Abfall der Lungenfunktion einhergeht. In einer weiteren Arbeit über die Rolle von Bakterien in der Exazerbation der chronischen Bronchitis fanden Sethi et al. (2000), dass Zeichen einer neutrophilen Entzündung, wie sie bei bakteriellen Infektionen als Ursache der Exazerbation zu erwarten wären, auch tatsächlich mit dem Vorkommen von H. influenzae und M. catarrhalis assoziiert waren. Auch wurde eine positive Korrelation zwischen dem Nachweis von intrazellulären nichttypisierbaren H. influenzae in den unteren Atemwegen und einem schlechteren klinischen Zustand des Patienten gefunden (Bandi et al. 2001). Neben den schon lange als wesentliche Bakterien im Rahmen der COPD bekannten Pneumokokken, H. influenzae und M. catarrhalis (Monso et al. 1995) kommen zunehmend gram-negative Bakterien in den Fokus des Interesses. Gerade in Patienten mit einer fortgeschrittenen COPD konnten im Rahmen von akuten Exazerbationen Entereobakteriaceae und Pseudomonas spp. als vorherrschende Bakterien nachgewiesen werden, wobei eine Korrelation zwischen der Verschlechterung der Lungenfunktion und der Isolation dieser Bakterien gefunden wurde (Eller et al. 1998). All diese Daten legen die Vermutung nahe, dass bakterielle Infektionen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der COPD spielen.

### 1.1.4 Tiermodelle der COPD

Um die Pathogenese von Erkrankungen weiter zu erforschen, sind Tiermodelle oftmals unerlässlich. Sie ermöglichen es, Abläufe und Mechanismen im Krankheitsgeschehen nachzuvollziehen und aufgestellte Hypothesen zu überprüfen. Dabei ist zu beachten, dass nur ein dem humanen Krankheitsgeschehen gut nachempfundenes Modell eine sichere Basis ist, um aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente verlässliche Schlüsse ziehen zu können. Daher sollen im folgenden etablierte Tiermodelle der COPD zusammenfassend dargestellt und die Vor- und Nachteile der einzelnen Modelle aufgezeigt werden.

Tiermodelle der COPD sind in vielerlei Hinsicht nicht unproblematisch. Ein erster kritischer Aspekt liegt in der Krankheit an sich, da es sich bei der COPD, wie in 1.1.1 erläutert, nicht um eine einzige, scharf definierte Erkrankung handelt, sondern der Ausdruck COPD im Minimum die drei sich überlappenden klinischen Konditionen chronische Bronchitis, chronische Bronchiolitis und Emphysem umfasst (Jeffery, 1999). Hierbei basiert die Diagnose der Erkrankung COPD im klinischen Alltag in erster Linie auf den Symptomen chronischer Husten und/oder Sputumproduktion, sekundäres diagnostisches Kriterium ist die objektiven Messung der Atemwegsobstruktion mittels Lungenfunktionsdiagnostik (Iqbal et al., 2002). Diese symptomorientierte Definition kann nur schwierig auf ein passendes Tiermodell der chronischen Bronchitis angewendet werden, wohingegen das Emphysem als pathologisch-anatomisch definierte Erkrankung für Tiermodelle besser zugänglich ist (O´Byrne und Postma, 1999). Daher betont Tralau-Stewart, zitiert von Hele (2002), die Notwendigkeit, verbesserte Methoden und Protokolle zu suchen, um zukünftig nicht nur pathologische Ergebnisse, sondern auch Biomarker und Daten zur Lungenfunktion zur Beurteilung von COPD-Tiermodellen zu Grunde legen zu können.

Neben dieser für die COPD spezifischen Problematik, die die Suche nach einem geeigneten Tiermodell für diese Erkrankung erschwert, unterliegen natürlich alle COPD-Tiermodelle allgemeinen Anforderungen an einen idealen Modellaufbau. Hierbei sind neben der engen Ähnlichkeit zur humanen Erkrankung noch objektive Meßmöglichkeiten physiologischer Parameter sowie Reliabilität und Reproduzierbarkeit zu nennen (O´Byrne und Postma, 1999). Natürlich können alle Tiermodelle nur Annäherungen an ein ideales Tiermodell darstellen, so dass heute verschiedene Ansätze als COPD- Tiermodell existieren.

Im folgenden sollen die gängigsten Modelle kurz vorgestellt werden:

Gross et al., zitiert in Campbell (2000), beschrieb 1965 das erste reproduzierbare Tiermodell für das Lungenemphysem, induziert durch intratracheale Instillation der Proteinase Papain in Ratten. Durch Instillation anderer proteolytischer Enzyme, allen voran Elastase, konnten in der Folgezeit ähnliche morphologische Veränderungen im Sinne eines panazinären Emphysems in anderen Versuchen reproduziert werden (O´Byrne und Postma, 1999). Nachteilig bei diesen Proteolyse-Enzymmodellen ist jedoch, dass sie die Pathogenese der humanen Erkrankung nicht gut rekapitulieren, da im Tier eine einmalige massive Verletzung durch die Enzyminstillisation gesetzt wird, während im Menschen die Emphysementstehung über Jahrzehnte durch eine

allmähliche Gewebsschädigung verläuft (Campbell, 2000). Hier konnten Liou et al. (1996) bezüglich der Dynamik dieses Schädigungsprozesses zeigen, dass proteolytische Enzyme aus Granulapaketen von Neutrophilen so freigesetzt werden, dass lokal kurzzeitig sehr hohe Konzentrationen an Proteasen perizellulär entstehen, die mit ihren Substraten reagieren können, bevor sie durch interzellulär vorhandene Antiproteasen inhibiert werden. Wie dieser Teilaspekt des möglichen Schädigungsmusters des Emphysems beim Menschen verdeutlicht, wird die langsam und allmählich verlaufende Pathogenese der Erkrankung im Menschen durch einmalige Proteaseinstillation jedenfalls nur unzureichend nachempfunden, so dass es zur Entwicklung weiterer COPD- Tiermodelle kam.

Neuere COPD-Tiermodellforschung fokussiert sich häufig auf Mausmodelle, da Mäuse einzigartige Möglichkeiten der genetischen Manipulation bieten und außerdem schon langjährige Erfahrungen mit der Maus als Versuchstier bestehen (Shapiro 2000). Interessanterweise kommen bei der Maus auch verschiedene natürlich vorkommende Mausmutantenstämme vor, die ein Emphysem entwickeln, doch haben diese Mäuse meist einen sehr komplexen Phänotyp, der durch eine abnorme Lungenentwicklung noch verkompliziert wird (Campbell 2000). Daher konzentriert sich die derzeitige Forschung eher auf Erkenntnisse aus Experimenten mit Knock-out Mäusen. So konnten Hautamaki et al. (1997) zeigen, dass sich eine Knock-out-Maus nach Deletion des Makrophagen-Elastase-Gens (MMP-12) normal entwickelte. Im Gegensatz zu der Wildtyp-Maus zeigte diese Knock-out-Maus hingegen nach Langzeitexposition von Zigarettenrauch weder eine angestiegene Anzahl von Makrophagen in den Lungen, noch entwickelte sie ein Emphysem, so dass eine Bestätigung für die Rolle des Enzyms MMP-12 bezüglich der Emphysementwicklung gefunden wurde. Auch für den Prozess der COPD-Entstehung wichtige Zytokine konnten mittels genetisch veränderter Mausmodelle näher charakterisiert werden. So entwickelten Zheng et al. (2000) ein transgenes Mausmodell, in dem mittels eines umgekehrten Tetrazyklin-Transaktivator-Systems eine Überexpression des proinflammatorischen Zytokins IL-13 in Clarazellen generiert werden konnte. Ein Vorteil dieses Systems war, dass so die IL-13-Überexpression, hervorgerufen durch Tetrazyklingabe, erst zeitlich flexibel nach abgeschlossener Lungenentwicklung untersucht werden konnte. Hierbei zeigte sich, dass diese Mäuse im Gegensatz zu den Wildtypmäusen nach IL-13-Überexpression ein Emphysem mit vergrößertem Lungenvolumen, Becherzell-Metaplasie und Entzündung entwickelten. Es wurden eine Vielzahl von

Matrix-Metalloproteinasen (MMP`s) und Cathepsine durch IL-13-Expression induziert und Behandlungen mit MMP- oder Zystein-Proteinase-Antagonisten schwächte die Emphysem- und Entzündungsentwicklung signifikant ab.

Weitere Bestrebungen, die Pathogenese der COPD besser zu verstehen, können in der Zukunft auch zunehmend mit „humanisierten“ Mausmodellen, in denen humane Gene unter Kontrolle eines murinen Promotors in die Maus insertiert werden, unternommen werden (Campbell 2000).

Als weitere große Gruppe von Tiermodellen der COPD wurden Expositionsmodelle entwickelt. Da Zigarettenrauch der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Lungenemphysems im Menschen ist, wurde ein besonderes Augenmerk auf Tiermodelle basierend auf dem Gebrauch von Zigarettenrauch oder seinen wichtigsten Derivaten gerichtet (O´Byrne und Postma 1999). Diese Tiermodelle bieten den Vorteil, nicht nur die Proteinasefreisetzung als Pathogenitätsfaktor der Emphysementstehung untersuchen zu können. Vielmehr könnten auch andere durch Zigarettenrauch hervorgerufene Veränderungen jenseits der Proteinase-Überexpression gefunden werden (Shapiro 2000). Als Nachteil für in vivo Modelle mit Zigarettenrauch wird aber vor allem die bis zu zwölf Monaten dauernde lange Zeitspanne gesehen, bis es durch Rauchexposition zur Entstehung von Lungenläsionen kommt, so dass andere Strategien für die Tiermodelle gesucht wurden (Hele 2002).

Ein wesentlicher Bestandteil des Zigarettenrauches stellt Stickstoffdioxid ($NO_2$) dar, wobei bis zu 500 ppm im Zigarettenrauch nachgewiesen werden konnten (Repine et al., 1997). Und als eine der Hauptkomponenten der atmosphärischen Luftverschmutzung wurden für $NO_2$ vielfältige Auswirkungen auf humane Atemwegs- und Lungenerkrankungen postuliert, was in zahlreichen Studien untersucht und belegt werden konnte. So wurden unter anderem die Todesfälle von Patienten, die sich mit asthmatischen Beschwerden in einer Notaufnahme in Barcelona vorstellten, über einen Zeitraum von zehn Jahren untersucht. Gleichzeitig wurden die Luftverschmutzungswerte in Barcelona gemessen und aufgezeichnet. Es zeigte sich, dass hohe $NO_2$-Werte mit gesteigerter Mortalität für alle Todesursachen, insbesondere aber für respiratorisch begründete Todesursachen, bei asthmatischen Patienten assoziiert waren (Sunyer et al. 2002). In einer weiteren Studie wurden gesunde Nichtraucher an vier aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils vier Stunden mit $NO_2$ exponiert, wobei die Lungenfunktion vor und nach Exposition gemessen und jeweils eine endobronchiale Biopsie sowie eine Bronchiallavage und eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt

wurde. Hierbei konnte als Resultat der viertägigen $NO_2$-Exposition eine persistierende neutrophile Entzündung der Atemwege gesehen werden, wobei sich keine Änderungen der Lungenfunktion zeigten, was als weiterer Hinweis für die proinflammatorische Wirkung von $NO_2$ als Luftschadstoff gewertet wurde (Blomberg et al. 1999). Jenkins et al. 1999 untersuchten unter anderem den Effekt von $NO_2$ auf die Atemwege von atopischen Patienten mit einem milden Asthma, wenn diese im Anschluss an die Schadgasexposition mit Allergenen konfrontiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass die benötigte Allergendosis, um eine Atemwegsobstruktion mit einer Reduktion des FEV1 um 20 Prozent zu bewirken, nach dreistündiger Exposition mit 400 ppb $NO_2$ im Gegensatz zu Luftexposition signifikant reduziert war, was bei sechsstündiger Exposition mit 200 ppb $NO_2$ nicht zu beobachten war. Hieraus schlussfolgerten die Autoren, dass die durch $NO_2$-induzierten Veränderungen der Atemwegsreaktionen auf Allergenkontakt bei Asthmatikern von einer $NO_2$-Schwellenwertkonzentration und nicht von der kumulitativen Gesamtmenge des Luftschadstoffes abhängt. Desweiteren wurde von Bauer et al. (1986) berichtet, dass eine $NO_2$-Inhalation von 0,3 ppm für zuerst 20 Minuten in körperlicher Ruhe und dann bei körperlicher Betätigung für weitere zehn Minuten den durch körperliche Aktivität induzierten Bronchospasmus bei Asthmatikern signifikant verstärkte.

Aufgrund dieser Bedeutung von $NO_2$ als einer der Hauptkomponenten der atmosphärischen Luftverschmutzung sowie als wesentlicher Bestandteil von Zigarettenrauch mit schwerwiegenden Auswirkungen auf die Atemwegs- und Lungenfunktion beim Menschen, wird $NO_2$ häufig als Reizgas im Rahmen vieler COPD-Tiermodelle eingesetzt. So gibt es zahlreiche Daten zu Tiermodellen mit Ratten, die einer in vivo Exposition mit $NO_2$ ausgesetzt wurden. Hierbei berichteten Pagani et al. (1994) von einem signifikanten Anstieg der polymorphonukleären Leukozyten in der BAL nach akuter $NO_2$-Exposition sowie von einem signifikanten Anstieg der Makrophagen in der BAL nach subakuter $NO_2$-Exposition. Ebenso wurde histologisch gezeigt, dass eine siebentägige $NO_2$-Exposition mit 10 ppm zu einer Entzündung und einer strukturellen Schädigung auf Höhe der Bronchioli und Alveolen führt (Chitano et al. 1996). Entsprechend wurde beobachtet, dass die Langzeitexposition mit $NO_2$ in Ratten zur Entstehung eines Emphysems und einer zentrilobulären interstitiellen Fibrose

führt und gleichzeitig pulmonale Gefäßveränderungen verursacht, wobei diese Effekte jeweils als konzentrations- und zeitabhängig beschrieben wurden (Barth et al. 1995). Ebenso konnten Wegmann et al. (2005) zeigen, dass $NO_2$-Exposition auch im Mausmodell ein geeignetes Mittel zur Untersuchung der Pathomechanismen, die zur Entwicklung einer COPD führen, darstellt. Bei diesen entzündlichen Lungenreaktionen nach $NO_2$-Exposition wird angenommen, dass den eingewanderten Entzündungszellen eine bedeutende Rolle zukommt. Hierbei wird zunehmend der Aktivierungszustand der Alveolarmakrophagen näher untersucht, wobei ein Wechsel von klassischer Aktivierung hin zu einer alternativen Aktivierung stattzufinden scheint. So beobachteten Drumm et al. 1999, dass eine in vitro-Exposition von Alveolarmakrophagen mit $NO_2$ zu einer abgeschwächten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen bei gleichzeitiger Exposition mit Rußpartikeln und Asbestfasern führt. Ebenso scheint die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen von Alveolarmakrophagen im Anschluss an eine LPS-Stimulation nach in vitro Exposition mit $NO_2$ herabgesetzt zu sein (Kienast et al. 1996). Hierzu passt auch, dass bei einem Rattenmodell mit in vivo $NO_2$-Exposition die anschließend durch BAL gewonnenen Alveolarmakrophagen auf eine in vitro Endotoxin-Stimulation mit einer Reduktion der TNF$\alpha$- und IL-6-Produktion im Vergleich zu nicht exponierten Tieren reagierten (Erroi et al. 1996). Unterstützt wurde die These, dass eine $NO_2$- Exposition einen Aktivierungswechsel von Alveolarmakrophagen bewirkt, durch die Untersuchungen von Garn et al. (2003). Es konnte gezeigt werden, dass in vitro LPS-stimulierte Alveolarmakrophagen aus $NO_2$-exponierten Tieren nur vermindert klassische proinflammatorische Zytokine bildeten und gleichzeitig antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 einen signifikanten Anstieg der Transkription und Freisetzung zeigten. Hubbard et al. (1994) konnten zeigen, dass eine in vivo Exposition mit $NO_2$ zu abgeschwächten Entzündungsreaktionen in den Lungen von Mäusen, die 24 Stunden zuvor intratracheal Siliziumpartikel appliziert bekamen, führt. Desweiteren wurde beobachtet, dass die Clearence der Partikel durch eine $NO_2$-Exposition signifikant vermindert wurde.

All diese Daten legen nahe, dass durch eine $NO_2$-Exposition in den Lungen exponierter Tiere Veränderungen hervorgerufen werden, die Ähnlichkeiten zur humanen COPD aufweisen. Besonders Tiermodelle mit Ratten haben sich hierbei als geeignet für

Untersuchungen mit in vivo Exposition von Reizgasen wie $NO_2$ erwiesen. Dabei erwies es sich als sinnvoll, einzelne Entzündungsstadien nach unterschiedlich langer Expositionsdauer zu verfolgen, vor allem, um initiale Prozesse der der COPD zu Grunde liegenden Entzündungsreaktionen näher zu charakterisieren. Als interessant erscheint es insbesondere auch, die am Entzündungsgeschehen beteiligten Zelltypen, allen voran die Alveolarmakrophagen, näher zu untersuchen.
Unbestritten bedarf es weiterer Forschungsanstrengungen, die Entzündungsmechanismen bei der Entstehung von Lungenkrankheiten, allen voran der COPD, näher zu charakterisieren, um ein besseres Verständnis dieser Erkrankungen zu bekommen.

## 1.2 Makrophagen

### 1.2.1 Makrophagen in der COPD

Makrophagen werden als die Hauptabwehrzellen des Wirtes in den unteren Atemwegen angesehen (Shapiro 1999), wobei ihnen eine Vielzahl an Aufgaben in der Lunge zukommt. Neben der Clearence der distalen Atemwege und der Alveolarräume von Mikropartikeln und Mikroorganismen ist zudem die zentrale Funktion der Alveolarmakrophagen in der Regulation neutrophiler Entzündungen zu nennen (Sibille et al. 1990). Den Makrophagen scheint eine Schlüsselrolle zuzukommen, ob eine Entzündung einen Verlauf hin zu einer kompletten Restitution oder zu einem chronisch persistierenden Verlauf nimmt. Die Ingestition von apoptotischen Granulozyten ist hierbei eine wichtige Hauptaufgabe der Makrophagen, die in der Folge eine Suppression inflammatorischer Prozesse nach sich zieht (Haslett 1999) und letztendlich zu einer Auflösung der akuten Entzündung führt (Cox et al. 1995). Desweiteren konnte für Alveolarmakrophagen im Vergleich zu interstitiellen Lungenmakrophagen gezeigt werden, dass sie aufgrund ihrer ausgesprochen effizienten Phagozytosefähigkeit und ihrer starken bakteriziden Aktivität als besonders effektive Zellen der angeborenen unspezifischen Abwehr gegen infektiöse Agentien erscheinen (Franke-Ullmann et al. 1996). Diesem Teil des Immunsystems kommt immer dann eine besondere Bedeutung zu, wenn die Interaktion des Wirtes mit der Umwelt von besonderer Relevanz ist, wie dies aufgrund der immensen Oberfläche der Alveolen in der Lunge der Fall ist.

Die Makrophagen haben also eine exponierte Stellung in der Lungenphysiologie. Welche Rolle spielen sie jedoch in der Pathogenese von Lungenerkrankungen, insbesondere in der Pathogenese der COPD? Einige klinische Daten stützen die vermutete Bedeutung von Alveolarmakrophagen in diesem Zusammenhang. So ist das Ausmaß der Atemwegsobstruktion im Rahmen einer chronischen Bronchitis ebenso mit der Anzahl an Alveolarmakrophagen in der Lunge korreliert wie das Ausmaß der Emphysementstehung bei Rauchern, wobei im Gegensatz jeweils keine Assoziation zur Anzahl an neutrophilen Granulozyten besteht (Di Stefano et al. 1996, Finkelstein et al. 1995). Eine nähere Untersuchung der Alveolarmakrophagen und ihrer Funktionen erscheint sinnvoll, um ein besseres Verständnis der Pathogenese der COPD zu gewinnen.

Wie durch zahlreiche Untersuchungen bekannt ist, kommen im Rahmen einer COPD vermehrt Entzündungszellen in der Lunge vor (Barnes, 2003). Auch im $NO_2$-Tiermodell konnte gezeigt werden, dass in der akuten Phase der $NO_2$-verursachten Entzündung neutrophile Granulozyten in der BAL ansteigen, im weiteren chronischen Verlauf aber wieder abfielen. Demgegenüber waren Alveolarmakrophagen in der BAL während des gesamten Beobachtungszeitraumes signifikant vermehrt vorzufinden (Garn et al. 2003). Diese Rekrutierung der Entzündungszellen wird dabei vor allem durch Chemokine wie beispielsweise MCP-1 hervorgerufen (de Boer et al. 2000).
Da Proteinasen mit elastolytischer und kollagenolytischer Aktivität wesentlich für die Zerstörung der extrazelluären Matrix im Rahmen der COPD sind, fokussiert sich die Aufmerksamkeit zunehmend auf Makrophagen als mögliche Quelle dieser Enzyme. Zahlreiche Studien konnten diese Vermutung rechtfertigen. Beispielsweise konnten Finlay et al. (1997) zeigen, dass Alveolarmakrophagen von Emphysematikern grössere Mengen an elastinolytischen Matrix-Metalloproteinasen transkribieren und sezernieren als Makrophagen von Kontrollpersonen. Auch in Tiermodellen für akute Lungenschäden bestätigte sich die Evidenz von Alveolarmakrophagen als Quelle von matrixzerstörenden Proteinasen (Gibbs et al. 1999). Aber Makrophagen sind auch auf anderen Ebenen in den Verlauf einer COPD involviert. Wie bereits ausgeführt spielen bakterielle Infektionen für Exazerbationen im Rahmen einer COPD eine wichtige Rolle, und für die Bekämpfung dieser Infektionen ist eine intakte Makrophagenfunktion essentiell. Dies wurde in Mausmodellen mit experimenteller Verringerung von

Alveolarmakrophagen gezeigt, wo die Infektanfälligkeit der Tiere nach einer intratrachealen Infektion mit verschiedenen Erregern untersucht wurde. Es konnte hierbei eine verzögerte und abgeschwächte bakterielle Clearence mit signifikant erhöhter Mortalität bei Infektionen mit Pneumokokken, Klebsiella pneumonia und Pseudomonas aeruginosa gezeigt werden (Knapp et al. 2002, Broug-Holub et al. 1997, Kooguchi et al. 1998). Da bakterielle Infektionen, wie bereits ausgeführt, für den Verlauf einer COPD eine große Bedeutung besitzen und Alveolarmakrophagen als die entscheidenden Abwehrzellen zur Bekämpfung eben dieser Infektionen angesehen werden, ist es interessant, die zellulären Mechanismen, die den Makrophagen eine Bekämpfung dieser Erreger ermöglichen, näher zu betrachten.

### 1.2.2 Der Radikalstoffwechsel von Makrophagen

Für Phagozyten, wie Makrophagen oder Neutrophile Granulozyten, ist die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen nach Phagozytose oder Stimulation wesentlich für ihre bakteriziden Fähigkeiten (Forman et al. 2002) (Sibille et al. 1990). Im Vergleich zu anderen Makrophagen zeichnen sich hierbei insbesondere Alveolarmakrophagen als Zellen mit einem ausgeprägten mikrobiziden Potential aus (Franke-Ullmann et al. 1996), was sich auch an ihrer besonderen Befähigung zur Radikalproduktion ablesen lässt (Dörger et al 2001). Dies konnten Steinmüller et al. (2000) unter anderem auch darin zeigen, dass Alveolarmakrophagen nach Zymosan-Stimulation am effektivsten Superoxidradikale bildeten, ebenso waren Alveolarmakrophagen die potentesten Produzenten von NO nach Stimulation mit LPS und IFN-gamma. Da diese kleinen Intermediär-Moleküle in hohem Maße toxisch für Mikroorganismen sind (Pesanti 1984, MacMicking 1997), ermöglicht ihre Freisetzung ein effektives Abtöten von Mikroorganismen nach Phagozytose. Dieser Mechanismus stellt ein wichtiges Element der angeborenen Immunabwehr dar (Aderem et al. 1999). Für die Superoxid-Radikalproduktion in Phagozyten sind dabei verschiedene Enzymsysteme verantwortlich. Zum einen generiert die zellmembranständige NADPH-Oxidase nach Zellaktivierung Superoxid-Radikale (Forman et al. 2002, Karupiah et al. 2000), desweiteren wird Superoxid von Enzymen der mitochondrialen Atmungskette synthetisiert (Raha et al. 2000). Hierbei ist als genauer Hauptbildungsort vor allem der Komplex III der Atmungskette zu nennen (Lenaz 2001). Mittels Einsatz von Enzyminhibitoren kann der Beitrag dieser zwei Enzymsysteme an der gesamten

Superoxidbildung näher bestimmt werden. Hierbei ist Antimycin bekannt als spezifischer Inhibitor des Komplexes III der mitochondrialen Atmungskette (Rembish et al. 1994), wohingegen DPI (Diphenyleneiodium) präferentiell die NADPH-Oxidase hemmt, in höheren Konzentrationen aber auch die mitochondriale Superoxidbildung beeinflusst (Li et al. 1998). Die Superoxid-Freisetzung der beiden Enzymsysteme kann durch Messung der Chemolumineszenz, die in Folge der Reaktion von Superoxid mit Lucigenin emittiert wird, nachgewiesen werden (Rembish et al. 1994). Nach Superoxidfreisetzung entstehen dann in der Folge intrazellulär weitere reaktive Sauerstoff-Intermediärmoleküle (Karupiah et al. 2000), die aber aufgrund des Vorhandenseins von antioxidativen Enzymen nur transient erhöht sind. Von diesen Enzymen sind vor allem die Superoxiddismutase, die die Bildung von Wasserstoffperoxid aus Superoxid begünstigt, sowie Katalase und Gluthation-Peroxidase zu nennen, die den Abbau des Wasserstoffperoxides katalysieren (Forman et al. 2002). Diese antioxidativen Enzyme erfüllen somit eine wichtige Funktion in den Makrophagen, indem sie in den Zellen eine autoprotektive Funktion zum Schutz vor gebildeten Radikalen ausüben. So wird in Zellen, die mit nicht-letalen Dosen verschiedener Agentien exponiert wurden, die Superoxiddismutase verstärkt induziert, so dass die Zellen daraufhin eine Toleranz gegenüber einer Exposition mit der für sie toxischen Dosis an oxidativem Stress entwickelten (Canada et al. 1989). Perret et al. (2002) konnten desweiteren zeigen, dass zwischen der Hochregulation von autoprotektiven Schlüsselenzymen und dem Überleben von Makrophagen nach Stimulation derselben ein kausaler Zusammenhang besteht. So zeigte sich, dass nach in vitro-Stimulation von Makrophagen mit LPS unter anderem die Enzyme Superoxiddismutase und Katalase signifikant verstärkt transkribiert wurden und die Aktivität dieser Enzyme ebenfalls signifikant erhöht war.

Dies macht ersichtlich, dass der Radikalstoffwechsel von Makrophagen einer genauen Regulation bedarf, um einerseits die Funktion der Zellen für den Gesamtorganismus, wie beispielsweise das Abtöten von Mikroben, sicherzustellen, andererseits aber auch die Phagozyten vor einer Eigenschädigung zu schützen.

### 1.2.3 Alveolarmakrophagen und Surfactant Protein-A

Dem pulmonalen Abwehrsystem kommt im menschlichen Organismus eine ganz exponierte Bedeutung zu, wenn man bedenkt, dass die Lungen mit einer epithelialen Oberfläche von rund 200 m² wie keine anderes Organ der Umwelt ausgesetzt sind (Nicod 1999). Pro Tag werden 15000 Liter Luft in die Lungen eingeatmet und mit der Atemluft auch unzählige Partikel und Mikroorganismen (McCormack et al. 2002). Diesen steht ein komplexes Verteidigungssystem gegenüber. Angefangen von anatomischen Barrieren im Nasopharynx existieren zahlreiche weitere physikalische und chemische Barrieren, wie Hustenreflex, kinoziliärer Apparat, Surfactant und Mukus mit wichtigen Elementen wie z.B. dem Lysozym (Nicod 1999). Für die primäre antimikrobielle Verteidigung sind auf zellulärer Ebene die Alveolarmakrophagen und auf humoraler Ebene Proteinkomponenten des angeborenen Immunsystems entscheidend (McCormack et al. 2002). Glücklicherweise verfügt die Lunge über eine Vielzahl an verschiedenen Komponenten der angeborenen Immunität, die in der Lage sind, das Lungenepithel zu schützen (Alcorn et al. 2004). Eines dieser Systeme ist das pulmonale Surfactant, das zu 80 % aus Phospholipiden, zu 10 % aus neutralen Lipiden und zu 10 % aus Proteinen besteht und die epitheliale Oberfläche der Lungen bedeckt (Bernhard et al. 2004). Die Hautaufgabe des Surfactants liegt in der Herabsetzung der Oberflächenspannung, um so das Kollabieren alveolärer Strukturen während der Atmungszyklen zu verhinden. Zusätzlich spielt Surfactant vor allem aber auch eine Rolle im pulmonalen Abwehrsystem (Wright 1997).

Das häufigste Protein im Surfactant ist das „Surfactant Protein A“ (SP-A). Wie das „Surfactant Protein D“ (SP-D) und das „mannose-binding Protein“ (MBP) gehört SP-A zu der Familie der Collectine, einer Familie von Proteinen, denen eine wichtige Rolle in der angeborenen, nicht-antikörper-vermittelten Immunantwort zugeschrieben wird (Wright 1997).

Aufgrund der Regulation von verschiedensten Immunzellfunktionen, allen voran von Funktionen der Alveolarmakrophagen, ist in den letzten Jahren das Surfactant Protein A zunehmend in den Fokus des Interesses gekommen. Im folgenden werden die aktuellen Erkenntisse bezüglich der Wirkungen dieses Proteins im Prozess der Infektabwehr und Immunmodulation kurz dargestellt.

Zahlreiche Arbeiten belegen, dass SP-A die Phagozytose und Clearence von verschiedensten Bakterien und Viren fördert. So zeigen beispielsweise in vitro-Studien, dass SP-A das Abtöten von Mycoplasma pneumonia durch Alveolarmakrophagen

vermittelt (Hickmann-Davis et al. 1998), beziehungsweise dass durch SP-A die Phagozytose von Mycobakterium tuberculosis durch Makrophagen verstärkt wird (Gaynor et al. 1995). Um diese Funktion des SP-As weiter untersuchen zu können wurde unter anderem von LeVine et al. ein SP-A-Knock-out-Mausmodell etabliert, anhand dessen gezeigt werden konnte, dass SP-A-defiziente Mäuse empfänglicher für Infektionen mit Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pneumonia und RS-Viren sind (LeVine et al. 1998, 1999, 1999). Somit konnte auch in diesen Experimenten die fördernde Wirkung von SP-A bezüglich Phagozytose und Clearence von Mikroorganismen durch Alveolarmakrophagen bestätigt werden. Hierbei schien der durch SP-A ausgeübte Effekt durch eine Modifikation der Entzündungsreaktion der Alveolarmakrophagen zustande zu kommen. Es zeigte sich, dass in diesen Versuchen in der bronchioalveolären Lavage der SP-A-defizienten Mäuse vermehrt proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise TNFα nachweisbar waren, wohingegen die Radikalproduktion von Alveolarmakrophagen SP-A-defizienter Mäuse im Vergleich zu Zellen der Wildtypmäuse herabgesetzt war.

Eine Beeinflussung der Zytokinproduktion konnte auch nach Stimulation von Alveolarmakrophagen durch verschiedene andere Agentien gezeigt werden. So reduzierte SP-A in einem in vitro-Experiment die Freisetzung von TNFα durch kultivierte Alveolarmakrophagen nach LPS-Stimualtion (McIntosh et al. 1996). Diese Ergebnisse konnten in einem in-vivo-Versuch mit SP-A-Knock-out-Mäusen bestätigt werden. Hierbei wurde beobachtet, dass in der BAL dieser Tiere nach intratrachealer Verabreichung von LPS vermehrt TNFα und NO nachweisbar war (Borron et al. 2000). Desweiteren wurde auch eine Inhibition der TNFα-Produktion durch SP-A nach Induktion durch Candida albicans beziehungsweise durch Peptidoglycan, einer Zellwandkomponente von gram-positiven Bakterien, gefunden (Rosseau et al. 1999; Murakami et al. 2002). Wie all diese Arbeiten belegen, bestätigt sich zunehmend die antiinflammatorische Wirkung von SP-A, nachdem von Kremlev et al. (1994) zunächst auch eine Induktion proinflammatorischer Zytokine durch SP-A beschrieben worden war.

Auch bezüglich der Signaltransduktionswege in Alveolarmakrophagen gibt es zunehmend neue Erkenntnisse, wobei verschiedene funktionelle Interaktionen zwischen den Zellen und SP-A angenommen werden, die die Zellantworten auf z.B. eine LPS-Stimulation beeinflussen. Hier konnten zum einen Sano et al. (1999) zeigen, dass SP-A über eine direkte Interaktion mit CD14, einem wichtigen LPS-Rezeptor auf

Phagozyten, die Zellantwort von Alveolarmakrophagen moduliert. Zum anderen hemmt SP-A die Zytokinproduktion dieser Phagozyten aber auch durch einen CD14-unabhängigen Mechanismus (Alcorn et al. 2004). Desweiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass SP-A ebenso die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nach Alveolarmakrophagen-Stimulation durch PMA inhibiert, was dahingehend interessant ist, dass durch PMA andere intrazellluläre Signaltransduktionswege aktiviert werden als durch LPS. Diese Vielfältigkeit der Einflussmöglichkeiten von SP-A auf Makrophagenfunktionen wurde darüber hinaus noch durch die Ergebnisse eines Experimentes von Murakami et al. (2002) unterstrichen. Hier konnte eine direkte Interaktion von SP-A mit dem „Toll-like-Rezeptor-2“ für die Hemmung der durch Peptidoglykan induzierten Entzündungsreaktion der Alveolarmakrophagen verantwortlich gemacht werden.

All diese Studien zeigen, dass dem Surfactant Protein A eine wichtige Rolle in der Infektabwehr und Immunmodulation in der Lunge zugeschrieben werden kann. Die Wirkung des Proteins scheint dabei antiinflammatorisch zu sein, was sich vor allem an dem durch SP-A veränderten Zytokinmuster zeigt. Nur kurz angesprochen wurden die Effekte von SP-A bezüglich der Produktion von reaktiven Molekülen, wobei SP-A in diesem Zusammenhang beispielsweise die NO-Produktion zu unterdrücken scheint, was unter anderem auch durch eine Hemmung der TNFα-Sekretion vermittelt wird (Hussain et al. 2003). Weitere Auswirkungen von SP-A betreffen zum Beispiel die Chemotaxis und die Lymphozytenproliferation (Wright 1997), wesentliche immunologische Effekte dieses Proteins werden aber sicherlich, wie in diesem Abschnitt dargestellt, durch Interaktionen mit Alveolarmakrophagen ausgeübt.

## 1.3 Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit besteht in der funktionellen Charakterisierung von BAL-Zellen exponierter Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der $NO_2$-induzierten Entzündung. Hierbei stellen wir die Haupthypothese auf, dass die funktionelle Aktivität von BAL-Zellen von Tieren nach $NO_2$-Exposition wesentlich verändert ist, wobei wir postulieren, dass es zu einem Aktivierungswechsel hin zu einer alternativen Aktivierung der BAL-Zellen kommt.

Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist es, ob eine für Phagozyten wesentliche Funktion, die Synthese von reaktiven Radikalen, nach $NO_2$-Exposition eingeschränkt ist.
Diese von uns aufgestellte Hypothese prüfen wir, indem wir BAL-Zellen von Ratten nach unterschiedlich langer $NO_2$-Exposition hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Superoxidradikale nach Zymosanstimulation bilden zu können, untersuchen. Des Weiteren muss in der Folge beantwortet werden, welche der bei diesem Prozess beteiligten Enzymsysteme in den jeweiligen Entzündungsstadien hinsichtlich ihrer Aktivität verändert sind. Dies kann näher charakterisiert werden, indem die Wirkung von Enzyminhibitoren auf die an der Radikalbildung beteiligten Enzyme untersucht wird. Darüber hinaus kann die Aktivität der einzelnen Enzyme mittels Funktionsassays direkt bestimmt werden. Abschließend können auch Veränderungen der im oxidativen/antioxidativen Stoffwechsel beteiligten Enzyme auf transskriptioneller Ebene geprüft werden, um den Aktivierungswechsel der BAL-Zellen näher zu beschreiben.

Zur Klärung unserer Hypothese, dass BAL-Zellen nach $NO_2$-Exposition einen Aktivierungswechsel hin zu einer alternativen Aktivierung durchlaufen, ist es darüber hinaus wichtig zu untersuchen, ob die Zytokinfreisetzung als wesentliche Effektorfunktion von Phagozyten in den einzelnen Entzündungsstadien verändert ist. Hierbei postulieren wir, dass SP-A den Aktivierungswechsel von BAL-Zellen in den fortgeschrittenen Entzündungsstadien nach $NO_2$-Exposition unterstützt und somit ein additiver Effekt von $NO_2$-Exposition und SP-A bezüglich des veränderten Zytokinmusters der BAL-Zellen zu beobachten ist. Zur Prüfung der zellulären Sekretionsleistung untersuchen wir daher den Zellüberstand 24 Stunden nach Zellstimulation mit LPS bezüglich des Vorhandenseins verschiedener pro- und

antiinflammatorischer Zytokine mittels ELISA. Hierbei vergleichen wir, ob eine SP-A-Zugabe in die Zellkultur unterschiedliche Auswirkungen auf die BAL-Zellen der einzelnen Entzündungsstadien hat, was als Anzeichen für einen Aktivierungswechsel der BAL-Zellen interpretiert werden könnte.

# 2 MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Kits, Chemikalien, Primer und Verbrauchsmaterial

Es wurden folgende **Kits** verwendet: Glutathion-Peroxidase (GPx)-Funktionsassay (BIOXYTECH GPx-340TM ASSAY, OXIS international, Portland, USA), Superoxid-Dismutase (SOD)-Funktionsassay: (BIOXYTECH SOD-525TM Assay; Oxis international, Portland, USA), Zytotoxizitätsassay (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Madison, USA), Protein-Assay (BCA Protein Assay Kit, PIERCE, Rockford, USA), PCR-Kit (HotStarTaq MasterMix Kit, Quiagen, Hilden), Kit zur cDNA-Synthese (Omniscript RT-Kit, Quiagen, Hilden) und Kit zum DNA-Verdau (Dnase I, GIBCO BRL, Berlin).

**Chemikalien** wurden, sofern nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen verwendet: Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Gibco BRL (Berlin), Roche (Mannheim).

Die **Primer**herstellung erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg).

**Plastikverbrauchsmaterial** stammte von den folgenden Firmen: Eppendorf (Hamburg), Greiner (Nürnberg), Falcon (Becton Dickinson, Plymouth, England), Costar (Corning Incorporated, NY, USA).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tiermodell und Gewinnung der BAL-Zellen

#### 2.2.1.1 Versuchsbedingungen des Tiermodells

In dem von uns gewählten COPD-Tiermodell wurden männliche Fischer344-Ratten mit einem Körpergewicht von ungefähr 120 g verwendet, die von Charles River Wiga (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die Tiere wurden in Käfigen mit einer Temperatur von 18-22°C in einem 12-12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, wobei es unbegrenzten Futter- und Wasser-Zugang gab.

Die Tiere der Behandlungsgruppen wurden kontinuierlich mit 10 ppm $NO_2$ für 24 h, 3 oder 20 Tage exponiert. Während der $NO_2$-Exposition wurden die mit maximal 4 Ratten gefüllten Käfige in luftdicht verschlossene Kammern gestellt, in die das Gasgemisch eingeleitet wurde. In diesen Kammern, die mit getrennter Luftzufuhr und Luftausfuhr ausgestattet waren, wurde mittels Ventilatoren die gleichmäßige Verteilung des Gases sichergestellt. Das Volumen der Kammern betrug 60 l, der Gasaustausch 15 l/min. Die $NO_2$ (Messer-Griesheim, Duisburg, Deutschland)-Konzentration wurde auf eine Konzentration von 10 ppm durch Mischung mit Kompressionsluft eingestellt und mindestens zweimal täglich mit einem $NO_2$-sensitiven Elektrochemischen Element (ECS 102-1, MPSensor Systeme, München, Deutschland) kontrolliert. Die Bedingungen der Tierhaltung und der $NO_2$-Exposition entsprachen deutschen und europäischen Richtlinien.

#### 2.2.1.2 Gewinnung der BAL

Die Alveolarmakrophagen wurden aus den Fischer-Ratten durch eine standardisierte ex vivo bronchoalveoläre Lavage wie folgt gewonnen:

Durch eine intraperitoneale Injektion von Sodium Pentobarbital (100 mg/kg KG, Narcoren, Merial GmbH, Hallerbergmoos, Deutschland) gemischt mit 100 IE Heparin

(LiqueminN, Roche, Basel, Schweiz) wurden die Ratten anästhesiert. Nach Tracheotomie wurde eine Kanüle in die Trachea eingeführt und durch Ligatur fixiert. Anschließend wurde der Bauchraum durch einen Medianschnitt eröffnet, die Bauchaorta mittels Scherenschnitt durchtrennt und umgehend der Lungenkreislauf bei parallel belüfteter Lunge mit einem auf 37°C vorgewärmten Perfusionspuffer (PBS + Ca/Mg mit 10 mM Hepes, 50 µg/ml Gentamycin und 10 U/ml Penicillin, pH 7,4) durchspült. Das nun blutleere Herz-Lungenpaket wurde daraufhin en bloc entnommen und die Lunge jeweils sechs mal mit 8 ml Lavage-Puffer (Ca/Mg-freies PBS mit 10 mM Hepes, 0.2 mM EGTA, 50 µg/ml Gentamicin und 10 U/ml Penicillin, pH 7,4) lavagiert, wobei die Lavage-Flüssigkeit durch passives Zurücklaufen aus der vorsichtig angehobenen Lunge zurückgewonnen wurde. Die bronchoalveoläre Lavage wurde im Anschluss sofort bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gestellt und im Folgenden für jedes Tier einzeln weiterverarbeitet.

#### 2.2.1.3 Waschschritte und Erytrocyten-Lyse

Nach einem ersten Zentifugationsschritt (1200°, 10 min, 4°C) wurden die BAL-Zellen von dem Zellüberstand getrennt, indem unter sterilen Arbeitsbedingungen der Überstand vorsichtig, ohne das Zellpellet zu lösen, abgegossen wurde. Anschliessend wurde das Zellpellet resuspendiert. Um in der BAL vorhandene Erythrozyten zu eliminieren, wurde nun obligat eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dazu wurde auf die Zellsuspension 5 ml steriles Aqua dest. pipettiert und die Suspension vorsichtig geschwenkt. Nach exakt 30 sec. wurde durch die Zugabe von sterilem 2xPBS die Isotonie der Suspension wieder hergestellt. Diese Methode führt zur selektiven hypotonen Lyse von Erythrozyten. Als Waschschritt wurde nun die Zellsuspensionen mit sterilem 1xPBS auf jeweils 20 ml aufgefüllt, erneut zentrifugiert (1200°, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und auf das abermals resuspendierte Zellpellet jeweils 20 ml steriles 1xPBS gegeben. Nach einem nächsten Zentrifugationsschritt (1200°, 10 min, 4°C) wurde das Pellet nun in 5 ml sterilem 1xPBS aufgenommen.

#### 2.2.1.4 Zellzählung

Zur Zellzählung wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und in 5ml 1xPBS gegeben. Die so um den Faktor 250 verdünnten Zellen wurden nun in einem CASY-Zellzähler (CASY-1 Cell-Counter + Analyser System, Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland) gezählt. Hierbei wurden alle Zählerereignisse im Größenbereich von 6 µm bis 20 µm berücksichtigt und aus dem Ergebnis die Zellkonzentration in der aufgearbeiteten Zellsuspension errechnet. Nun konnte aus der BAL-Zellsuspension das Volumen mit der jeweils benötigten Zellzahl abgenommen werden, um es nach Auffüllung mit sterilem 1xPBS erneut zu zentrifugieren. Das so erhaltene Pellet wurde nun in das für den jeweiligen Versuch benötigte Medium aufgenommen.

Wichtig zu erwähnen ist, das alle Zellsuspensionen immer soweit wie möglich auf Eis gestellt wurden und sämtliche Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen ausgeführt wurden, um das Risiko einer Kontamination so gering wie möglich zu halten.

### 2.2.2 SP-A Wirkung auf Alveolarmakrophagen

#### 2.2.2.1 24 h-Zellkultur

Ziel dieses Versuchs war es, Alveolarmakrophagen für 24 h in Gegenwart von SP-A zu inkubieren und den Zellüberstand nach 24 Stunden zu untersuchen, um so Informationen über den Einfluss unterschiedlicher SP-A-Konzentrationen auf zelluläre Sekretionsleistungen zu erhalten.

**Versuchsvorbereitungen:**

**Medium**: RPMi 1640 (1x) mit 2,0g/L NaHCO3 (Firma LINARIS Wertheim, Deutschland) plus 1% inaktiviertes ( 56°C für 30 Minuten ) FCS (fötales Kälberserum, Biochrom Berlin, Deutschland) und zusätzlicher Zugabe nachfolgender **Supplemente** (Angaben in Endkonzentrationen):

| | | |
|---|---|---|
| L-Glutamin | 2 mM | Biochrom Berlin, Deutschland |
| Natriumpyruvat | 2 mM | Biochrom Berlin, Deutschland |
| HEPES-Pufferlösung | 50 mM | Biochrom Berlin, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin | 50 U/ml bzw. 50 mg/ml | Biochrom Berlin, Deutschland |
| nichtessentielle Aminosäuren | 1 % | Biochrom Berlin, Deutschland |

**LPS-Lösung:** LPS (E.coli 0127:B8; DIFCO Detroit, USA) in einer Konzentration von 1 µg/ml, angesetzt in oben beschriebenem Medium

Freundlicherweise wurde lyophilisiertes rekombinantes humanes SP-A von der Firma Byk Gulden Konstanz, Deutschland zur Verfügung gestellt. Das SP-A der Stammlösung war in 10 mM Na-phosphat, pH 7,5 gelöst. Bei einem von Byk Gulden gemessenen Endotoxingehalt von 11 pg/ml induzierte dieses SP-A im Konzentrationsbereich von 0,1 –100 µg/ml in Makrophagen keine TNFα-Synthese.

**SP-A:** Humanes rSP-A, angesetzt in einer Ausgangslösung mit der Konzentration von 200 µg/ml in oben beschriebenem Medium, anschliessend noch zusätzlich zweimal

1 : 10 vedünnt, so dass eine Verdünnungsreihe mit den SP-A-Konzentration 2 µg/ml, 20 µg/ml und 200 µg/ml resultierte.

**Zellsuspension:** Das BAL-Zellpellet mit der für den jeweiligen Versuch benötigten Zellzahl wurde nun so in dem oben beschriebenen Medium aufgenommen, dass die Zellsuspension eine Konzentration von c = $2x10^6$ Zellen/ml hatte.

**Versuchsdurchführung:**

Zuerst wurden von der Zellsuspension jeweils 125 µl in eine durchsichtige 48well-Zellkulturplatte pipettiert und für eine Stunde zum Äquillibrieren in einen Inkubator (37°C, 95% Luftfeuchte, 5% $CO_2$) gestellt.

Anschliessend wurden pro well 25 µl der jeweiligen SP-A-Lösung (bzw. des Mediums) hinzugefügt, woraufhin die Platten für weitere 4 Stunden bei gleichen Bedingungen im Brutschrank inkubiert wurden.

Daraufhin wurden zur Zellstimulation 25 µl der oben beschriebenen LPS-Lösung (bzw. bei den Negativkontrollen 25 µl des Mediums) in jeden Ansatz pipettiert. Abschliessend wurde jedes Well mit 75 µl des Mediums aufgefüllt, so dass in jedem Well ein Endvolumen von 250 µl resultierte. Die Platten wurden nun unter den beschriebenen Bedingungen für 24 Stunden inkubiert.

Danach wurden die Zellen zunächst unter einem Lichtmikroskop kontrolliert, um Auffälligkeiten, wie z.B. eine bakterielle Kontamination, zu beurteilen. Im Anschluss hieran wurden die Zellüberstände aus den einzelnen Wells in Eppendorf-Tubes überführt und für eine Minute mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Vorsichtig wurden nun die zellfreien Überstände abgenommen und bis zur weiteren Untersuchung bei –20°C weggefroren.

Insgesamt wurden, um Wirkungen verschiedener SP-A-Konzentrationen bei konstanter LPS-Stimulation zu untersuchen, acht verschiedene Ansätze pro Versuchstier durchgeführt:

- bei einer Endzellkonzentration von $1x10^6$ Zellen/ml wurde die Stimulation mit 100 ng/ml LPS in Gegenwart von SP-A in den Endkonzentrationen c1 = 0,2 µg/ml; c2 = 2 µg/ml; c3 = 20 µg/ml bzw. ohne SP-A-Zugabe durchgeführt.

- zusätzlich wurden parallel zu diesen Ansätzen vier weitere Ansätze mit identischen SP-A- und Zellkonzentrationen, aber ohne LPS-Stimulation, als Negativkontrollen durchgeführt.

### 2.2.2.2 Zytokin-Bestimmung mittels ELISA

Prinzip eines ELISAs:

Zur Zytokin-Bestimmung im Zellüberstand wurde ein Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) verwendet. Hierzu werden die Proben in wells gegeben, die zuvor mit spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichteten Antikörpern beschichtet wurden. Zur Antigendetektion wird dann ein zweiter gegen das Antigen gerichteter, markierter Antikörper dazugegeben, dessen Bindung dann in einer enzymabhängigen Farbreaktion gemessen werden kann.

Beschichtung der ELISA-Platten:

Im ersten Schritt wurden die gegen das jeweils zu bestimmende Zytokin gerichteten Beschichtungsantikörper in Beschichtungspuffer (0,1 M $Na_2HPO_4$, pH 9,0) verdünnt. Dann wurden jeweils 50 µl des verdünnten Antikörpers in die wells einer 96`er ELISA-Platte (Nunc Maxisorp) pipettiert und die Platte über Nacht (Minimum 12 Stunden) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit PBS-Tween (0,05 % Tween in PBS) gewaschen. Diese Waschbedingungen gelten für alle noch folgenden ELISA-Waschschritte.

Blocken der Platten:

Zum Blocken wurden nun 250 µl Blocking-Puffer (PBS + 1 % BSA) pro well zugegeben, woran sich eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemparatur anschloss. Daraufhin wurde die Platte erneut gewaschen.

Standard und Probenzugabe:

Ausgehend von einer Stammlösung mit einer jeweiligen Zytokinkonzentration von 1 µg/ml wurde eine zehnstufige $log_2$-Verdünnungsreihe mit dem Konzentrationsbereich 0,039-20 ng/ml im Probenmedium (s.o.) angesetzt.

Nach Zugabe von 25 µl PBS-Tween + 1 % BSA in jedes well wurden dann 25 µl Standard oder Probe in die zugehörigen Wells gegeben, die blanks erhielten 25 µl des Probenmediums. Alle Ansetzungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Im Anschluss wurde die Platte für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und unter den Standardbedingungen gewaschen.

Zugabe der Detektions-Antikörper:

Die biotinylierten Detektions-Antikörper wurden zuerst in PBS-Tween + 1 % BSA verdünnt. Dann wurden in jedes Well 50 µl des verdünnten Antikörpers pipettiert, worauf sich eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde anschloss. Daraufhin wurde die Platte erneut gewaschen.

Zugabe von Streptavidin-Peroxidase:

Der Komplex Streptavidin-Peroxidase (Boehringer/Roche Mannheim) wurde in PBS-Tween + 1 % BSA mit dem Faktor 1:10000 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden nun 100 µl pro well zugegeben. Anschliessend wurde die Platte für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach gewaschen.

Zugabe von Substrat:

Eine 10 mg OPD-Tablette (O-Phenylendiamin-Tabletten; SIGMA-ALDRICH Steinheim, Deutschland) wurde in 10 ml Substratpuffer (7,3 g Zitronensäure x $H_2O$; 11,87 g $Na_2HPO_4$ x 2 $H_2O$; gelöst in 1 l Aqua dest., pH 5,0) 15 Minuten vor Gebrauch gelöst. Hiezu wurden 5µl $H_2O_2$ (30%ige Lösung) gegeben. 100 µl dieser Substratlösung wurden pro Well pipettiert. Nach 20 Minuten wurde die Substratreaktion durch Zugabe von 25 µl 2,5 % $H_2SO_4$ abgestoppt.

Messung:

Die Farbreaktion wurde an einem Photometer bei 490 nm gegen 630 nm gemessen.

**Details zu den einzelnen Zytokin ELISAs:**

TNFα:

- Beschichtungsantikörper: hamster anti-rat TNFα (0,5 mg/ml)
  BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
- Verdünnung: 1 : 250 in Beschichtungspuffer

- Detektionsantikörper: Biotin rabbit anti-rat TNFα (0,5 mg/ml)
  BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
- Verdünnung: 1 : 250 in PBS-Tween + 1 % BSA

IL-10:

- Beschichtungsantikörper: mouse anti-rat IL-10 (0,5 mg/ml)
  BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
- Verdünnung: 1 : 250 in Beschichtungspuffer

- Detektionsantikörper: Biotin mouse anti-ratIL-10 (0,5 mg/ml)
  BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
- Verdünnung: 1 : 250 in PBS-Tween + 1 % BSA

MCP-1:

- Beschichtungsantilörper: anti-rat MCP-1 (0,5 mg/ml)
  BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
- Verdünnung: 1 : 125 in Beschichtungspuffer

- Detektionsantikörper: Biotin anti-rat MCP-1 (0,5 mg/ml)
  BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA
- Verdünnung: 1 : 250 in PBS-Tween + 1 % BSA

MCP-1 - Probenverdünnung: Aufgrund der hohen MCP-1 Konzentrationen mussten die Proben 1 : 5 im Probenmedium verdünnt werden, d.h. es wurden 5 µl Probe und 20 µl Medium eingesetzt.

### 2.2.3 Oxidativer/Antioxidativer Metabolismus von Alveolarmakrophagen

#### 2.2.3.1 Analysen der Superoxidradikalfreisetzung durch Alveolarmakrophagen

Prinzip des Superoxidradikalnachweises mittels Chemolumineszenz:

Im Prozess des "respiratory burst", z.B. mit Zymosan, sind Alveolarmakrophagen in der Lage, nach Stimulation hochreaktive Metabolite wie Superoxidradikale ($SO^-$) zu bilden. Während der anschließenden spontanen und enzymatischen Umsetzung von $SO^-$ entstehen energetisch instabile Zwischenprodukte, die bei Rückkehr in ihren Grundzustand Licht definierter Wellenlänge abgeben. Dieses Phänomen der natürlichen Chemolumineszenz kann durch Lucigenin verstärkt werden, so dass eine Messung der Lichtemission möglich wird, die dann mit der Menge des gebildeten $SO^-$ in den Zellen korreliert.

Für die intrazelluläre $SO^-$-Produktion sind zwei Enzymsysteme verantwortlich: die membranständige NADPH-Oxidase und der Komplex III der mitochondrialen Atmungskette. Durch Zugabe der selektiven Enzymhemmstoffe Antimycin (Komplex III-Inhibition) und Diphenyleneiodonium (DPI; Inhibition der NADPH-Oxidase) kann die $SO^-$-Produktion näher charakterisiert werden.

Reagenzien:

| | |
|---|---|
| Medium: | RPMI 1640 mit Zusätzen und 5 % inaktiviertem FCS (analog zum Medium aus 2.2.2.1.1, mit dem Unterschied, dass FCS in der Konzentration von 5 % eingesetzt wurde) |
| Zymosan-Lösung: | Zymosan A (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) mit einer Konzentration von $160 \times 10^{-7}$ Partikel/ml, angesetzt in Medium. |
| Lucigenin-Lösung: | 4,8 mg Lucigenin (Sigma-Aldrich) in 10 ml Medium gelöst. |
| Antimycin-Lösung: | Antimycin (Antimycin A from Streptomyces sp., Sigma-Aldrich) in sechs Konzentrationen im Bereich von $3 \times 10^{-6}$ M bis $1 \times 10^{-4}$ M, in Medium. |
| DPI-Lösung: | DPI (Diphenyleneiodonium, Sigma-Aldrich) in sechs Konzentrationen in einem Bereich von 0,3 bis 100 µM, in Medium. |

| | |
|---|---|
| DMSO-Lösung/Ethanol-Lösung: | Analog wurden Verdünnungsreihen von den Lösungsmitteln der jeweiligen Inhibitoren-Stammlösungen in den entsprechenden Konzentrationen (DMSO für DPI; Ethanol abs. für Antimycin) angefertigt, um später Lösungsmitteleffekte ausschliessen zu können. |
| Zellsuspension: | Das BAL-Zellpellet wurde mit einer Endkonzentration von $2x10^{-6}$ Zellen/ml in dem oben beschriebenen Medium aufgenommen. |

**Versuchsdurchführung:**

Zuerst wurden die Platten (Fluoronunc Maxisorp, weiss) mit jeweils 200 µl Zellsuspension pro Well für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden 2,5 µl der jeweiligen Inhibitoren (bzw. Medium) in die entsprechenden Wells zupipettiert und daraufhin erneut bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Anschliessend erfolgte in jedes Well die Zugabe von 25 µl der Lucigenin-Lösung und die Zellstimulation mit 25 µl der Zymosan-Lösung (bzw. Zugabe von 25 µl Medium), worauf sich umgehend die Messung im auf 37°C vorgeheizten Chemolumineszenzmessgerät (LUMIstar, BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland) anschloss. Es galten folgende Messbedingungen: 50 Messzyklen von je 120 Sekunden mit einer Messzeit von 2,5 Sekunden pro well. Die Daten wurden auf dem angeschlossenen PC gespeichert und mittels zugehöriger Software ausgewertet.

### 2.2.3.2 SOD-Funktionsassay

**Prinzip des Funktionsassays:**

Zur Untersuchung der Enzymfunktion wurde ein vorgefertigter KIT (BIOXYTECH SOD-525TM Assay; Oxis international, Portland, USA ) verwendet.

Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Bildung von Wasserstoffperoxid und Sauerstoff aus Superoxid und Protonen:

$$2\,SO^- + 2H^+ \xrightarrow{\textbf{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

Die Methode des SOD-Assays beruht auf dem SOD-vermittelten Anstieg der Oxidation des Reagenzstoffes R1 (5,6,6a,11b-Tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzofluoren) in einen bisher nicht näher charakterisierten Farbstoff. Dieser Farbumschlag kann bei einem Absorptionsmaximum von 525 nm mit einem Photometer kinetisch gemessen werden.

Die SOD-Aktivität kann nun aus dem Verhältnis der Oxidationsraten von Proben und Leerwerten errechnet werden, wobei eine SOD-Aktivitätseinheit als die Aktivität definiert wurde, die doppelt so hoch ist wie die Oxidationsrate des Leerwertes. Um Interferenzen mit Merkaptanen wie z.B Glutathion zu vermeiden, wurden die Zellen mit einem Reagenz R2 (1,4,6-Trimethyl-2-vinylpyridinium trifluormethansulfonat, in HCl) vorinkubiert, um die Merkaptane durch Alkylierung direkt zu eliminieren.

**Probenaufbereitung:**

Aus der BAL-Zellsuspension wurde jeweils ein Volumen mit $2x10^{-6}$ Zellen entnommen, dieses mit PBS auf 10 ml aufgefüllt, zentrifugiert (1200°, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl SOD-Puffer aufgenommen. Durch fünf Frier-/Tauzyklen wurden die Zellen lysiert. Anschliessend wurde diese Lösung zentrifugiert (8500°, 10 min, 4°C), um die im Überstand gelösten Proteine von sich im Pellet absetzendem Zelldebris zu isolieren. Um Messartefakte durch Schleimrückstände im Überstand zu vermeiden, wurde der abgenommene Überstand nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und anschließend analysiert.

**Vorbereitung des SOD-Assays:**

Vor Beginn der Messungen wurde die für den Versuchstag erforderliche Menge SOD-Puffer abgefüllt und offen in ein 37°C-Wasserbad gestellt, um durch

Äquillibrierung mit Luft eine Sauerstoffsättigung des Puffers sicherzustellen. Die zum Gebrauch fertigen Reagenzien R1 und R2 wurden wie die Proben auf Eis gestellt. Das Spektrophotometer wurde so eingestellt, dass zu Beginn jeder Messung ein 0-Abgleich gegen die jeweilige Probe durchgeführt wurde und anschliessend für eine Minute alle zwei Sekunden die Absorption bei 525 nm gemessen wurde.

**Durchführung des SOD-Assays:**

Zu Beginn wurden 900 µl SOD-Puffer, 40 µl Probe und 30 µl R2 in ein Eppendorf-Tube pipettiert, kurz durchmischt und dann für eine Minute in einem 37°C Wasserbad inkubiert. Anschliessend wurden 30µl R1 zugegeben, alles vorsichtig durchmischt, umgehend in eine 1 ml Messküvette überführt und sofort mit der kinetischen Messung begonnen. Aus den Ergebnissen der einminütigen Messung wurde die SOD-Aktivität der jeweiligen Probe berechnet.

Zur Testüberprüfung und zur Sicherstellung des Messbereichs als validen Konzentrationsbereich wurde eine $log_2$-Verdünnungsreihe einer rekombinanten SOD analysiert.

### 2.2.3.3 GPx-Funktionsassay

**Prinzip des GPx-Funktionsassays:**

Zur Untersuchung der Enzymfunktion wurde ein vorgefertigter KIT (BIOXYTECH GPx-340TM ASSAY, OXIS international, Portland, USA) verwendet. Das Enzym Glutathion-Peroxid (GPx) katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid bzw. organischen Peroxiden (R-O-O-H) zu Wasser bzw. den korrespondierenden stabilen Alkoholen (R-O-H), wobei Glutathion (GSH) als Reduktionsäquivalent genutzt wird und oxigeniertes Glutathion (GSSG) entsteht:

$$\text{R-O-O-H} + 2\ \text{GSH} \xrightarrow{\text{GPx}} \text{R-O-H} + \text{GSSG} + H_2O$$

Der GPx-Assay misst indirekt die Aktivität der zellulären GPx.

Das bei der Reaktion entstandene GSSG wird in einer zweiten Reaktion rückreduziert, wobei NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduziert) zu $NADP^+$ (Nicotinamid-Adenin Dinukleotid Phosphat, oxidiert) oxidiert wird. Die

NADPH-Abnahme kann nun in der Absorptionsabnahme bei 340 nm (A340) mit einem Spektrophotometer gemessen werden. Aus der Absorptionsabnahme kann anschließend die Aktivität der GPx berechnet werden, wobei folgendes Verhältnis zugrundegelegt wird:

1 mU/ml GPx = 1 nmol NADPH/min/ml = (A340/min) / 0,00622

**Probenaufarbeitung:**

Die Probenaufarbeitung erfolgte analog der Probenaufarbeitung beim SOD-Assay (2.2.3.2), mit der Ausnahme, dass anstatt des SOD-Puffers das Zellpellet in einem GPx-Assay-Puffer aufgenommen wurde.

**Assayvorbereitung:**

Das NADPH-Reagent (NADPH, Glutathion und Glutathion-Reduktase) wurde durch Zugabe von 7,5 mL Assay-Puffer pro Vial gelöst und wie der Assay-Puffer auf Raumtemperatur gebracht. Die organische Peroxid-Lösung wurde als 1:10000-Verdünnung aus der Peroxid-Stammlösung in Aqua dest. angesetzt.

Das Spektrophotometer wurde so eingestellt, dass die Absorption bei 340 nm von jeder Probe über drei Minuten in einem Intervall von 10 sec. gegen Aqua dest. gemessen werden konnte.

**Durchführung des GPx-Assays:**

Direkt am Spektrophotometer wurden in eine 1 ml-Messküvette 190 µl GPx-Assay-Puffer, 225 µl NADPH-Reagent und 80 µl Probe pipettiert. Nachdem die Küvette im Spektrophotometer plaziert wurde, wurden nun 225 µl der Organischen-Peroxid-Lösung hinzupipettiert. Nach kurzer Durmischung des Küvetteninhalts wurde die Messung umgehend begonnen. Die Absorptionsergebnisse der dreiminütigen Messung wurden anschliessend ausgedruckt.

### 2.2.3.4 LDH-Zytotoxizitätsassay

**Prinzip:**

Zur Interpretation der funktionellen Aktivität der Zellen bezüglich des Superoxid-Vorkommens war es erforderlich, im Anschluss an den Versuch den Anteil

toter Zellen in der Probe zu bestimmen. Dies erfolgte mittels eines LDH-Zytotoxizitätsassays (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Madison, USA), dem die Linearität zwischen LDH-Konzentration im Überstand und dem Anteil toter Zellen zugrunde liegt. Die LDH-Enzymaktivität führt nach einer NADH-abhängigen Zwischenreaktionen zu der Umsetzung eines Farbstoffes, der photometrisch quantifiziert werden kann.

**Durchführung:**

Der LDH-Zytotoxizitäts-Kit wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Zur Bestimmung der Gesamt-LDH-Menge pro Probe wurden 200 µl der Zellsuspension von jedem Tier mit 50 µl Medium aufgefüllt und die Zellen mittels 5 Frier/Tauzyklen lysiert.

Zur Messung wurden dann je 50 µl des zellfreien Überstandes der vorher zentrifugierten Chemolumineszenzplatten (1200°, 4°C, 5 min) bzw. 50 µl des Überstandes der Zelllysate mit jeweils 50 µl des Assay-Substratmixes zusammengegeben, worauf sich eine 30 minütige lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur anschloss. Nach anschließender Zugabe von 50 µl der Assay-Stop-Lösung wurde die Absorption bei 490 nm im Photometer gemessen.

Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung des Quotienten der Absorption der jeweiligen Chemolumineszenz-Probe durch die Absorption der zugehörigen Zelllysat-Probe, so dass die Zelltodrate in Prozent berechnet werden konnte.

### 2.2.3.5 Protein-Assay

**Prinzip:**

Um die Ergebnisse der Enzymfunktionsassays auswerten zu können, war es erforderlich, die gemessene Aktivität der Enzyme auf die Gesamt-Proteinkonzentrationen der in die Messung eingesetzten Proben zu beziehen. Zur Proteinbestimmung wurde der BCA Protein Assay Kit (PIERCE, Rockford, USA) verwendet. Der Assay basiert auf der Reduktion von $Cu^{2+}$ zu $Cu^{1+}$ durch Proteine in alkalischem Medium. Das enstandene Kupfer-Kation bildet nun mit bicinchoninischer Säure („bicinchoninic acid“, BCA) einen Chelatkomplex, der wiederum Licht mit einer

Wellenlänge von 562 nm stark absorbiert. So kann die Proteinkonzentration in dem linearen Messbereich von 20 µg/ml bis 2000 µg/ml photometrisch bestimmt werden.

**Durchführung:**

Der BCA Protein Assay Kit wurde entsprechend der Vorgaben durchgeführt. Die Proteinstandardreihen mit einem Konzentrationsbereich von 25 µg/ml bis 2000 µg/ml wurden in den zum jeweiligen Enzymassay gehörenden Standardpuffern angesetzt. Die Proben wurden vor Assaybeginn in einem Verhältnis von 1:5 in dem zum jeweiligen Enzymassay gehörigen Standardpuffer vorverdünnt, da Vorversuche eine hohe Proteinkonzentration erwarten liessen. Nun wurden jeweils 25 µl dieser Probenverdünnung, der Standardansätze oder des für die Leerwertbestimmung eingesetzten Standardpuffers mit 200 µl des BCA-Reagenz zusammengegeben. Nach einer Inkubation für eine Stunde bei 37°C und einer anschliessenden 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde dann die Absorption der Proben bei 562 nm photometrisch gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Auswertung wurde aus den Messwerten der Protein-Standardreihen eine Standardkurve berechnet, anhand derer die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt werden konnten.

### 2.2.3.6 RNA-Präperation

Zur Analyse der mRNA-Expression für verschiedene Mediatoren in BAL-Zellen wurde aus den Zellen zunächst die RNA präpariert. Nach der in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Zellaufarbeitung wurden die Zellpellets in 1 ml Trizol aufgenommen. Zur optimalen Lösung der Zellen wurde die DNA durch mehrmalige Aspiration mit einer 1 ml-Spritze und immer feineren Kanülen geschert. Anschliessend wurde zu jeder Probe 200 µl Chloroform gegeben, kräftig gemischt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte eine 30-minütige Zentrifugation mit 12000 rpm bei 4°C. Nun wurde die wässrige Phase, in der die RNA gelöst ist, vorsichtig abpipettiert. Zur RNA-Fällung wurden dann in diese Proben jeweils 500 µl Isopropanol pipettiert und wieder gut gemischt. An die folgende 30-minütige Inkubation bei 4°C schloss sich ein ebenfalls 30-minütiger Zentrifugationsschritt mit 12000 rpm bei 4°C an. Die entstandenen Zellpellets wurden nun einmal mit je 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, für 10 Minuten mit 7500 rpm bei 4 °C zentrifugiert und anschliessend für 15 Minuten bei Raumtemperatur

getrocknet. Die RNA wurde dann in 20 µl Aqua dest. gelöst und für eine Stunde auf Eis gestellt. Um später bei der cDNA-Synthese von jeder Probe exakt die gleiche RNA-Menge einsetzen zu können, wurden nun die RNA-Konzentrationen der jeweiligen Lösungen bestimmt. Dies erfolgte mittels photometrischer Messung, indem die Absorption der 1:750 in Aqua dest. verdünnten Proben bei 260 nm gemessen wurde. Unter der Verwendung des spezifischen Absorptionskoeffizienten für RNA wurde daraus die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe berechnet. Um eine Verunreinigung der Proben mit Proteinen oder Salzen auszuschliessen, wurde gleichzeitig die Absorption bei 280 nm gemessen. Anschliessend wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm berechnet und nur Proben verwendet, bei denen dieser Quotient zwischen 1,6 und 2,0 lag.

### 2.2.3.7 cDNA-Synthese

Im nächsten Schritt wurde aus der aufgereinigten RNA (siehe 2.2.3.6) cDNA synthetisiert. Dieser Schritt ist erforderlich, um anschließend diese cDNA-Bibliotheken auf das Vorhandensein bestimmter Gene mittels PCR untersuchen zu können.

**DNAse-Verdau:**

Um sicherzustellen, dass keine DNA-Kontamination in den Proben vorhanden ist, wurde zunächst ein DNAse-Verdau der RNA-Probe durchgeführt. Hierzu wurde ein DNAse Kit (Dnase I, GIBCO BRL, Berlin) verwendet. Entsprechend der Kit-Vorschrift wurde 1 µg RNA mit A.dest auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt und hierzu 1 µl DNAse-Puffer und 1 µl DNAse-I hinzugegeben. Nach Durchmischung dieser Lösung folgte ein 15-minütiger Inkubationsschritt bei Raumtemperatur und daraufhin die Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA zum Abstoppen des DNAse-Verdaus. Hieran schloss sich, wiederum nach kurzem Durchmischen, eine 10 minütige Inkubation bei 65°C an, wonach die Proben umgehend auf Eis gestellt wurden.

**cDNA-Synthese:**

Für die nun folgende cDNA-Synthese wurde ebenfalls ein vorgefertigter Kit (Omniscript RT-Kit, Quiagen, Hilden) verwendet. Hierzu wurden entsprechend der Kit-Anleitung zu 10 µl der nach DNA-Verdau erhaltenen RNA-Probe 2 µl RT-Puffer,

2 µl dNTPs (Nukleotid-Mix), 1 µl Oligo-dT, 1µl Reverse Transkriptase und 4 µl A.dest hinzupipettiert, so dass die Proben nun ein Gesamtvolumen von 20 µl hatten. Nach erneuter Durchmischung und Anzentrifugation wurden die Proben für 1 Stunde bei 37°C und daraufhin 5 Minuten bei 93°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde daraufhin umgehend bei –20°C gelagert.

### 2.2.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mitte der achtziger Jahre wurde die "Polymerase-Kettenreaktion" (PCR) von Kary Mullis entwickelt. Dabei handelt es sich um eine Methode zur Amplifikation eines genau definierten Nukleinsäurebereiches, wozu als Voraussetzung einzig die Kenntnis zweier begrenzender Oligonukleotidsequenzen benötigt wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass mit extrem kleinen Mengen an Ausgangsmaterial gearbeitet werden kann.

**Prinzip:**

Zur Durchführung einer PCR benötigt man neben der hergestellten cDNA, die als Matritze fungiert, zusätzlich noch die Kenntnis von zwei Oligonukleotidsequenzen, die den zu amplifizierenden Genabschnitt begrenzen. Komplementär zu diesen Sequenzen stellt man nun synthetische Oligonukleotidsequenzen als Primer her. Nach Trennung der cDNA-Doppelstränge durch Erwärmung können nun diese Primer mit den komplementären DNA-Sequenzen hybridisieren. Mittels einer zugegebenen thermostabilen Polymerase, der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus Aquaticus*, wird dann jeweils ausgehend von den Primern ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Der Primärstrang und der neusynthetisierte Strang werden daraufhin durch Erwärmung erneut getrennt, so dass sie anschliessend wieder mit komplementären Primern hybridisieren können. Durch Wiederholung dieses Synthesezyklus lässt sich eine vieltausendfache Amplifikation der ursprünglichen DNA erreichen. Von besonderem Vorteil ist es bei dieser Methode, dass die Taq-DNA-Polymerase hitzestabil ist und sich somit die aufeinanderfolgenden Strangtrennungs- und Hybridisierungsschritte abwechseln können, ohne dass das Enzym erneut zugegeben werden muss oder Reinigungsschritte erforderlich werden. Da die neusynthetisierten DNA-Stränge von der zweiten Generation an eine einheitliche, definierte Länge

aufweisen, lassen sie sich nach Beendigung der PCR durch Gelelektrophorese nachweisen.
Um gleiche Ausgangsbedingungen der zu vergleichenden Proben bezüglich der RNA-Qualität sowie der Methodik der cDNA-Synthese sicherzustellen, führt man für jede Probe auch eine PCR für ein „house-keeping“ Gen, z.B. mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), durch. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass es in allen Zellen unabhängig vom jeweiligen Aktivierungsgrad konstitutiv exprimiert werden, woraus sich die englische Bezeichnung ableitet. Nur wenn zwei Proben in der “house-keeping gene PCR” eine vergleichbare Expression aufweisen, können die Ergebnisse anderer Gene dieser Proben miteinander verglichen werden.

**Die PCR wird in drei Schritte gegliedert:**

1. **Denaturierung:**
   In jedem Reaktionszyklus ist eine einminütige Hitzebehandlung bei 94 °C erforderlich, um die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix zu trennen.

2. **Anlagerung:**
   In diesem Schritt hybridisieren die beiden Primer spezifisch mit den komplementären DNA-Sequenzen. Die optimale Temperatur ist für jeden Primer unterschiedlich, da eine Abhängigkeit von der Primer-Sequenz besteht. In den meisten Fällen liegt sie zwischen 57 - 65°C.

3. **Polymerisation, Kettenelongation**
   In dieser PCR-Phase, die meist bei 72°C abläuft, werden die komplementären DNA-Stränge gebildet: durch die DNA Polymerasen werden an das 3´-Ende der Primer komplementär zum jeweils eingesetzten Strang Desoxyribonukleotid-Triphosphate angehängt.

Diese drei Schritte sind der Kern der Polymerase-Kettenreaktion, die zur effizienten DNA-Amplifizierung mehrfach wiederholt werden müssen. In der Regel benötigt man eine Zykluszahl im Bereich von 22 - 35 Zyklen, abhängig von der Menge der zu analysierenden spezifischen RNA in den entsprechenden Proben.

**Benötigte Reagenzien:**

Die PCR wurde mit einem vorgefertigten Kit (HotStarTaq-MasterMix, Quiagen, Hilden) durchgeführt.

**Primer:**

Die Sequenzen der Primer wurden für die entsprechenden Gene der Ratte aus der EMBL-Genbank (Heidelberg) entnommen. Anhand der Sequenzen wurden spezifische Primer entworfen, die dann von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert wurden.

Dies waren im einzelnen:

| | | |
|---|---|---|
| **Katalase:** | sense: | 5´-GTC CAG AGT CTC TCC ATC AG-3´ |
| | AS: | 5´-CAC AGG TAT ATG CAG ATA GT-3´ |
| **GPx-1:** | sense: | 5´-ACA GTC CAC CGT GTA TGC CT-3´ |
| | AS: | 5´-CGC CTG CTG TAT CTG CGC AC-3´ |
| **Cu/Zi SOD:** | sense: | 5´-TGT CAG GAC AGA TTA CAG GA-3´ |
| | AS: | 5´-AGC AGA TGC CGT CTG AGA CT-3´ |
| **MnSOD:** | sense: | 5´-GCG CAG ATC ATG CAG CTG CA-3´ |
| | AS: | 5´-CAG ATA GTC AGG TCT GAC GT-3´ |
| **rEC-SOD:** | sense: | 5´-TTC CCA GCC GAG CAG AAC AC-3´ |
| | AS: | 5´-CTT GCG CTC CTT TGT CTG GC-3´ |
| **GPx-3:** | sense: | 5´-TTC GGC CTG GTC ATT CTG GG-3´ |
| | AS: | 5´-TGC CTG CCG CCT CAT ATA GG-3´ |

**Durchführung:**

Die Ausführung der PCR erfolgte vollautomatisch in einem PCR-Gerät "Touch Down " der Firma Hybaid, Heidelberg. Die Vorversuche zur Temperaturoptimierung wurden mit einem PCR-Gerät "Mastercycler gradient" der Firma Eppendorf, Hamburg durchgeführt. Beide Geräte waren mit einem beheizbaren Deckel ausgestattet.

Die PCR-Ansätze wurden entsprechend der Herstellerangaben des verwendeten Kits pipettiert:
In ein 0,5 ml Eppendorfgefäß wurden 25 µl HotStarTaq-Mastermix, 22 µl A.dest. und jeweils 1 µl sense-Primer (50 pmol/µl) und 1 µl antisense-Primer (50 pmol/µl) pipettiert. Daraufhin wurde jeweils 1 µl cDNA, bzw. für die Negativkontrolle 1 µl A.dest., zu dem Mix hinzugefügt, so dass der Ansatz ein Gesamtvolumen von 50 µl aufwies.
Nach Durchmischung wurde die PCR mit folgendem Protokoll durchgeführt:

**PCR-Standardprotokoll**:

| | | |
|---|---|---|
| **(1)** | **95°C,** | **15 min** |
| **(2)** | **94°C,** | **1 min** |
| **(3)** | **x°C,** | **40 s (Temperatur x für jedes Gen spezifisch)** |
| **(4)** | **72°C,** | **1 min** |

anschliessend Wiederholung der Schritte (2) – (4) mit für jedes Gen spezifischer Zykluszahl

**(5) 72°C, 10 min**

Anschliessend wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung auf 4 °C gekühlt bzw. bei –20 °C weggefroren.

**Spezifische PCR-Bedingungen der einzelnen Gene:**

- GAP-DH: 62 °C in PCR-Schritt (3), 24 Zyklen
- GPx-3: 60 °C in PCR-Schritt (3), 30 Zyklen
- rec-SOD: 60 °C in PCR-Schritt (3), 37 Zyklen
- Mn-SOD: 62 °C in PCR-Schritt (3), 28 Zyklen
- Cu/Zn-SOD: 57 °C in PCR-Schritt (3), 30 Zyklen
- GPx-1: 60 °C in PCR-Schritt (3), 22 Zyklen
- Katalase: 60 °C in PCR-Schritt (3), 26 Zyklen

**Gelelektrophorese:**

**Prinzip:**

Moleküle wie die amplifizierten Genabschnitte tragen in Abhängigkeit vom pH-Wert ihrer Umgebung eine unterschiedliche Anzahl positiver und negativer Ladungen. Die Beweglichkeit dieser Ionen im elektrischen Feld ist abhängig von dem Verhältnis von Ladung zu Molekülgröße sowie von der angelegten Spannung, so dass die Trennung von unterschiedlichen Genabschnitten durch Anlegen eines elektrischen Feldes im Gellauf erfolgen kann. Nachfolgend werden die unterschiedlichen Moleküle mit Ethidium-Bromid angefärbt. Diese Substanz interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren, so dass die auf diese Weise angefärbten Gene nach Anregung durch UV-Licht als leuchtende Banden sichtbar werden und zur digitalen Gel-Dokumentation photografiert werden können.

**Duchführung:**

Es wurde ein 1,2 % Agarose-Gel hergestellt, indem 1,2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und anschliessend in eine Kammer gegossen wurde. Nach mindestens 30 minütiger Abkühlphase konnten die Gele für die Elektrophorese eingesetzt werden. Hierbei wurde als Laufpuffer 1xTAE-Puffer verwendet, der so in die Kammer gegossen wurde, das der Pufferspiegel das Gel um wenige Millimeter überragte. Nach dem Pipettieren der aufzutrennenden PCR-Proben in die Geltaschen wurde eine Spannung von 70 mV angelegt und somit die Elektrophorese begonnen. Nach 1-2 Stunden wurde das Gel vorsichtig in ein Ethidium-Bromid-Färbebad gegeben und unter langsamem Schwenken für 15 Minuten angefärbt. Im Anschluß an kurzes Schwenken im Entfärbebad wurde das Gel nun zur Dokumentation fotographiert. Die densitometrische Auswertung des Fotos erfolgte mittels Bio1D Analyse-System (Vilbert-Lourmat, Marne la Vallée, France).

# 3 ERGEBNISSE

## 3.1 Radikalfreisetzung von BAL-Zellen

Die Zielsetzung der Arbeit bestand in der Untersuchung des Radikal-Stoffwechsels von BAL-Zellen von Tieren nach unterschiedlich langer $NO_2$-Exposition (24 Stunden, 3 Tage, 20 Tage) im Vergleich zu BAL-Zellen gesunder Kontrolltiere.

Im $NO_2$-Tiermodell setzen sich die in der BAL gewonnen Zellen in erster Linie aus neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen zusammen, wobei in der akuten Phase der Entzündung neutrophile Granulozyten in der BAL ansteigen, im weiteren chronischen Verlauf aber wieder abfallen. Demgegenüber erscheinen Alveolarmakrophagen in der BAL während des gesamten Beobachtungszeitraumes signifikant vermehrt vorzufinden zu sein.

Die Produktion von Superoxidradikalen ist für professionelle Phagozyten wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten ein essentieller Bestandteil ihrer Effektorfunktion. Dank ihrer hohen Toxizität haben diese Moleküle eine wesentliche Bedeutung bei der Abwehr von infektiösen Mikroorganismen, indem ihre Freisetzung nach Phagozytose dieser Erreger ein Abtöten derselben ermöglicht.

Untersucht wurden nun zuerst die Reaktionen von BAL-Zellen aus Tieren, die für 24 Stunden, 3 Tage oder 20 Tage einer $NO_2$-Exposition ausgesetzt waren, auf Stimulation durch Zymosan-Partikel, um die Ergebnisse mit den Reaktionen von BAL-Zellen unbehandelter Kontrolltiere zu vergleichen. Hierbei bestimmten wir das Entstehen von Superoxidradikalen mittels Messung der Lucigenin-verstärkten Chemolumineszenz. Durch Zugabe der selektiven Enzyminhibitoren Antimycin und DPI führten wir anschließend eine nähere Charakterisierung dieses Radikal-Metabolismus durch.

Daraufhin wurde aus den Zellen der 4 Tiergruppen die RNA isoliert, um die Expression verschiedener Gene des Radikal-Stoffwechsels mittels rt-PCR nachzuweisen.

Abschliessend wurden die Enzymaktivitäten der SOD und der GPx in BAL-Zellen der unterschiedlichen Tiergruppen mittels Funktionsassays untersucht.

### 3.1.1 Superoxid-Produktion von BAL-Zellen nach $NO_2$-Exposition

Die Phagozytose von Zymosanpartikeln ist ein Stimulationsreiz für BAL-Zellen, um reaktive Sauerstoffradikale zu bilden. Wir untersuchten die Superoxidproduktion von BAL-Zellen nach $NO_2$-Exposition für 24 h, 3 Tage oder 20 Tage im Vergleich zu Zellen von nicht exponierten Ratten mittels Chemolumineszenz-Messung unter Zugabe des Lichtverstärkers Lucigenin nach in vitro-Stimulation mit Zymosan.

Im Gegensatz zu der Superoxid-Produktion von BAL-Zellen aus Kontrolltieren konnten wir in Zellen sämtlicher Expositionsgruppen eine signifikant verminderte Superoxid-Entstehung nachweisen. Dieser auch schon in Zellen von Tieren nach 24 Stunden $NO_2$-Exposition zu beobachtende Effekt verstärkte sich mit länger dauernder Einwirkung von $NO_2$, so dass wir eine nochmals reduzierte Produktion von Superoxidradikalen nach 3- und 20-tägiger Exposition feststellen konnten. Abbildung 1 zeigt exemplarisch den typischen Verlauf der Chemolumineszenzfreisetzung durch Zellen von jeweils einem Tier jeder Behandlungsgruppe nach Phagozytose-Stimulus. Dabei war nicht nur das Ausmaß der Superoxidproduktion nach $NO_2$-Exposition verändert, sondern auch die Kinetik der Superoxid-Freisetzung zeigte bei BAL-Zellen von Tieren nach 3- und 20-tägiger Exposition eine deutliche Verzögerung. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, setzt die Produktion von Superoxidradikalen bei Zellen dieser Gruppen erst protrahiert ein.

**Abbildung 1:**

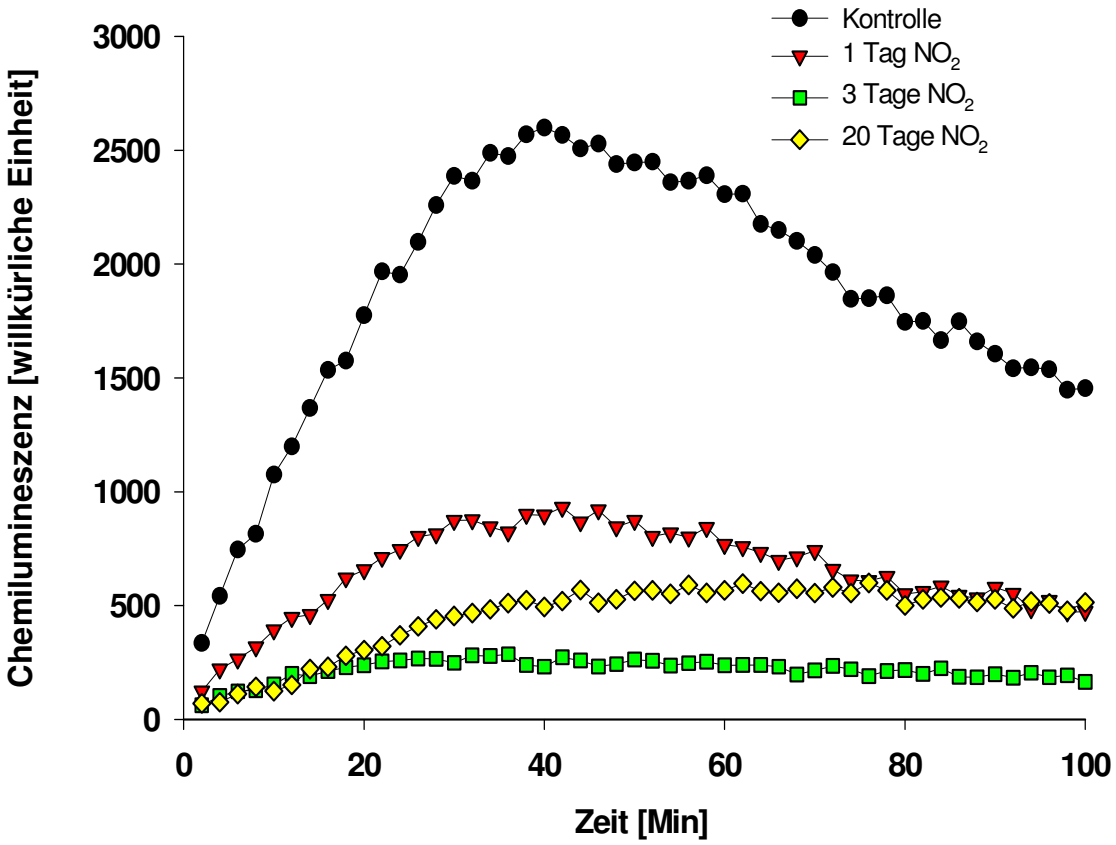


**Abb. 1:** Superoxid-Freisetzung von BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Tiere und von Kontrolltieren. Nach in vitro-Stimulation mit Zymosan wurde die Lucigenin-verstärkte Chemolumineszenz in einem Zeitraum von 100 Minuten nach Stimulation gemessen. Dargestellt sind repräsentative Chemolumineszenz-Verlaufskurven eines einzelnen Tieres jeder Behandlungsgruppe.

In Abbildung 2 ist die Reduktion der Chemolumineszenzbildung mit länger dauernder Einwirkung von $NO_2$ zu erkennen, dargestellt ist hier der Mittelwert der integrierten Chemolumineszenzmessungen von 16 Tieren pro Versuchsgruppe.

**Abbildung 2:**

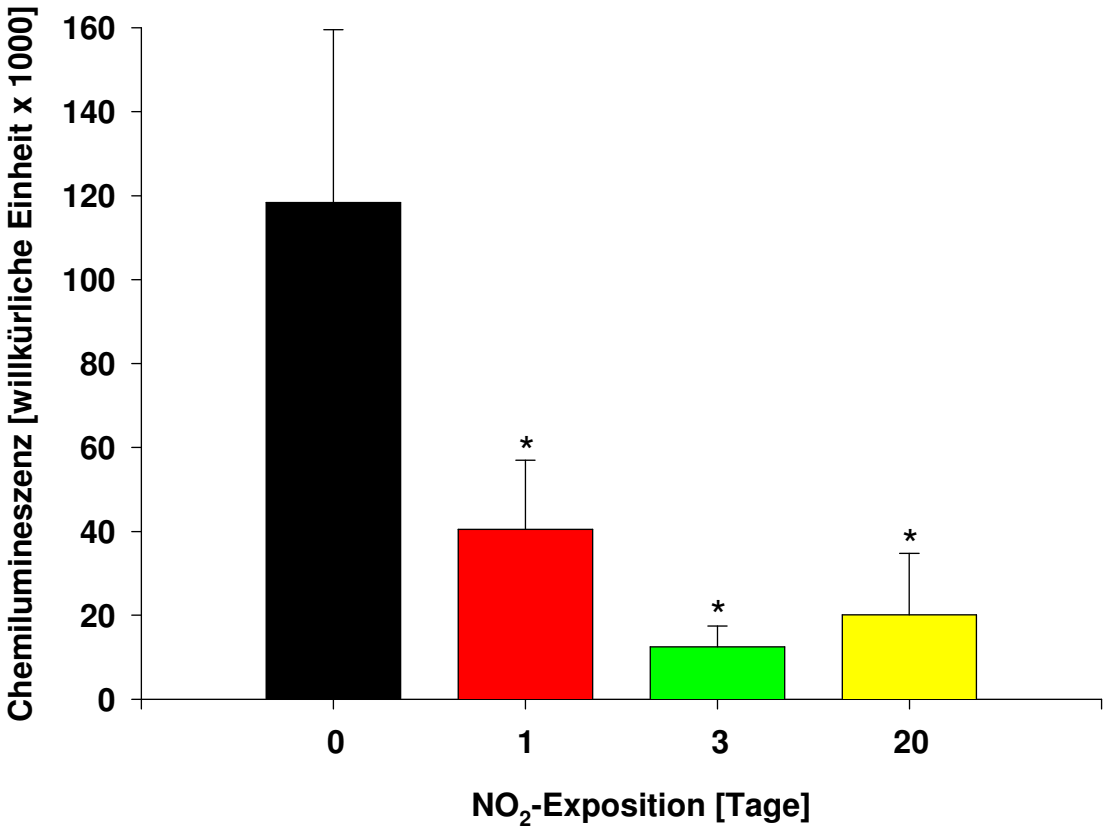


**Abb. 2:** Superoxid-Freisetzung von BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Tiere und von Kontrolltieren. Nach in vitro-Stimulation mit Zymosan wurde die Lucigenin-verstärkte Chemolumineszenz in einem Zeitraum von 100 Minuten nach Stimulation gemessen. Dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung der Integrale der Chemolumineszenzfreisetzung von Zellen von jeweils 16 individuell gemessenen Tieren pro Behandlungsgruppe. * Signifikante statistische Abweichungen der $NO_2$-exponierten Gruppen zur Kontrollgruppe, $p < 0,05$.

### 3.1.2 Hemmung der Superoxid-Produktion

Für die Produktion von Superoxidradikalen sind zwei Enzymsysteme von besonderer Bedeutung: die in der Zellmembran lokalisierte NADPH-Oxidase und der Komplex III der mitochondrialen Atmungskette. Durch Zugabe zweier Inhibitoren dieser Enzymsysteme sollte die abgeschwächte Superoxid-Produktion durch BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Ratten näher charakterisiert werden, indem das für diesen Abfall primär verantwortliche Enzymsystem determiniert werden sollte. Daher war es zunächst erforderlich, optimale Inhibitorkonzentrationen mit dem Einsatz in unserem

Analysesystem zu ermitteln, wozu unterschiedliche Konzentrationen der beiden Inhibitoren Antimycin und DPI getestet wurden.

Antimycin als spezifischer Inhibitor des Komplexes III der mitochondrialen Atmungskette führt in einem breiten Konzentrationsbereich zu einer relativ konstanten Hemmung der Superoxidproduktion auf knapp die Hälfte des Ausgangswertes. Erst bei einer Antimycinkonzentration von 300 nM kam es zu einem erneuten deutlichen Abfall der Superoxidsynthese (Abbildung 3). Um die komplette Hemmung der Superoxidproduktion durch den Komplex III der mitochondrialen Atmungskette sicherzustellen, eine zusätzliche unspezifische Hemmung von der NADPH-Oxidase aber zu vermeiden, setzten wir in den folgenden Versuchsreihen immer 1 µM Antimycin ein. Im Gegensatz hierzu zeigt die Verdünnungsreihe von DPI einen kontinuierlichen Abfall der Superoxidsynthese über den gesamten Konzentrationsbereich (Abbildung 3). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Tatsache, dass DPI präferentiell die NADPH-Oxidase inhibiert, in höheren Konzentrationen aber auch den Komplex III der mitochondrialen Atmungskette beeinflusst. Daher führten wir nachfolgende Versuche immer mit drei verschiedenen DPI-Konzentrationen durch (10 nM, 30 nM, 100 nM). Da die Enzyminhibitoren in den Ausgangslösungen in Ethanol absoluta (Antimycin) beziehungsweise in DMSO (DPI) gelöst waren und bis zur jeweiligen Endkonzentration mit Kulturmedium verdünnt wurden, führten wir Kontrollversuche mit den jeweilig entsprechenden Lösungsmittelkonzentrationen durch, um Lösungsmitteleffekte auszuschließen. Hierbei zeigte sich keine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Superoxidproduktion durch die Lösungsmittel (Abbildung 4).

**Abbildung 3:**

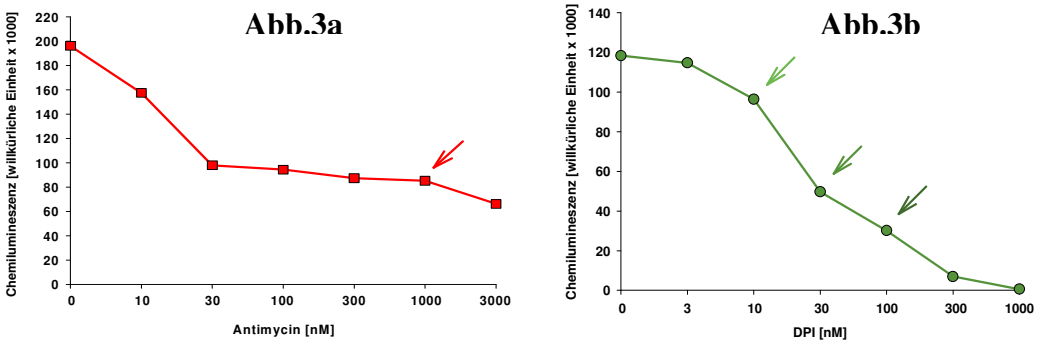


**Abb 3:** Dosisabhängige Inhibition der Superoxidfreisetzung von BAL-Zellen von Kontrolltieren nach Zugabe der Enzyminhibitoren Antimycin [Abb. 3a] und DPI [Abb. 3b]. BAL-Zellen wurden in vitro mit Zymosan stimuliert und nach Zugabe der angegebenen Konzentrationen des Inhibitors der Superoxidsynthese die resultierenden Chemolumineszenzsignale gemessen. Die Pfeile zeigen die von uns gewählten Konzentrationen der Enzyminhibitoren, die wir in den folgenden Experimenten eingesetzt haben.

**Abbildung 4:**

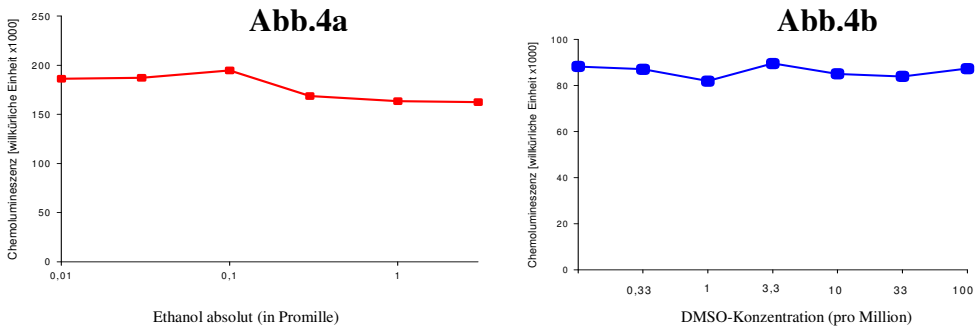


**Abb. 4:** Superoxidfreisetzung von BAL-Zellen von Kontrolltieren nach Zugabe von Ethanol als Lösungsmittel von Antimycin [Abb. 4a] sowie DMSO als Lösungsmittel von DPI [Abb. 4b]. BAL-Zellen wurden in vitro mit Zymosan stimuliert und nach Zugabe von Lösungsmitteln in den angegebenen Konzentrationen die resultierenden Chemolumineszenzsignale gemessen.

Die Zugabe des Inhibitors Antimycin hatte auf Zellen der verschiedenen Tiergruppen eine deutlich differente Wirkung. Während die Superoxidproduktion der Kontrolltiere nach Phagozytosereiz auf rund die Hälfte gehemmt wurde, zeigte sich bei den gasexponierten Tieren nur noch in der Gruppe der 24 Stunden $NO_2$-exponierten Tiere eine geringe Suppression um circa 20 Prozent. Hingegen hatte die Zugabe von

Antimycin bei den Tieren, die für 3 oder 20 Tage der $NO_2$-Wirkung ausgesetzt waren, keine hemmende Wirkung auf die Superoxidsynthese (Abbildungen 5a + b).

**Abbildung 5:**

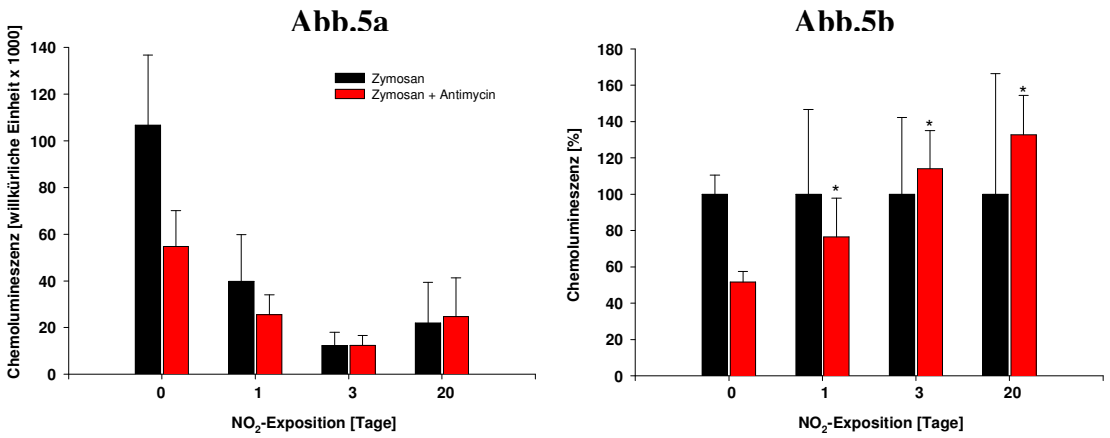


**Abb. 5:** Hemmung der Superoxidfreisetzung von BAL-Zellen von $NO_2$-exponierten Tieren und Kontrolltieren durch 1 µM Antimycin. BAL-Zellen der unterschiedlich behandelten Tiere wurden durch Zymosan stimuliert, wobei die resultierenden Chemolumineszenzsignale mit und ohne Zugabe des Enzym-Inhibitors gemessen wurden. Die absoluten Werte der Messung werden in Abb. 5a gezeigt. Um die Hauptaussage des Experimentes besser herauszustellen, zeigt Abb. 5b die selben Daten als relative Werte, wobei die mittlere Chemolumineszenz der Zellen in den Experimenten ohne Antimycin-Zugabe als 100 % gesetzt wurde. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte +/- SD von jeweils acht individuell analysierten Ratten pro Gruppe. * Signifikante statistische Abweichung der Inhibitor-behandelten Gruppen zur jeweiligen Kontrollgruppe, $p < 0{,}05$.

Diese Daten lassen vermuten, dass die Enzymfunktion des Komplexes III der mitochondrialen Atmungskette nach längerdauernder Gasexposition vollständig supprimiert ist, so dass die Zugabe von Antimycin hier keine weitere Inhibition verursachen kann und die Superoxidproduktion in diesen Tieren somit einzig durch die NADPH-Oxidase erfolgt. Unsere Ergebnisse der Versuche mit Zugabe des NADPH-Oxidase-Inhibitors DPI unterstützen diese These. Hier zeigte sich, dass DPI in allen Dosierungen inhibierend auf die Superoxidproduktion in sämtlichen Tiergruppen wirkte, diese Hemmung aber in den $NO_2$-exponierten Tiergruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant stärker ausfiel (siehe Abbildung 6: A1-A3 und B1-B3). Der Grad der Hemmung nahm mit steigender DPI-Konzentration zu, bei einer Konzentration von 100 nM konnte nahezu kein Superoxid mehr in den BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Ratten nachgewiesen werden.

**Abbildung 6:**

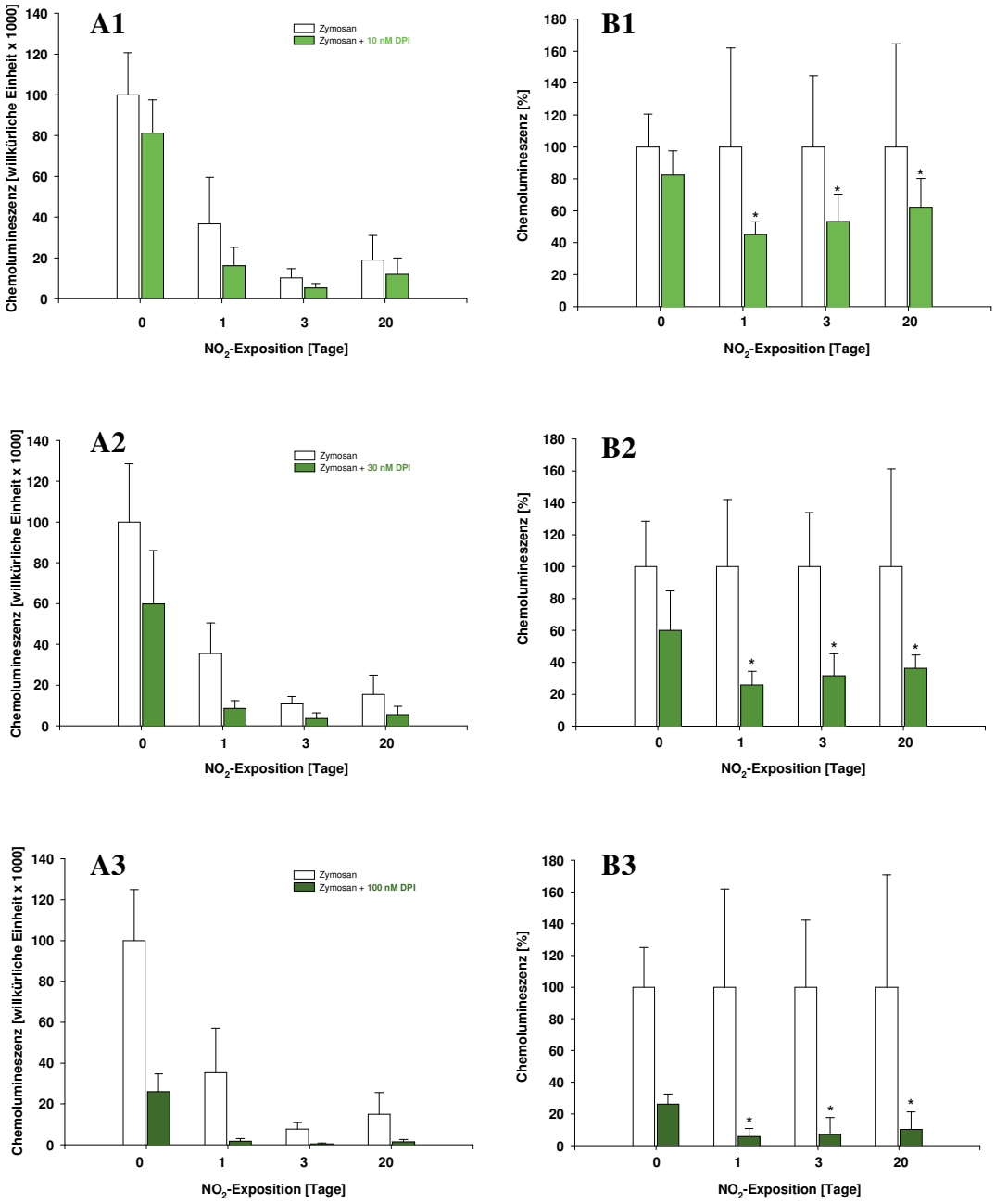


**Abb. 6:** Hemmung der Superoxidfreisetzung von BAL-Zellen von $NO_2$-exponierten Tieren und Kontrolltieren durch 10 nM, 30 nM und 100 nM DPI (Abb. A1-A3, B1-B3). BAL-Zellen der unterschiedlich behandelten Tiere wurden durch Zymosan stimuliert, wobei die resultierende Chemolumineszenz mit und ohne Zugabe des Enzym-Inhibitors gemessen wurde. Die absoluten Werte der Messung werden in Abb. A1-A3 gezeigt. Um die Hauptaussage der Experimente besser herauszustellen, zeigen die Abbildungen B1-B3 die selben Daten als relative Werte, wobei die mittlere Chemolumineszenz der Zellen in den Experimenten ohne DPI-Zugabe als 100 % gesetzt wurde. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte +/- SD von jeweils acht individuell analysierten Ratten pro Gruppe.
* Signifikante statistische Abweichung der Inhibitor-behandelten Gruppen zur jeweiligen Kontrollgruppe, $p < 0{,}05$.

### 3.1.3 Auswirkungen auf Zytotoxizität

Um die Ergebnisse der Superoxidproduktion in den BAL-Zellen der verschiedenen Tiergruppen interpretieren zu können, war es notwendig, eine unterschiedliche Zelltodrate in diesen Gruppen als Ursache der veränderten funktionellen Aktivität der einzelnen BAL-Zellen auszuschließen. Es zeigte sich, dass in den BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Tiere nur ein geringfügig höherer Anteil toter Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren nach der Zymosanstimulation nachgewiesen wurde (Abbildung7). Des Weiteren ist ersichtlich, dass die Zymosanstimulation keine signifikanten Auswirkungen auf das Überleben der Zellen hat.

**Abbildung 7:**

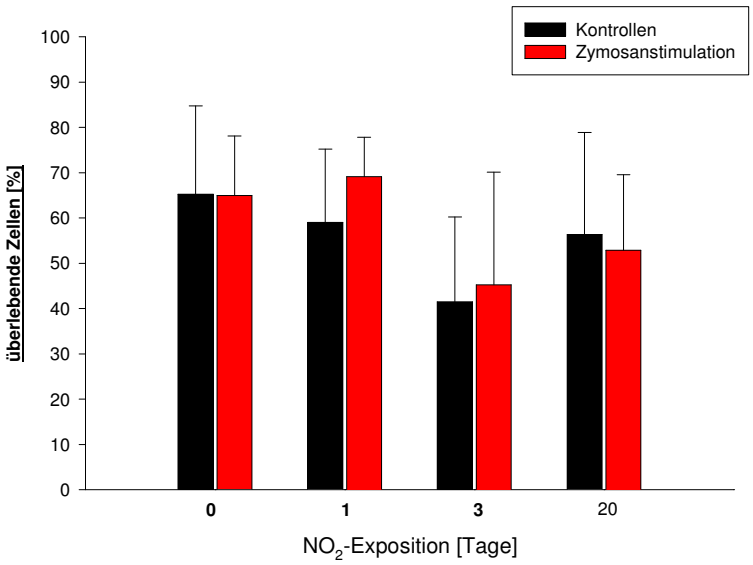


**Abb. 7:** Zelltodrate von BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Tiere in den verschiedenen Behandlungsgruppen mit und ohne Zymosan-Stimulation. BAL-Zellen der unterschiedlich behandelten Tiere wurden durch Zymosan stimuliert und anschliessend der Überstand mittels eines LDH-Zytotoxizitätsassays untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und SD der prozentual überlebenden Zellen von jeweils 16 untersuchten Tieren pro Behandlungsgruppe.

Somit konnte eine unterschiedliche Vitalität als maßgebliche Ursache für die beobachtete Suppression der Superoxidproduktion in den BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Ratten ausgeschlossen werden. Ebenso konnten wir mit den nach jedem Versuch durchgeführten LDH-Zytotoxizitätsassays sicherstellen, dass sich die Zugabe der Enzyminhibitoren Antimycin und DPI keinen Einfluß auf die Vitalität der BAL-Zellen hat (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.4 mRNA-Expression von antioxidativen Enzymen

Antioxidative Enzyme haben gerade für phagozytierende Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten eine besondere Bedeutung, da sie diese Zellen vor den von ihnen im Rahmen der Phagozytose gebildeten Radikalen schützen und somit eine Selbstschädigung oder Selbstzerstörung der Zellen verhindern. Wir untersuchten daher in den BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Ratten die Expression verschiedener Formen der Superoxiddismutase, die die Umwandlung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid katalysieren, sowie verschiedene Formen der Glutathion-Peroxidase und von Katalase, die die anschließende Reduktion des Wasserstoffperoxids zu Wasser vermitteln.

Wir untersuchten zunächst die Expression auf mRNA-Ebene und führten bei all diesen Untersuchungen die Kontrolle der jeweiligen RNA-Präparation sowie der cDNA-Synthese durch Nachweis des konstitutiv exprimierten Gens für GAPDH durch. Für die anschließenden Vergleiche der Expression der antioxidativen Enzyme in den verschiedenen Tiergruppen wurden nur solche Präparationen ausgewählt, die vergleichbare Mengen an GAPDH-Transkripten enthielten.

Bei der Untersuchung der Glutathion Peroxidase (GPx) fanden wir eine unterschiedliche Regulation einzelner Formen der GPx. Während die mRNA-Expression von GPx-1 in den BAL-Zellen durch eine $NO_2$-Exposition nicht verändert wurde, zeigte sich in den Zellen der behandelten Tiere eine mit der Expositionsdauer zunehmende vermehrte Bildung von GPx-3-Transkripten. Während wir in Kontrolltieren keine Expression von GPx-3 nachweisen konnten, wurden in den Tieren nach 3- und 20-tägiger $NO_2$-Exposition signifikante Mengen der GPx-RNA beobachtet. Abbildung 8 A+B zeigt die Foto-Dokumentation der jeweiligen GPx-PCR, Abbildung 9 A+B die Resultate der densitometrischen Auswertung der zugehörigen PCR-Banden.

Auch für die Expression der verschiedenen Formen der Superoxiddismutase fanden wir Unterschiede in der Genexpression nach $NO_2$-Exposition. Während für die Mn-SOD in allen vier Tiergruppen vergleichbare Ergebnisse gefunden wurden, zeigte sich für die Cu/Zn-SOD eine Beeinflussung der Expression durch $NO_2$-Exposition. So konnten wir nachweisen, dass die Menge an Transkripten in den BAL-Zellen nach $NO_2$-Behandlung signifikant zunahm, jedoch hatte die Dauer der $NO_2$-Exposition keinen Einfluss auf die Genexpression der Cu/Zn-SOD. Sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 3 Tagen oder 20 Tagen Exposition fanden wir in den BAL-Zellen der Ratten eine einheitliche Erhöhung im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 8 C+D und Abbildung 9 C+D).

Für das antioxidative Enzym Katalase konnten wir eine vermehrte Transkription des Gens in Zellen von Tieren nach 24 Stunden $NO_2$-Exposition nachweisen, für die BAL-Zellen von Tieren nach 3- oder 20-tägiger Exposition hingegen zeigten sich keine Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zu BAL-Zellen von Kontrolltieren (Abbildung 8 E + 9 E). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird in Abbildung 8 exemplarisch nur jeweils die Gen-Expression von drei Tieren pro Gruppe gezeigt. Die densitometrische Auswertung erfolgte aber mit Daten von jeweils 6 Tieren pro Tiergruppe (Abbildung 9).

**Abbildung 8:**

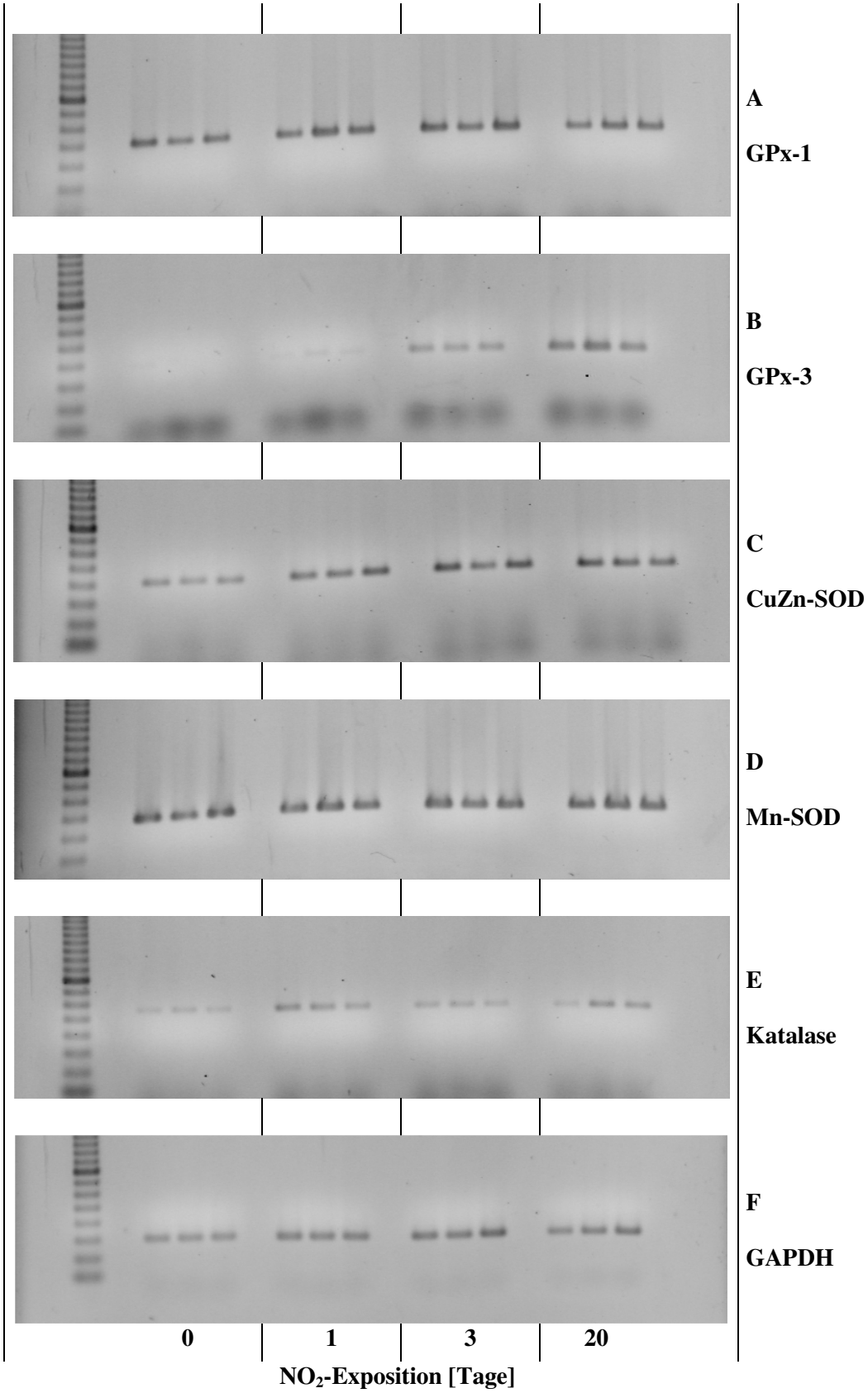


**Abb. 8:** Nachweis der mRNA-Expression von GPx1, GPx3, CuZn-SOD, Mn-SOD, Katalase und GAPDH in BAL-Zellen von $NO_2$ -exponierten Zellen und von unbehandelten Kontrolltieren mittels RT-PCR. Aus BAL-Zellen der unterschiedlich behandelten Tiere wurde

die RNA isoliert und eine RT-PCR der oben genannten Enzyme durchgeführt. Dargestellt sind die PCR-Banden von jeweils drei Tieren pro Behandlungsgruppe nach Gel-Elektrophorese.

**Abbildung 9:**

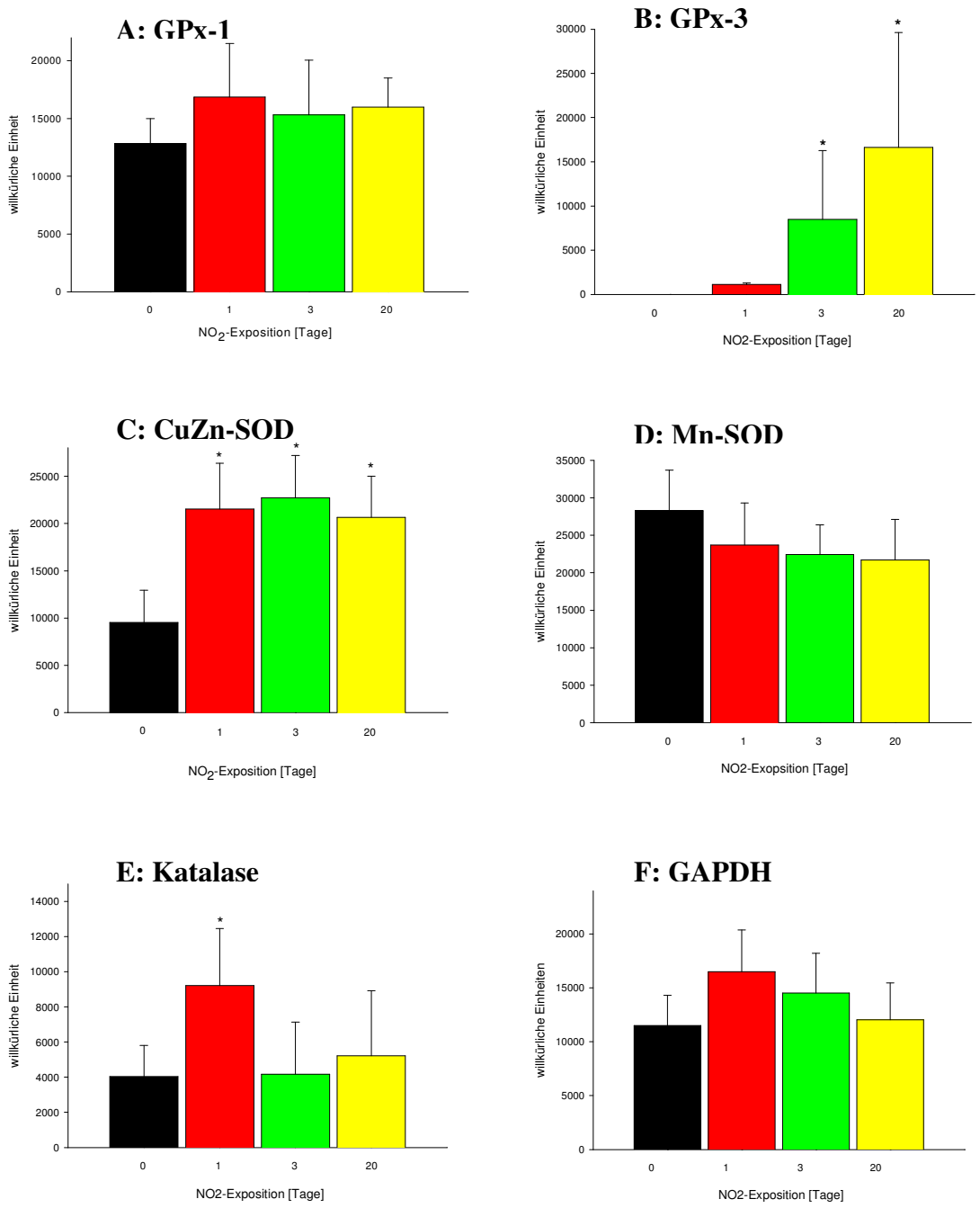


**Abb. 9:** mRNA-Expression von GPx1, GPx3, CuZn-SOD, Mn-SOD, Katalase und GAPDH in BAL-Zellen von $NO_2$-exponierten Tieren und von unbehandelten Kontrolltieren. Aus BAL-Zellen der unterschiedlich behandelten Tiere wurde die RNA isoliert und eine RT-PCR der oben genannten Enzyme durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD der densitometrischen Analysen der PCR-Banden nach Gel-Elektrophorese von jeweils 6 Tieren pro Behandlungsgruppe. * Signifikante statistische Abweichung von der Kontrollgruppe, $p < 0{,}05$.

### 3.1.5 Enzymaktivitäten der Superoxiddismutase und Gluthation-Peroxidase

Um die tatsächliche Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und GPx in den BAL-Zellen zu bestimmen, führten wir nun Funktionsassays dieser Enzyme durch. Im Gegensatz zur Analyse der mRNA-Expression in den BAL-Zellen konnten wir in den Funktionsassays die Aktivität der antioxidativen Enzyme nicht getrennt für die einzelnen Isoformen messen, da die dem jeweiligen Assay zugrundeliegende enzymatische Reaktion unspezifisch durch alle Formen der SOD bzw. GPx katalysiert wird. Somit wurde in den Assays die jeweilige gesamte intrazelluläre Enzymaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Menge an Protein in den Präparationen bezogen, um Artefakte durch eine unterschiedliche Proteinmenge in den einzelnen Proben auszuschließen.

Wir konnten zeigen, dass es zu einem signifikanten Anstieg der Enzymaktivitiät beider Enzymsysteme in den BAL-Zellen von Tieren nach 20 Tagen $NO_2$-Exposition kam. In den Tiergruppen nach 24 Stunden oder 3 Tagen $NO_2$-Exposition konnten wir hingegen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Enzymaktivität in BAL-Zellen von Kontrolltieren feststellen (Abbildung 10 A+B).

**Abbildung 10:**

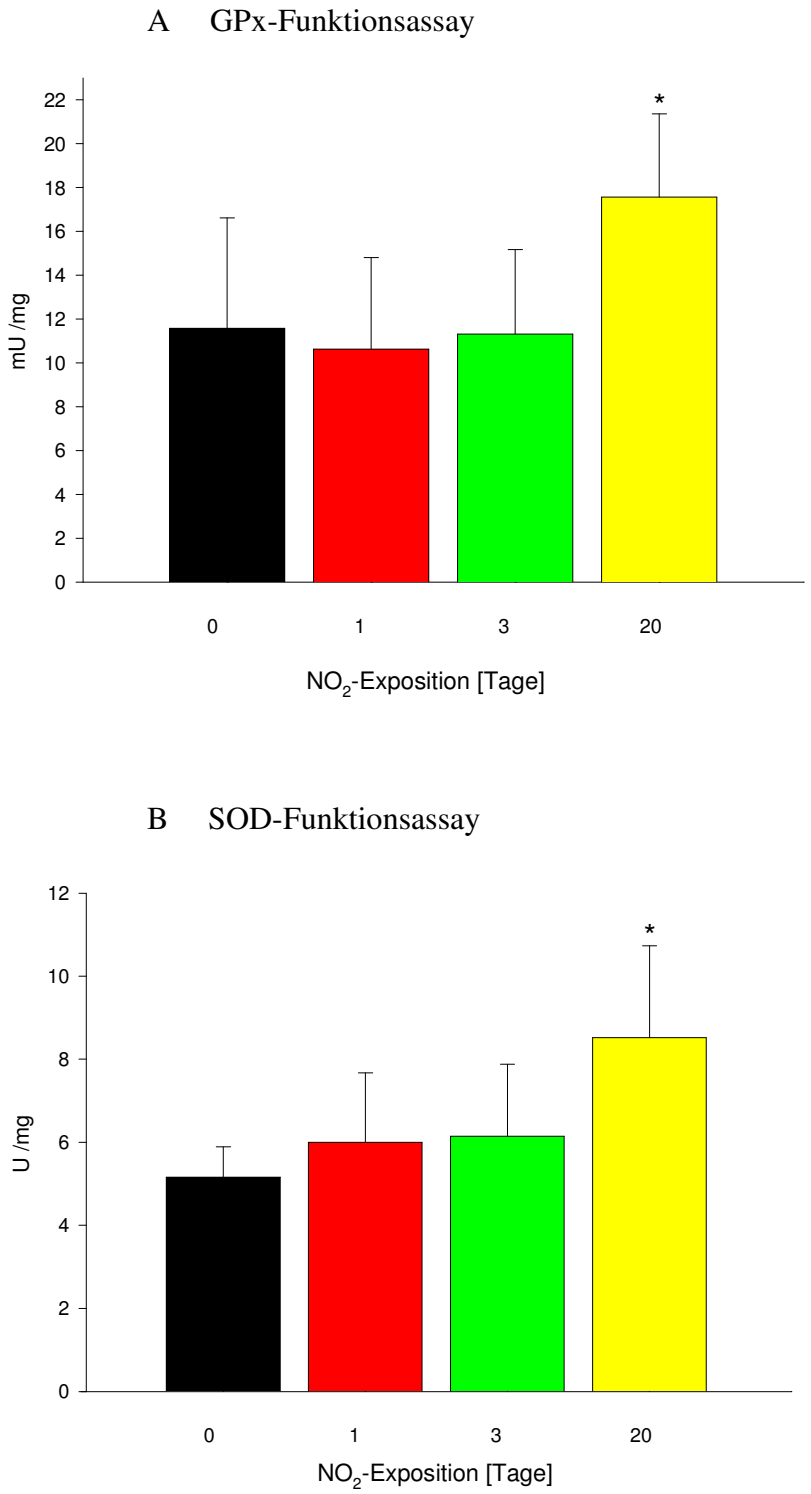


**Abb. 10**: Bestimmung der gesamten intrazellulären GPx (Abb. A)- und SOD (Abb. B)-Enzymaktivität in BAL-Zellen von $NO_2$-exponierten Tieren und unbehandelten Kontrolltieren. Zellen wurden direkt aus der BAL gewonnen, umgehend mittels wiederholten Frier- und Tauzyklen lysiert und anschliessend mittels spezifischen Enzymaktivitäts-Assays analysiert. Gezeiggt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von fünf Tieren pro Gruppe. * Signifikanter statistischer Unterschied von der Gruppe der unbehandelten Kontroll-Tiere, $p < 0{,}05$**.**

## 3.2 SP-A-Wirkung auf BAL-Zellen

Ziel dieses Teilprojektes war es, die Wirkung des Surfactant-Proteins A (SP-A) auf BAL-Zellen wie Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten näher zu untersuchen. Wir postulierten, dass SP-A auf BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Tiere im Vergleich zu BAL-Zellen unbehandelter Kontrolltiere eine verstärkte antiinflammatorische Wirkung ausübt. Hierbei verfolgten wir die Hypothese, dass SP-A den Wechsel im Aktivierungstyp von BAL-Zellen unter $NO_2$-Exposition wesentlich beeinflusst. Grundlage für diese Hypothese war die Tatsache, dass es in BAL-Zellen von Ratten, die einer $NO_2$-Exposition ausgesetzt waren, zu einem Wechsel der Aktivierung in Richtung einer alternativen Makrophagenaktivierung kommt. Zum anderen gibt es zahlreiche Beispiele dafür, dass SP-A eine antiinflammatorische Wirkung auf Alveolarmakrophagen ausübt.

Unter Zugabe von SP-A in unterschiedlichen Konzentrationen untersuchten wir mittels ELISAs den Zellüberstand von BAL-Zellen nach Zellstimulation durch LPS in einer Endkonzentration von 100 ng/ml, um Aussagen über die zellulären Sekretionsleistungen 24 Stunden nach Stimulation bezüglich der Zytokine TNFα und IL-10 sowie des Chemokins MCP-1 treffen zu können. Auch hier verglichen wir die Ergebnisse von BAL-Zellen unserer Kontrolltiere mit den Ergebnissen der BAL-Zellen von Ratten nach $NO_2$-Exposition für 24 Stunden, 3 Tage oder 20 Tage.

### 3.2.1 Einfluss von SP-A auf die LPS-induzierte Freisetzung von TNFα

Wie untersuchten zunächst die Fähigkeit von BAL-Zellen von Ratten, die für 1, 3 oder 20 Tage $NO_2$ ausgesetzt waren, nach Stimulation mit LPS TNFα zu sezernieren und verglichen diese Ergebnisse mit den Resultaten von BAL-Zellen der Kontrolltiere. Hierfür bestimmten wir den TNFα-Gehalt des Zellüberstandes 24 Stunden nach Stimulation mittels eines ELISAs. BAL-Zellen aller Tiergruppen wiesen nach LPS-Stimulation im Vergleich zu Kontrollzellen ohne Stimulation einen starken Anstieg der TNFα-Sekretion auf (Abbildung 11). Die LPS-induzierte TNFα-Sekretion der BAL-Zellen von Tieren nach 3 oder 20 Tagen $NO_2$-Exposition war jedoch signifikant geringer im Vergleich zu der von Kontrolltieren und von Tieren nach 24 Stunden Exposition.

**Abbildung 11**

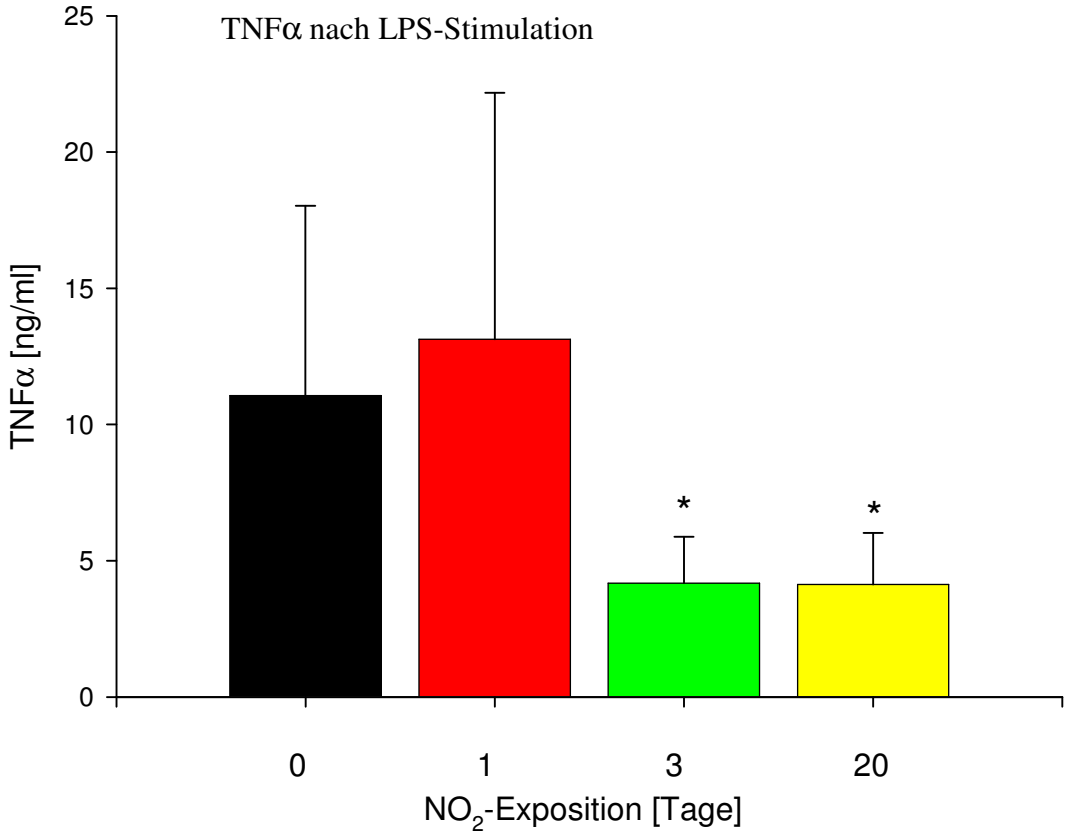


**Abb.11**: TNFα-Nachweis mittels ELISA im Zellüberstand von BAL-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS. Zellen von Tieren nach $NO_2$-Exposition sowie von unbehandelten Kontrolltieren wurden mittels BAL gewonnen, aufgereinigt, in Zellkultur genommen und mit LPS in einer Endkonzentration von 100 ng/ml stimuliert. Nach 24 Stunden wurde der TNFα-Gehalt im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung der Daten von jeweils 8 Tieren pro Behandlungsgruppe. * Signifikante statistische Abweichung von der Kontrollgruppe, $p < 0,05$.

Mit diesen Ergebnissen konnten wir die Daten früherer Untersuchungen bezüglich der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch BAL-Zellen nach $NO_2$-Exposition bestätigen.

Bei ansonsten identisch gebliebenen Versuchsbedingungen führten wir nun den Versuch unter Zugabe von SP-A mit einer Endkonzentration von 20 µg/ml durch. Hierbei konnten wir zeigen, dass SP-A in den BAL-Zellen nach 20-tägiger $NO_2$-Exposition eine weitere geringfügige Hemmung der TNFα-Sekretion bewirkte, diese Hemmung jedoch nicht signifikant war. In den Zellen der Kontrolltiere und der Tiere nach 24 Stunden sowie 3 Tagen Gasexposition zeigte die SP-A-Zugabe keinerlei Auswirkungen bezüglich der TNFα-Sekretionsleistung (Abbildung 12).

**Abbildung 12:**

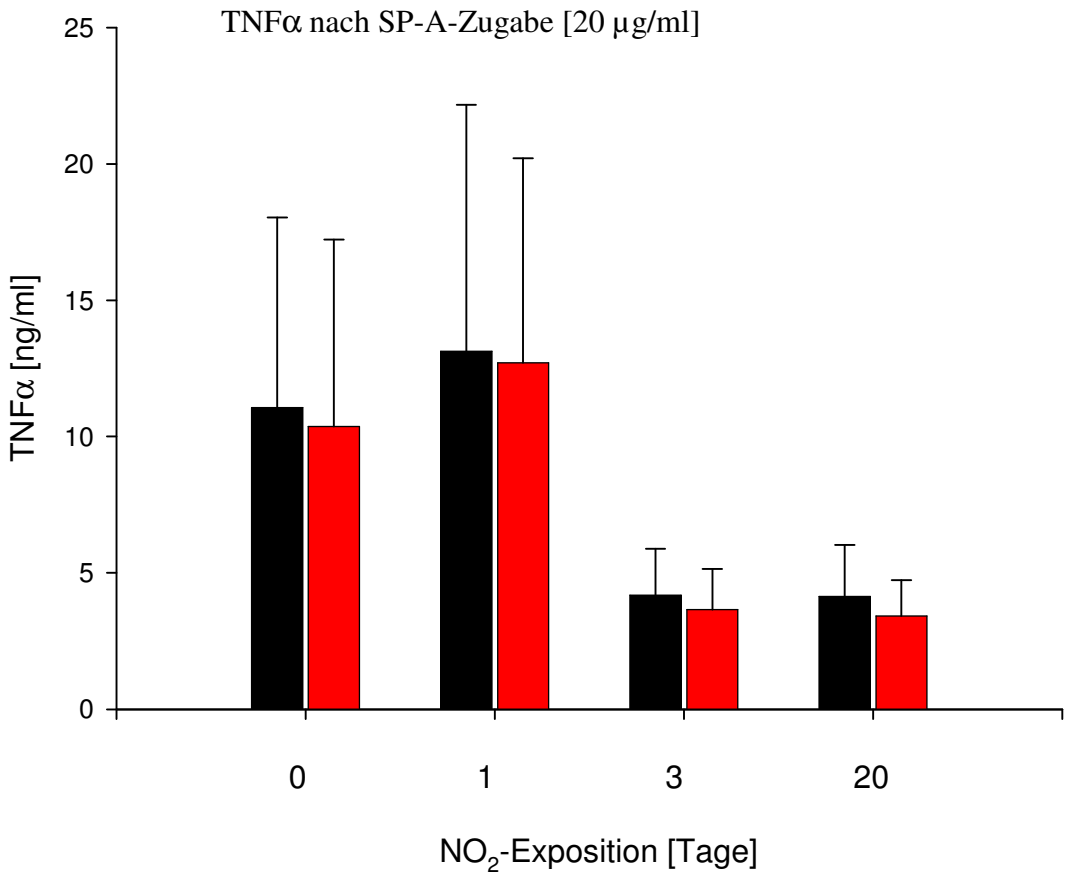


**Abb.12**: TNFα-Nachweis mittels ELISA im Zellüberstand von BAL-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS und ohne bzw. mit Zugabe von SP-A. Zellen von Tieren nach $NO_2$-Exposition sowie von unbehandelten Kontrolltieren wurden mittels BAL gewonnen, aufgereinigt, in Zellkultur genommen und mit LPS in einer Endkonzentration von 100 ng/ml stimuliert. Dabei wurden Zellkulturen ohne (schwarz) und mit (rot) Zugabe von SP-A in einer Endkonzentration von 20 µg/ml angesetzt. Nach 24 Stunden wurde der TNFα-Gehalt im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung der Daten von jeweils 8 Tieren pro Behandlungsgruppe.

Um zu untersuchen, ob SP-A in höheren Dosen eine Wirkung ausübt, führten wir nun den Versuch bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen unter Zugabe von SP-A in einer Endkonzentration von 50 µg/ml durch. Hierbei zeigte sich, dass die SP-A-Zugabe in allen Gruppen zu einer verminderten TNFα-Sekretion führte, wobei dieser Effekt in der Gruppe der 3- und 20-tägig exponierten Tiere am ausgeprägtesten war (Abbildung 13).

**Abbildung 13:**

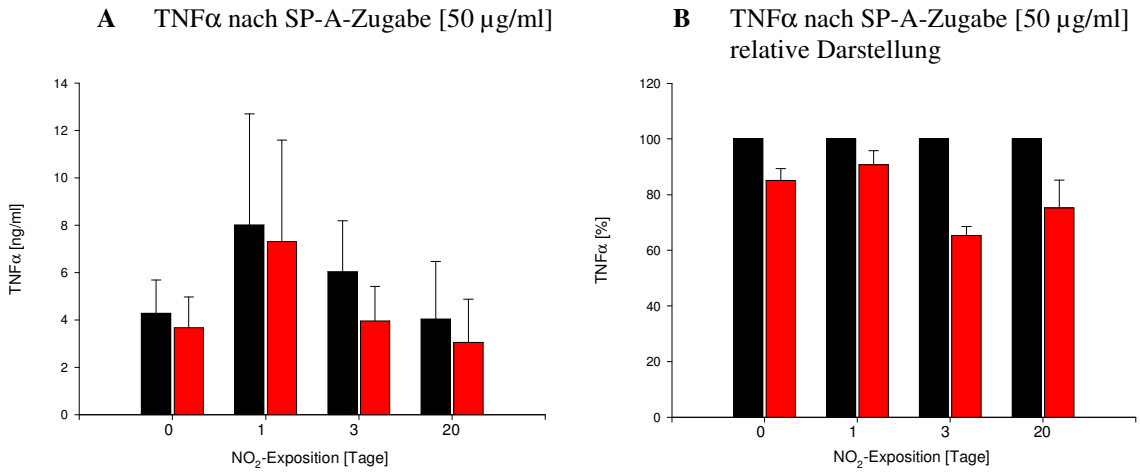


**Abb.13**: TNFα-Nachweis mittels ELISA im Zellüberstand von BAL-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS und ohne bzw. mit Zugabe von SP-A. Zellen von Tieren nach $NO_2$-Exposition sowie von unbehandelten Kontrolltieren wurden mittels BAL gewonnen, aufgereinigt, in Zellkultur genommen und mit LPS in einer Endkonzentration von 100 ng/ml stimuliert. Dabei wurden Zellkulturen mit (rot) und ohne (schwarz) Zugabe von SP-A in einer Endkonzentration von 50 µg/ml angesetzt. Nach 24 Stunden wurde der TNFα-Gehalt im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung der Daten von jeweils 4 Tieren pro Behandlungsgruppe [A]. Um die Hauptaussage des Experiment besser herauszustellen, zeigt Abb. B die selben Daten als relative Werte, wobei die TNFα-Synthese der Zellen ohne SP-A als 100 % gesetzt wurde und hierauf die Ergebnisse der Experimente mit den Zellen des jeweils gleichen Tieres bei Zugabe von SP-A bezogen wurden. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils vier Tieren pro Behandlungsgruppe.

### 3.2.2 Einfluss von SP-A auf die LPS-induzierte Freisetzung von IL-10

Weiterhin untersuchten wir die BAL-Zellen der vier Behandlungsgruppen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, nach LPS-Stimulation das antiinflammatorische Zytokin IL-10 zu bilden. Es zeigte sich, dass LPS in BAL-Zellen von Kontrolltieren und bei Zellen von Tieren nach 1- und 20-tägiger Exposition eine geringfügige IL-10-Sekretion induzierte.

Jedoch wurden die BAL-Zellen von Tieren nach dreitägiger $NO_2$-Exposition durch die LPS-Gabe zu einer massiven Steigerung der IL-10-Sekretion angeregt (Abbildung 14).

**Abbildung 14:**

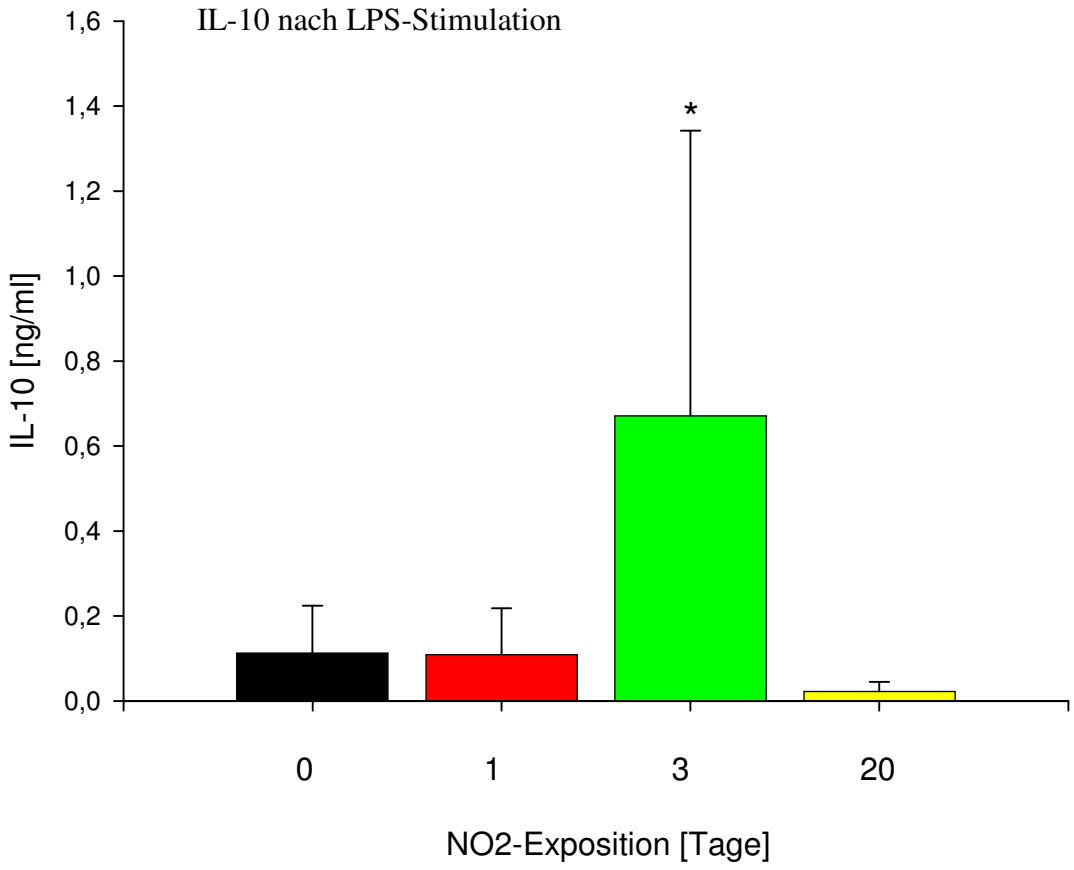


**Abb. 14**: IL-10-Nachweis mittels ELISA im Zellüberstand von BAL-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS und Zugabe von SP-A. Zellen von Tieren nach $NO_2$-Exposition sowie von unbehandelten Kontrolltieren wurden mittels BAL gewonnen, aufgereinigt, in Zellkultur genommen und mit LPS in einer Endkonzentration von 100 ng/ml stimuliert. Dabei wurden die Zellkulturen mit Zugabe von SP-A in einer Endkonzentration von 20 ng/ml angesetzt. Nach 24 Stunden wurde der IL-10-Gehalt im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung der Daten von jeweils 8 Tieren pro Behandlungsgruppe. * Signifikante statistische Abweichung von der Kontrollgruppe, $p < 0,05$.

Durch Zugabe von SP-A in einer Konzentration von 20 µg/ml bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen konnten wir keinen Unterschied bezüglich der IL-10-Bildung in allen Gruppen feststellen (Abbildung 15), in der statistischen Prüfung zeigte sich keine Signifikanz.

**Abbildung 15:**

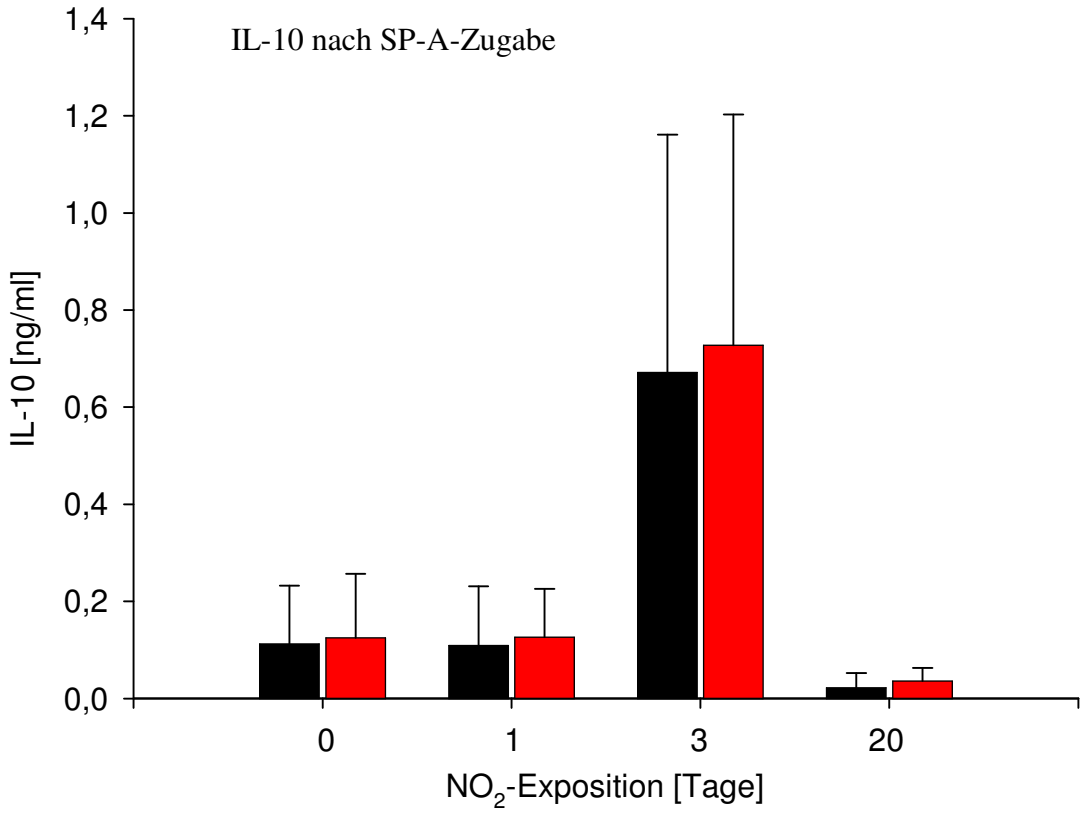


**Abb. 15**: IL-10-Nachweis mittels ELISA im Zellüberstand von BAL-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS und ohne bzw. mit Zugabe von SP-A. Zellen von Tieren nach $NO_2$-Exposition sowie von unbehandelten Kontrolltieren wurden mittels BAL gewonnen, aufgereinigt, in Zellkultur genommen und mit LPS in einer Endkonzentration von 100 ng/ml stimuliert. Dabei wurden Zellkulturen ohne (schwarz) und mit (rot) Zugabe von SP-A in einer Endkonzentration von 20 ng/ml angesetzt. Nach 24 Stunden wurde der TNFα-Gehalt im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung der Daten von jeweils 8 Tieren pro Behandlungsgruppe.

In der Folge führten wir Testungen höherer SP-A-Dosen mit kleinerer Tierzahl durch, um zu untersuchen, ob sich diese Ergebnisse bestätigten. Aufgrund der niedrigen IL-10-Konzentrationen in den Überständen konnten die Auswirkungen der SP-A-Gabe nur bei den mit einer eindeutigen IL-10-Sekretion auf die LPS-Stimulation reagierenden BAL-Zellen von Tieren nach dreitägiger $NO_2$-Exposition quantitativ ausgewertet werden. Hier zeigte sich, dass die BAL-Zellen in einem SP-A-Milieu in der Tendenz vermehrt das antiinflammatorische Zytokin IL-10 sezernierten, die IL-10-Konzentration im Zellüberstand nach 24 Stunden Zellkultur im Anschluss an die LPS-Stimulation erhöhte sich bei Tieren nach dreitägiger $NO_2$-Exposition durch eine SP-A-Konzentration von 50 µg/ml um rund 36 Prozent.

### 3.2.3 Einfluss von SP-A auf die LPS-induzierte Freisetzung von MCP-1

Um die Auswirkungen einer $NO_2$-Exposition auf BAL-Zellen von Ratten bezüglich der Sekretionsleistung proinflammatorischer Chemokine zu untersuchen, bestimmten wir exemplarisch den MCP-1-Gehalt im Überstand der BAL-Zellkultur 24 Stunden nach Stimulation der Zellen mit LPS. Hier konnten wir zeigen, dass sowohl BAL-Zellen von Kontrolltieren als auch BAL-Zellen von für 1, 3 oder 20 Tage $NO_2$-exponierten Ratten durch die LPS-Gabe zu einer signifikanten MCP-1-Sekretion angeregt wurden (Abbildung 17). Auffällig war, dass sich die kurzzeitige $NO_2$-Exposition der Tiere für 24 Stunden oder drei Tage in der Tendenz mit einer Zunahme der MCP-1-Bildung auswirkte, eine langanhaltende $NO_2$-Exposition für 20 Tage aber zu einer signifikanten Abnahme der MCP-1-Sekretionsleistung der BAL-Zellen führte.

**Abbildung 17:**

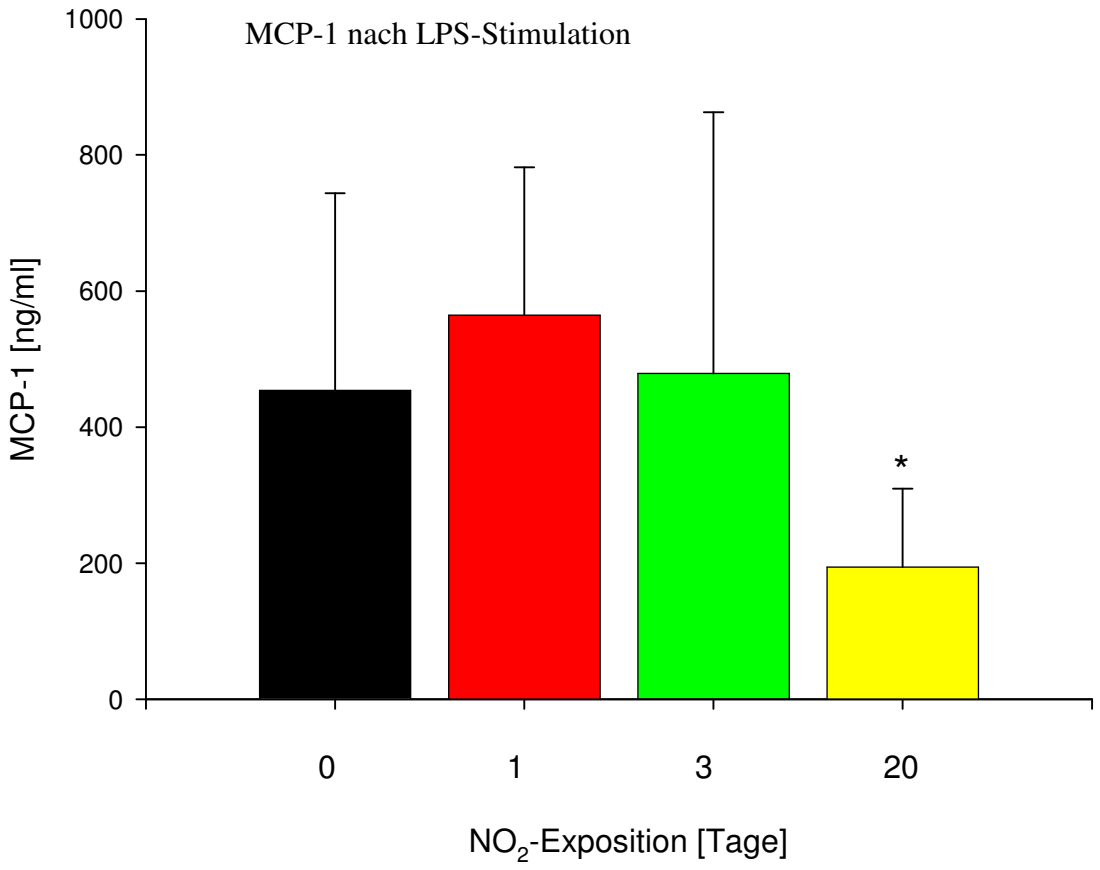


**Abb. 17**: MCP-1-Nachweis mittels ELISA im Zellüberstand von BAL-Zellen nach Stimulation mit 100 ng / ml LPS. Zellen von Tieren nach $NO_2$-Exposition sowie von unbehandelten Kontrolltieren wurden mittels BAL gewonnen, aufgereinigt, in Zellkultur genommen und mit LPS in einer Endkonzentration von 100 ng / ml stimuliert. Nach 24 Stunden wurde der MCP-1-Gehalt im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung der Daten von jeweils 8 Tieren pro Behandlungsgruppe. * Signifikante statistische Abweichung von der Kontrollgruppe, $p < 0,05$.

Die Zugabe von SP-A in einer Konzentration von 20 µg/ml führte in allen Tiergruppen zu einer tendentiell verminderten MCP-1-Bildung, wobei sich diese Suppression des proinflammatorischen Chemokins aber unabhängig von einer vorherigen $NO_2$-Exposition der Versuchstiere zeigte.

**Abbildung 18:**

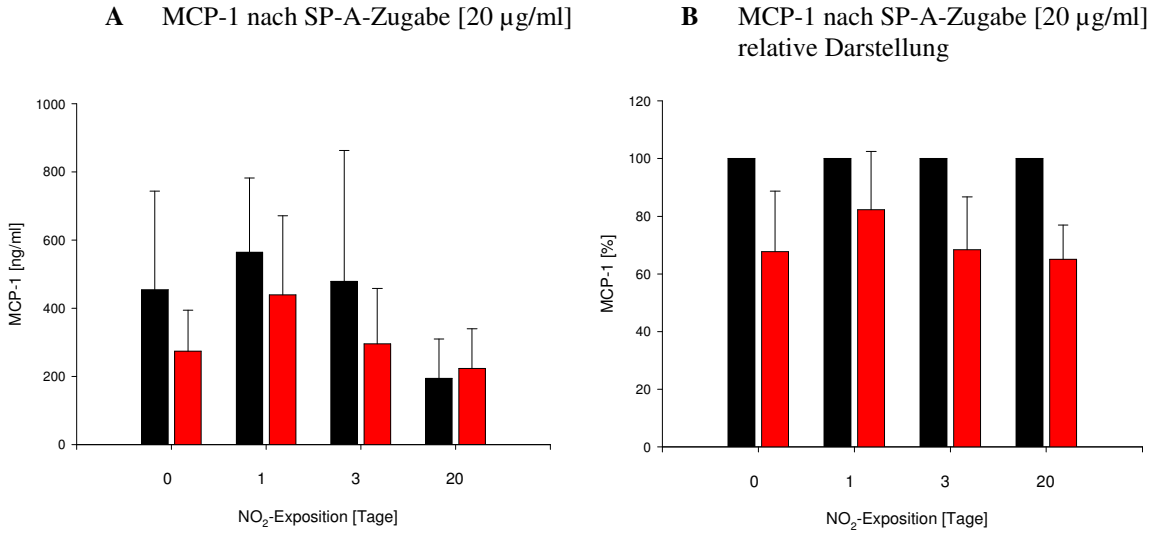


**Abb.18**: MCP-1-Nachweis mittels ELISA im Zellüberstand von BAL-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS und ohne bzw. mit Zugabe von SP-A. Zellen von Tieren nach $NO_2$ -Exposition sowie von unbehandelten Kontrolltieren wurden mittels BAL gewonnen, aufgereinigt, in Zellkultur genommen und mit LPS in einer Endkonzentration von 100 ng/ml stimuliert. Dabei wurden Zellkulturen ohne (schwarz) und mit (rot) Zugabe von SP-A in einer Endkonzentration von 20 µg/ml angesetzt. Nach 24 Stunden wurde der MCP-1-Gehalt im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung der Daten von jeweils 8 Tieren pro Behandlungsgruppe [A]. Um die Hauptaussage des Experiments besser herauszustellen, zeigt Abb. B die selben Daten als relative Werte, wobei die MCP-1-Synthese der Zellen ohne SP-A als 100 % gesetzt wurde und hierauf die Ergebnisse der Experimente mit den Zellen des jeweils gleichen Tieres bei Zugabe von SP-A bezogen wurden. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils acht Tieren pro Behandlungsgruppe.

Auch die Zugabe von SP-A in der höheren Konzentration von 50 µg/ml offenbarte keine relevanten Unterschiede zwischen den Tieren verschiedener Behandlungsgruppen bezüglich der relativen Hemmung der MCP-1-Bildung, sowohl in der Gruppe der Kontrolltiere als auch in den Gruppen der für 1, 3 oder 20 mit $NO_2$-exponierten Tiere sahen wir jeweils eine Reduktion der MCP-1-Sekretion um rund 40 % (Abbildung 19).

**Abbildung 19:**

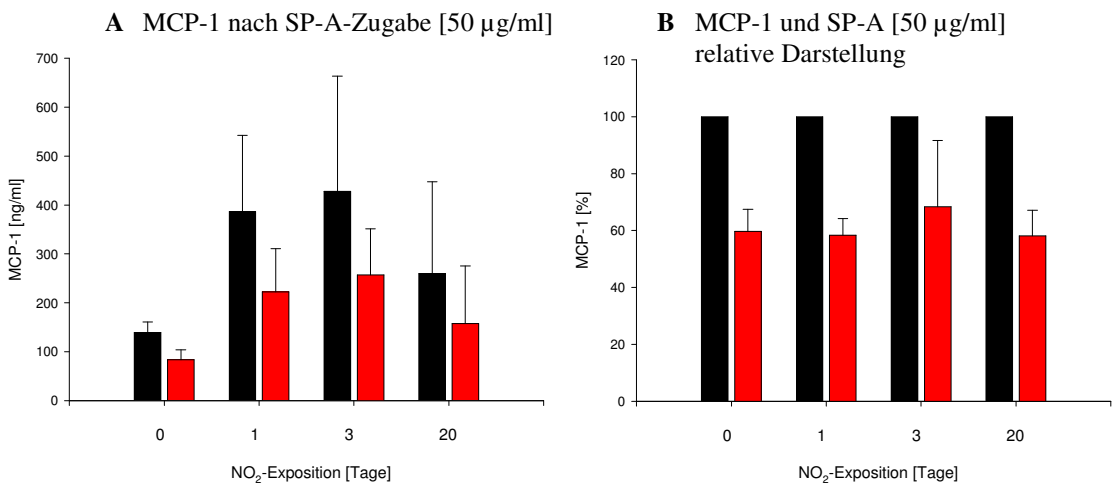


**Abb.19**: MCP-1-Nachweis mittels ELISA im Zellüberstand von BAL-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS und ohne bzw. mit Zugabe von SP-A. Zellen von Tieren nach $NO_2$-Exposition sowie von unbehandelten Kontrolltieren wurden mittels BAL gewonnen, aufgereinigt, in Zellkultur genommen und mit LPS in einer Endkonzentration von 100 ng/ml stimuliert. Dabei wurden Zellkulturen ohne (schwarz) und mit (rot) Zugabe von SP-A in einer Endkonzentration von 50 µg/ml angesetzt. Nach 24 Stunden wurde der MCP-1-Gehalt im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung der Daten von jeweils 4 Tieren pro Behandlungsgruppe [A]. Um die Hauptaussage des Experiments besser herauszustellen, zeigt Abb. B die selben Daten als relative Werte, wobei die MCP-1-Synthese der Zellen ohne SP-A als 100 % gesetzt wurde und hierauf die Ergebnisse der Experimente mit den Zellen des jeweils gleichen Tieres bei Zugabe von SP-A bezogen wurden. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils vier Tieren pro Behandlungsgruppe.

# 4 DISKUSSION

## 4.1 Radikalstoffwechsel von BAL-Zellen

Das Auftreten einer COPD und der weitere klinische Verlauf der Erkrankung wird sehr stark vom Tabakkonsum der betroffenen Person beeinflusst. Daher werden Bestandteile des Zigarettenrauches auch als wesentliche Elemente für die Pathogenese der COPD angesehen. Die genauen Mechanismen jedoch, die diesem Phänomen zugrunde liegen, konnten bisher noch nicht ausreichend aufgedeckt werden. Allerdings gewinnt die mögliche Assoziation zwischen dem durch freie Radikale verursachten Schaden und der Entwicklung von Lungenkrankheiten zunehmend an Aufmerksamkeit (Chow, 1993; Repine et al., 1997).

Die Gasphase eines Zigarettenzuges enthält rund $10^{15}$ kurzlebige und hochreaktive Kohlenstoff- und Stickstoff-Radikale und des Weiteren Stickstoffmonoxid (NO) in einer Konzentration von 500 ppm (Repine et al., 1997). Die biologischen Effekte von NO werden in der Folge nicht nur direkt von NO ausgeübt, vielmehr induzieren auch die durch NO-Reaktionen enstehenden Intermediärmoleküle wie beispielsweise $NO_2$ die kovalente Modifikationen von Proteinen und anderen Biomolekülen (van der Vliet et al., 1999; Wink et al., 1998). Das als einer der wichtigsten oxidativen Luftschadstoffe bekannte $NO_2$ wird darüber hinaus aber auch direkt in einer Konzentration von 250 ppm im Zigarettenrauch gefunden (Chow, 1993). Daher erscheint die Exposition von Labortieren mit Stickstoffoxiden, wie beispielsweise $NO_2$, eine geeignete Möglichkeit zu sein, den der COPD zugrundeliegenden Entzündungsprozess nachzuempfinden. Tatsächlich gibt es, wie in Abschnitt 1.1.4 bereits dargestellt, zahlreiche Übereinstimmungen zwischen der humanen COPD und den in einer Ratte durch $NO_2$-Exposition induzierten Veränderungen. In beiden Konditionen fällt besonders das vermehrte Vorkommen von Entzündungszellen wie zum Beispiel Alveolarmakrophagen in den Lungen auf (Barnes, 2003; Garn et al., 2003). Dabei erscheinen die Alveolarmakrophagen von Rauchern und COPD-Patienten im Vergleich zu Alveolarmakrophagen von Nichtrauchern aktiviert zu sein, was morphologische Veränderungen in Größe, Adhärenz sowie zytoplasmatische Einschlüsse (Repine et al., 1997) oder die veränderten Freisetzung von Entzündungsmediatoren belegen (Barnes, 2003). Eine Aktivierung von Alveolarmakrophagen konnte des Weiteren auch in Tiermodellen nach $NO_2$-Exposition gezeigt werden (Erroi et al., 1996; Garn et al., 2003). Während der Anstieg der Alveolarmakrophagen in der BAL vor allem langfristig

im Rahmen von chronischen Entzündungsprozessen in der Lunge gefunden wird, kommt es im akuten Stadium nach $NO_2$-Exposition vor allem auch zu einem Anstieg der polymorphonukleären Leukozyten (Pagani et al., 1994). Diese Beobachtung der vermehrten Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten mit gesteigertem Vorkommen in Sputum und BAL von COPD-Patienten und $NO_2$-exponierten Tieren wurde auch von anderen Gruppen bestätigt (Robison et al., 1990; Glasgow et al., 1987). Somit werden also im Rahmen von Entzündungsprozessen in der Lunge vermehrt neu infiltrierte, aktivierte Phagozyten gefunden. In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der frühe Anstieg der BAL-Zellzahl im Rahmen unseres $NO_2$-Tiermodells durch das Einwandern von sowohl Makrophagen als auch Neutrophilen Granulozyten verursacht wurde, wobei beide Zellpopulationen ihr Maximum am dritten Tag der $NO_2$-Exposition erreichten. Während die Alveolarmakrophagen im weiteren Verlauf erhöht blieben, fiel jedoch die Zahl der Neutrophilen Granulozyten nach 20 Tagen Exposition wieder ab (Garn et al., 2003). Des Weiteren wurde in Versuchen mit aufgereinigten Alveolarmakrophagen beobachtet, dass die Alveolarmakrophagen während der Exposition tatsächlich einen Aktivierungswechsel hin zu einer alternativen Aktivierung vollziehen und gefundene Effekte unter $NO_2$-Exposition also nicht nur auf Veränderungen in der BAL-Zellpopulation zurückzuführen waren.

Makrophagen und neutrophile Granulozyten als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sind in der Lage, durch Phagozytose und anschließende Produktion von Radikalen, wie beispielsweise auch Superoxid, pathogene Mikroorganismen zu eliminieren. Daher wäre unter den genannten klinischen Konditionen, mit gesteigertem Vorkommen dieser Abwehrzellen in der Lunge, ein verbesserter Schutz vor bakteriellen Infektionen zu erwarten. Jedoch sind, wie in Abschnitt 1.1.3 erläutert, Patienten mit einer COPD in besonderem Maße infektanfällig.

In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass in BAL-Zellen von $NO_2$-exponierten Ratten nach Stimulation mit Zymosan die Superoxid-Produktion signifikant vermindert ist. Dieser Effekt war schon nach 24-stündiger Exposition zu beobachten und verstärkte sich noch in dem von uns gewählten Beobachtungszeitraum (Abbildung 2). Wie bereits berichtet, kam es unter Exposition mit $NO_2$ initial zu einem gleichzeitigen Influx von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten (Garn et al., 2003). Die deutliche Abschwächung der Superoxid-Radikalbildung nach durch $NO_2$-Exposition hervorgerufenem oxidativem Stress lässt darauf schließen, dass beide

Zellpopulationen beeinflusst sind, zelltyp-spezifische Prozesse als alleinige Erklärung dieses beobachteten Phänomens erscheinen unwahrscheinlich. Unter normalen Bedingungen wird in beiden Phagozyten-Populationen die Superoxid-Radikalproduktion durch die zellmembranständige NADPH-Oxidase (Forman et al., 2002; Karupiah et al., 2000) und den Komplex III der mitochondrialen Atmungskette generiert (Lenaz, 2001; Raha et al., 2000). Mit unseren Untersuchungen an Zellen aus unbehandelten Tieren unter Einsatz von Antimycin, einem spezifischen Inhibitor des Komplexes III der Atmungskette, konnten wir zeigen, dass beide Enzymsysteme nahezu in gleichem Ausmaß an der Superoxidproduktion nach Zymosan-Stimulation in normalen BAL-Zellen beteiligt sind (Abbildung 4). Die dramatische Inhibition der Superoxidbildung von BAL-Zellen in Folge der $NO_2$-Exposition läßt vermuten, dass beide Enzymsysteme in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Um die durch $NO_2$-Exposition verursachte Hemmung genauer zu charakerisieren und die Auswirkungen des oxidativen Stresses auf die einzelnen Enzymsysteme näher zu beschreiben, setzten wir die beiden Enzyminhibitoren Antimycin und DPI ein. Auf diese Weise konnten wir eindeutig zeigen, dass der Komplex III der mitochondrialen Atmungskette deutlich sensitiver auf die $NO_2$-Exposition reagierte als die NADPH-Oxidase. Die Zugabe von Antimycin, dem spezifischen Hemmer des Komplexes III, zeigte auf Zellen von 3 bzw. 20 Tagen exponierten Tieren bezüglich der Superoxid-Produktion keinerlei Auswirkungen mehr. Daraus kann gefolgert werden, dass die Funktion des Komplexes III der Atmungskette in den BAL-Zellen nach längerer $NO_2$-Exposition bereits komplett inhibiert ist. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse der DPI-Experimente unterstützt. Hier konnten wir zeigen, dass die Zugabe dieses präferentiell die NADPH-Oxidase hemmenden Agens in allen untersuchten Konzentrationsbereichen Zellen $NO_2$-exponierter Tiere eine signifikant stärkere Hemmung der Superoxid-Produktion bewirkte als bei Kontrollzellen. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den Daten der Antimycin-Experimente, da sie zeigen, dass vor allem noch die Aktivität der NADPH-Oxidase für die Superoxid-Bildung in diesen Zellen verantwortlich zu sein scheint. Unsere Versuchsergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Brown et al. (2001) überein, dass NO und seine Derivate eine irreversible Hemmung der Atmungskette verursachen können. Welche biochemischen Mechanismen der Inhibition der beiden Enzymsysteme durch $NO_2$ zugrunde liegen, wurde von uns nicht näher untersucht und ist auch in der Literatur bisher nicht beschrieben. Denkbar sind sowohl eine direkte

biochemische Wirkung von $NO_2$ als auch indirekte Auswirkungen durch entstandene Intermediär-Moleküle, da es gerade auch über die Bildung von reaktiven Molekülen wie beispielsweise Peroxynitrit im Rahmen der durch $NO_2$-ausgelösten oxidativen Prozesse zu einem oxidativem Stress in den Zellen kommen kann. Oxidativer Stress bedeutet für die Zellen, dass reaktive Moleküle in hohen intrazellulären Konzentrationen während eines pathophysiologischen oder toxischen Ereignisses vorkommen, dass die endogenen Schutzsysteme überlastet sind und letztendlich chemische Veränderungen von biologischen Molekülen auftreten (Espey et al., 2000). Beschrieben wurde in diesem Zusammenhang beispielsweise, dass Peroxynitrit die Aminosäure Tyrosin in Proteinen so modifiziert, dass 3-Nitrotyrosin entsteht (Beckman et al., 1996). Interessanterweise gibt es eindeutige Berichte, dass die Tyrosin-Nitration Enzyme inaktivieren kann und somit funktionell in Beziehung zur Pathophysiologie von entzündlichen Prozessen steht (van der Vliet et al., 1999). Des Weiteren wurde auch beschrieben, dass reaktive Stickoxide mit Thiolen reagieren können und S-Nitrosothiole entstehen. Auch für diesen Fall wurde gezeigt, dass die Aktivität von verschiedenen Enzymen durch S-Nitrosylierung moduliert werden kann (Espey et al., 2000).

Der verminderte Nachweis von Superoxid-Radikalen im Anschluß an eine Zellstimulation mit Zymosan kann jedoch nicht nur durch eine abgeschwächte Synthese dieser reaktiven Radikale zu erklären sein, vielmehr könnten auch regulatorische Mechanismen wie die vermehrte Bildung von antioxidativen Enzymen eine Rolle spielen. Diese autoprotektiven Mechanismen sind gerade in den Zelltypen von herausragender Bedeutung, die in der Lage sind, reaktive Radikale in hohen Konzentrationen zu bilden, wie dies auch für Makrophagen zutrifft (Ferret et al., 2002). Für den Menschen hat die Kontrolle des Radikalstoffwechsels mit diesen antioxidativen Enzymen eine enorme medizinische Bedeutung. Denn obwohl reaktive Sauerstoffspezies in aeroben Organismen Teil eines wichtigen Schutzmechanismus vor eindringenden Mikroorganismen sind, so können jedoch unbalancierte und damit unkontrolliert erhöhte Konzentrationen dieser Radikale die Entwicklung verschiedenster Erkrankungen begünstigen (Zelko et al., 2002). Wie bei anderen Komponenten des Immunsystems ist also auch beim Radikalstoffwechsel von NO oder Superoxid eine protektive/destruktive Dualität inhärent (McMicking et al., 1997). Daher richteten wir ein besonderes Augenmerk auch auf den antioxidativen Stoffwechsel der BAL-Zellen. Wir untersuchten, ob es unter $NO_2$-Exposition zu adaptiven Veränderungen in der Expression und/oder Aktivität beteiligter Enzymsysteme kommt. Die einzigen Enzyme,

die die Umwandlung von Superoxid-Radikalen in Wasserstoffperoxid katalysieren, sind Superoxiddismutasen (Kinnula at al., 2003). Es existieren drei Isoformen der Superoxiddismutasen: die zytosolische CuZn-SOD (oder SOD1), die mitochondriale MnSOD (SOD2) und die extrazelluläre SOD (ecSOD oder SOD3) (Zelko et al., 2002). Wir fokussierten unsere Untersuchungen auf die beiden intrazellulären Isoformen und fanden eine vermehrte mRNA-Expression der CuZn-SOD in Tieren aller Behandlungsgruppen, wohingegen für die Mn-SOD keine veränderte mRNA-Expression nachweisbar war. Bekannterweise werden beide Formen der SOD in zahlreichen Zelltypen, wie beispielsweise auch in Alveolarmakrophagen, konstitutiv exprimiert. Dabei kann die Expression durch verschiedene Stimuli, wie beispielsweise Hyperoxie, Ozon oder auch Zigarettenrauch, gesteigert werden (Sohn et al., 1993; Kong et al., 1993). Bisher wurde in einigen Studien beschrieben, dass die Mn-SOD während verschiedener, durch Oxidantien hervorgerufener entzündlicher Prozesse im Lungengewebe, in Typ-II-Pneumozyten und in interstitiellen Fibroblasten verstärkt exprimiert und die Aktivität gesteigert wird, andererseits keine Veränderungen bezüglich Expression und Aktivität der CuZn-SOD beobachtet wurden (Kinnula et al., 2003). Allerdings zeigten unsere Untersuchungen in BAL-Zellen eine gegensätzliche Regulation der beiden intrazellulären Isoformen der SOD, zumindest auf mRNA-Ebene. Trotz der in allen Behandlungsgruppen erhöhten mRNA-Expression der CuZn-SOD fanden wir jedoch für die Gesamtaktivität des Enzyms nur eine Aktivitätssteigerung in der Gruppe der 20 Tage $NO_2$-exponierten Ratten. Diese Daten stützen die Erkenntnisse von Kong et al. (1993), dass eine erhöhte mRNA-Expression nicht notwendigerweise zu einer gesteigerten Enzymaktivität führen muss. Eine Erklärung hierfür könnten posttranslationale Prozesse sein (Yamakura et al., 1998). Diese Autoren konnten zeigen, dass in dem Enzym Mn-SOD die an Position 34 befindliche Aminosäure Tyrosin durch Peroxynitrit zu 3-Nitrotyrosin umgewandelt wurde, was zur Inaktivierung des Enzyms führte. Die Hochregulation der Superoxiddismutasen kann als adaptiver Prozess der Zellen in Folge des durch $NO_2$-induzierten oxidativen Stresses mit autoprotektiver Wirkung verstanden werden. Mittels einer stabil transfizierten Makrophagen-Zelllinie konnte in diesem Zusammenhang beispielsweise gezeigt werden, dass Zellen durch eine Überexpression der CuZn-SOD resistenter gegen endogenes und exogenes NO wurden (Brockhaus et al., 1999). In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der MnSOD zu einem Schutz vor der zytotoxischen Wirkung von Zigarettenrauch führte (St Clair et al., 1994).

Das durch die Superoxiddismutasen entstandene Wasserstoffperoxid wird in der Folge durch die Enzyme Katalase und Glutathion Peroxidasen (GPx) zu Wasser reduziert (Forman et al., 2002). Bezüglich der Expression und der Enzymaktivität fanden wir für die Gluthation Peroxidasen ähnliche Ergebnisse wie für die Superoxiddismutasen. Obwohl für GPx-3 auf mRNA-Ebene eine starke Induktion der Genexpression in Zellen von für 3 bzw. 20 Tage mit $NO_2$ exponierten Tieren nachweisbar war, sahen wir einen schwachen Anstieg der Gesamt-GPx-Enzymaktivität nur in den 20 Tage exponierten Tieren. Auch diesem Effekt kann neben posttranslationalen Regulationsmechanismen eine partielle Inaktivierung der Glutathion Peroxidasen durch Stickoxide zu Grunde liegen, wie sowohl für NO als auch für Peroxynitrit beschrieben (Asahi et al., 1995; Padmaja et al., 1998).

Zusammenfassend kann bezüglich der von uns untersuchten antioxidativen Enzyme festgestellt werden, dass trotz der beobachteten vermehrten mRNA-Expression für einige Isoenzyme der SOD und GPx, eine gesteigerte Aktivität dieser Enzyme nicht die hauptsächliche Ursache für die reduzierte Superoxid-Bildung von BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Ratten zu sein scheint.

Die Daten, die zur Superoxidproduktion von Alveolarmakrophagen von Patienten mit COPD und Rauchern existieren, sind kontrovers. Hoidal et al. (1984) beobachteten sowohl spontan als auch nach PMA-Stimulation einen Anstieg der Superoxid-Produktion in Alveolarmakrophagen von Rauchern, verglichen mit Alveolarmakrophagen von Nichtrauchern (Hoidal et al., 1984). Andere Arbeitsgruppen wiederum sahen beim Vergleich von Alveolarmakrophagen von Rauchern und Nichtrauchern keine Unterschiede in der Superoxid-Produktion nach PMA-Stimulation (Schaberg et al., 1992), es wurde aber auch von einer abgeschwächten Bildung reaktiver Sauerstoffradikale nach PMA-Stimulation in Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten berichtet (Verhoeven et al., 2000). Wichtig zu erwähnen ist, dass all diese Studien mit einer Alveolarmakrophagen-Stimulation durch PMA durchgeführt wurden, wir im Gegensatz in unseren Experimenten aber Zymosan als Stimulus verwendeten. Dies ist von Bedeutung, da bekanntermaßen Alveolarmakrophagen im Gegensatz zu neu eingewanderten Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten nach PMA-Stimulation nur eine abgeschwächte Reaktivität zeigen, wofür eine Defizienz in der Proteinkinase C-Aktivität von Alveolarmakrophagen verantwortlich gemacht wird (Monick et al., 1998; Peters-Golden M., 1991). Für Zymosan-Partikel jedoch, die schon seit über 50 Jahren zur Stimulation von Makrophagen benutzt werden, wurden

inzwischen zahlreiche verschiedene, auch PKC-unabhängige intrazelluläre Signaltransduktionswege beschrieben (Goldman R. et al., 1994; Gozal E. et al., 2001; Underhill D.M., 2003). Daher könnten Daten, die nach BAL-Zellstimulation durch PMA gewonnen wurden, eher durch Veränderungen in der Zusammensetzung der BAL-Zellpopulation begründet sein, als dass durch sie definitive Aussagen über die Fähigkeit von BAL-Zellen, reaktive Sauerstoffmetaboliten zu bilden, getroffen werden können. Zymosan jedoch erscheint als starker Phagozytosereiz ein geeigneterer Stimulus für Alveolarmakrophagen zu sein als PMA. Diese Überlegungen konnten wir auch in eigenen Vorversuchen bestätigen, da wir, im Gegensatz zur Stimulation der BAL-Zellen mit Zymosan durch PMA nur eine sehr schwache Superoxidbildung nachweisen konnten (Daten nicht gezeigt).

Neben den Veränderungen in der Freisetzung von Zytokinen, die unsere Arbeitsgruppe in früheren Experimenten nachweisen konnte und die wir in dieser Arbeit bestätigt und ergänzt haben (Garn et al., 2003), sind die gefundenen Veränderungen im Radikalstoffwechsel ein weiterer Hinweis darauf, dass Alveolarmakrophagen unter $NO_2$-Exposition einem Aktivierungswechsel hin zu einer alternativen Aktivierung unterliegen. Superoxid gilt als typisches „Killer“-Molekül von klassisch aktivierten Makrophagen, wohingegen die Superoxid-Produktion in alternativ aktivierten Makrophagen supprimiert ist (Goerdt et al., 1999; Becker et al., 1990). Der Aktivierungswechsel der Alveolarmakrophagen erscheint wichtig für das Zusammenspiel mit klassisch aktivierten Zellen, um eine ausgewogene Balance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mechanismen sicherzustellen und kann in unserem Tiermodell als auto-protektiver Mechanismus im durch $NO_2$-induzierten Inflammationsprozess gedeutet werden. Ein Überwiegen von alternativ aktivierten Makrophagen jedoch unterstützt eine erhöhte Infektanfälligkeit (Goerdt et al., 1999). Eine klare Konsequenz der reduzierten Superoxid-Produktion von stimulierten BAL-Zellen kann allerdings sein, dass die Kapazität dieser Abwehrzellen, bakterielle Infektionen zu bekämpfen, vermindert ist. Die Superoxid-Bildung durch Phagozyten ist ein unerlässlicher Schritt im Abtöten von Krankheitserregern und jeder Defekt in dieser Funktion exponiert zu bakteriellen Infektionen (Djaldetti et al., 2002).

Darüber hinaus könnten aber auch weitere physiologische Aspekte von Bedeutung sein. So können reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten mit biologischen Molekülen reagieren. Es kann zu Veränderungen von Proteinen mit anschliessendem Funktionsverlust kommen, die reaktiven Radikale können DNA spalten oder

Lipidkomponenten oxidieren, so dass Membranen zerstört werden. In diesem Zusammenhang ist von besonderer Bedeutung, dass Superoxid im Zusammenspiel mit reaktiven Nitratverbindungen direkt an der Bildung von Peroxynitrit beteiligt ist (Groves, 1999). Peroxynitrit als hochreaktives Molekül kann, wie bereits dargestellt, unter anderem auch mit zahlreichen Enzymen reagieren, diese in der Folge inaktivieren und somit zelluläre Funktionen stark beeinträchtigen. Daher könnte die verminderte Superoxid-Bildung von BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Ratten ein Mechanismus sein, wie sich die Zellen vor diesen toxischen Reaktion schützen können. Reaktionen von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen mit biologischen Molekülen sind aber nicht in jedem Falle pathologische Ereignisse, zum Teil sind sie auch bei Abwehrfunktionen des Immunsystems oder als Bestandteile von Signaltransduktionskaskaden von physiologischer Bedeutung (Groves, 1999). So konnte für verschiedene reaktive Sauerstoffradikale gezeigt werden, dass sie second messenger sein können, wobei beispielsweise NfkappaB oder ERK und p38-MAP-Kinasen in Makrophagen induziert wurden (Sanlioglu et al., 2001; Ogura et al., 1998). Daher ist es möglich, dass die abgeschwächte Bildung von Superoxidradikalen in Alveolarmakrophagen von $NO_2$-exponierten Ratten Auswirkungen auf intrazelluläre Signalkaskaden hat und auf diese Weise die Aktivierung in diesen Zellen beeinflusst. Dies ist gerade auch vor dem Hintergrund des aufgezeigten Aktivierungswechsels der Alveolarmakrophagen hin zu einer alternativen Aktivierung interessant. Ob jedoch tatsächlich eine veränderte Redox-Signaltransduktion in diese Prozesse involviert ist, kann derzeit nicht beantwortet werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Alveolarmakrophagen von Ratten im Rahmen einer $NO_2$-Exposition der Tiere eine funktionelle Änderung erfahren, die sich vor allem an der supprimierten Fähigkeit dieser Zellen zeigt, nach entsprechender Stimulation Superoxidradikale zu bilden. Sollte diese Schwächung der Reaktivität der Phagozyten auch in humanen COPD-Patienten zu beobachten sein, könnten unsere Daten eine Erklärung für die vermehrte Inzidenz von bakteriellen und viralen Infektionen im Rahmen der COPD und den daraus resultierenden Exazerbationen darstellen. Diese Entdeckungen könnten ein Ansatz für neue Therapiekonzepte sein. Hierbei könnte das Ziel verfolgt werden, die Abwehrfähigkeit von Alveolarmakrophagen wiederherzustellen und somit körpereigene Abwehrmechanismen im Rahmen einer exazerbierten COPD zu fördern.

## 4.2 Einfluss von SP-A auf die Zytokinfreisezung von BAL-Zellen

Aufgrund der enormen Oberfläche der Alveolen ist die Lunge ein Organ, das wie kein anderes direkt Umwelteinflüssen ausgesetzt ist. Somit haben Abwehrmechanismen eine besondere Bedeutung. Hierbei sind allgemeine Mechanismen wie anatomische Barrieren im Nasopharynx sowie zahlreiche weitere physikalische und chemische Barrieren, wie Hustenreflex, kinoziliärer Apparat, Surfactant und Mukus mit wichtigen Elementen wie z.B. dem Lysozym erwähnenswert (Nicod 1999). Als Komponenten des angeborenen Immunsystems sind für die primäre antimikrobielle Verteidigung auf zellulärer Ebene Phagozyten entscheidend (McCormack et al. 2002). Die Mehrheit der in der Lunge vorkommenden Phagozyten sind Makrophagen, die in besonderem Maße auf die Umwelteinflüsse reagieren können, indem sie für die Clearence von Mikropartikeln und Mikroorganismen verantwortlich sind (Sibille et al. 1990). Neben den Makrophagen sind aber, wie bereits erwähnt, noch viele andere Faktoren, wie beispielsweise Arachidonsäure-Metabolite, das Komplemensystem und mikrobizide Peptide in die angeborene Immunantwort involviert (Strieter et al., 2002). Für die Steuerung all dieser Abwehrprozesse sind Zytokine, eine Gruppe von Proteinen, die durch Bindung an spezifische Rezeptoren Reaktionen in Zielzellen auslösen, von entscheidender Bedeutung (Janeway und Travers, 2002). Dabei ist sowohl die Initiation, als auch das Aufrechterhalten und die anschließende Auflösung der pulmonalen Immunantwort von der interzellulären Kommunikation vermittelt durch Zytokine abhängig (Strieter et al., 2002). Wie die Autoren ausführen, haben die Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellpopulationen zu dem Konzept des „Zytokin-Netzwerkes“ geführt. Hierunter versteht man, dass eine Zellpopulation direkt auf spezifische exogene und endogene Stimuli mit der Freisetzung von einem speziellen Zytokin antwortet, das weitere Effekte auf andere Zelltypen ausübt. Diese Zielzellen reagierten nun ihrerseits mit der Bildung eines spezifischen Zytokins, was wiederum als Feedback-Signal auf die Urspungszelle wirkt oder alternativ weitere andere Zielzellen beeinflusst und somit zu einer Amplifikation der Zytokin-Kaskade führt.

Zytokine können auf verschiedene Art und Weisen klassifiziert werden, wobei beispielsweise eine Einteilung in Familien aufgrund ihrer Struktur erfolgen kann (Janeway und Travers, 2002). Des Weiteren hat es sich durchgesetzt, Zytokine entsprechend ihrer pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften einzuteilen, wobei dies auf die Arbeiten von Mosmann et al. zurückzuführen ist (Mosmann et al., 1986). Die Arbeitsgruppe entdeckte, dass Untergruppen von T-Helferzellen dnach ihrem

Zytokinmuster klassifiziert werden können. Entsprechend wurden Zytokine in der Folgezeit in zwei Kategorien klassifiziert: eine proinflammatorische TH-1-Zytokingruppe und eine antiinflammatorische TH-2-Zytokingruppe. Jedoch stellt diese Klassifikation eine starke Vereinfachung eines komplexeren Sachverhaltes dar, können doch bellen proinflammatorisch sein. Auch werden die Wirkungsweisen eines Zytokins unter anderem von Zytokinmenge, Art der Zielzelle, Art des Aktivierungssignals und des Zeitpunktes beeinflusst, so dass einige Zytokine sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen entfalten können (Cavaillon 2001). Insgesamt wir die Intensität der angeborenen Immunität aber von dem Verhältnis der TH-1- und TH-2-Zytokine moduliert (Strieter et al. 2003).

Ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin ist TNFα. Es wird überwiegend von Zellen des mononukleären Phagozytensystems gebildet, wobei LPS, aber auch andere bakterielle Produkte und Viren eine stimulierende Wirkung haben (Gemsa, Kalden, Resch, 1997). Es hat eine große Bedeutung im Immunsystem, da es die lokale Eindämmung von Infektionen aktiviert (Janeway und Travers, 2002). TNFα führt u.a. zur Hochregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen und erleichtert somit im Rahmen einer Inflammation das Einwandern von Entzündungszellen (Thomas 2001). Desweiteren induziert TNFα die Bildung von Genprodukten proinflammatorischer Enzyme wie der Cyclooxigenase II, der Phospholipase A2 oder der induzierbaren NO-Synthase (Dinarello 2000). Dies führt lokal zur Auslösung einer Entzündung mit verstärktem Blutfluß – was eine Rötung und Überwärmung bedingt -, einer Permeabilitätssteigerung der Gefäße – was eine Schwellung zur Folge hat - und einer Schmerzauslösung. So induziert TNFα also die klassischen 4 Kardinalsymptome einer Entzündung und ist damit an der lokalen Bekämpfung einer Infektion wesentlich beteiligt. Eine systemische Freisetzung von TNFα hat jedoch fatale Auswirkungen, spielt dieses Zytokin doch auch eine Hauptrolle in der Pathogenese des septischen Schock-Syndroms (Tracey et al., 1993) und des „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS), dort sekundär freigesetzt nach Infektion, Verbrennung, Trauma oder hämorrhagischem Schock (Strieter et al., 1993). Trotz der Beteiligung an zahlreichen pathophysiologischen Ereignissen während einer systemischen Inflammation stellt TNFα in der Lunge jedoch eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems dar. Dies konnten Chen et al. (2000) zeigen, indem sie in einem Sepsis-Mausmodell die Auswirkungen einer transienten transgenetischen Expression von TNFα in der Lunge während einer Pseudomonas aeruginosa-Pneumonie in der postseptischen Phase

untersuchten. Sie fanden in diesem Modell, dass die Expression von TNFα lokal in der Lunge mit einer verbesserten Überlebensrate der Tiere und einer gesteigerten bakteriellen Clearence assoziiert war. Auch für zahlreiche andere Lungeninfektionen wie beispielsweise Klebsiella-Pneumonie oder Aspergillose konnte in verschiedensten Versuchen die essentielle Funktion von TNFα als Zytokin der angeborenen Immunität bewiesen werden (Moore et al., 2003; Mehrad et al., 1999).

Das Interleukin 10 (IL-10) wird den antiinflamatorischen Zytokinen zugerechnet, seitdem ein hemmender Effekt von IL-10 auf die Fähigkeit von Makrophagen, nach LPS-Stimulation proinflammatorische Zytokine zu bilden, beschrieben wurde (Mosmann et al., 1991; Fiorentino et al., 1991). In der Folge sind zahlreiche Erkenntnisse auch bezüglich der Rolle von IL-10 im angeborenen pulmonalen Abwehrsystem hinzugekommen. Viele Arbeiten konnten zeigen, dass Alveolarmakrophagen in fortgeschrittenen Stadien bestimmter Lungenerkrankungen wie Sarkoidose, interstitiellen Lungenerkrankungen oder COPD vermehrt IL-10 bilden, wohingegen residente Alveolarmakrophagen auch nach Stimulation mit LPS dazu nicht in der Lage waren (Oltmans et al., 2003; Martinez et al., 1997; Garn et al., 2003). Auch in einem Maus-Pneumonie-Modell wurden ähnliche Ergebnisse gefunden. So beschrieben Greenberger et al. (1995), dass nach intratrachealer Inokulation von Klebsiella pneumonia neben der sofortigen Bildung von proinflammatorischen Zytokinen auch ein verzögert einsetzender Anstieg von IL-10 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mit einem Maximum 48 Stunden post inoculationem gesehen wurde. Desweiteren blockten die Autoren endogenes IL-10 durch Behandlung der Mäuse mit einem anti-IL-10-Antiserum und beobachteten einen weiteren Anstieg der proinflammatorischen Zytokine. Dies führte dazu, dass Untersuchungen in Plasma und Lungen der Tiere ein Abfall der Klebsiella-Titer zu verzeichnen war und sich gleichzeitig die Überlebensrate der Mäuse unter Behandlung mit IL-10-Antiserum signifikant verbesserte. Ähnliche Wirkungen von IL-10 wurden auch in einem Sepsis-induzierendem Pseudomonas-Pneumonie-Mausmodell gefunden. Hier konnte gezeigt werden, dass im Stadium der Sepsis nach Pseudomonas-Pneumonie das angeborene Immunsystem geschwächt ist und dieser Effekt durch endogen gebildetes IL-10 ausgelöst wurde. Auch in diesem Modell konnte durch Gabe von anti-IL-10-Antikörpern sowohl die Clearence von Bakterien in den Lungen als auch das Überleben der Tiere gesteigert wurden (Steinhauser et al., 1999). Demgegenüber konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass sich in einem Mausmodell durch Verabreichung

von rekombinantem IL-10 die Auswirkungen einer LPS-Gabe mit anschließendem TNFα-Anstieg und nachfolgendem septischen Schock abmildern ließ und somit in diesem Modell die Letalität durch Applikation von IL-10 gesenkt werden konnte (Gérard et al., 1993). Auch im Menschen bewirkt eine Vorbehandlung mit rekombinantem IL-10 bei nachfolgender LPS-Gabe eine Abschwächung der endotoxin-induzierten Fieber- und Zytokin-Antwort (Pajkrt et al., 1997). Wie man an der Inhibition der Freisetzung von TNFα sehen kann, ist IL-10 ein Gegenspieler dieses klassischen proinflammatorischen Zytokins.

Wesentlich für den erfolgreichen Ablauf einer Abwehrreaktion gegen eindringende Mikroorganismen ist des Weiteren das gezielte Anlocken von Leukozyten in den Entzündungsherd. Diese Funktion wird unter anderem von Chemokinen, einer Gruppe chemotaktisch wirkender Zytokine, ausgeübt (Janeway und Travers, 2002). Sie regulieren die gerichtete Wanderung spezieller Leukozytenpopulationen und haben somit wesentlichen Einfluss auf die Form der ausgelösten Immunantwort. MCP-1, ein Chemokin der CC-Chemokingruppe, das von LPS, TNFα und IL-1 induziert wird, vermittelt hierbei die Chemotaxis und Aktivierung von Monozyten (Brieland et al., 1995). Dies spielt auch eine große Rolle bei Erkrankungen der Lunge wie beispielsweise der COPD, wo es im Verlauf der Erkrankung zu einem massiven Einwandern von Makrophagen in die Lunge kommt (Garn et al., 2003). Aber auch in die Pathogenese anderer Lungenerkrankungen ist MCP-1 involviert. So zeigten Rose et al. (2003), dass MCP-1 in Tiermodellen von allergischem Asthma, idiopathischer pulmonaler Fibrose und Bronchiolitis obliterans vermehrt gebildet wird und der Krankheitsprozess durch Immunneutralisation von MCP-1 abgeschwächt werden konnte. Auch wird die schnelle Expansion von Alveolarmakrophagen-Populationen in der Lunge, wie es bei Patienten mit ARDS zu beobachten ist, durch einen schnellen Influx von Monozyten des vaskulären Kompartimentes ausgelöst. Auch dieser Effekt wird im Wesentlichen durch MCP-1 hervorgerufen (Rosseau et al. 2000).

Die Ergebnisse all dieser Arbeiten zur Funktion von Zytokinen und Chemokinen verdeutlichen, dass das Immunsystem ein extrem fein reguliertes System ist. Die Ausprägung einer Immunantwort ist dabei von dem Zusammenspiel der beteiligten Zytokine wesentlich abhängig. Dabei kann dem einzelnen Zytokin nicht pauschal eine Wirkung zugeschrieben werden, vielmehr muss es immer im Zusammenhang der jeweiligen Krankheitskondition gesehen werden. So kann, wie oben aufgeführt, beispielsweise TNFα in einem Fall unerlässlich für die Bekämpfung einer Erkrankung

sein (z.B. bakterielle Pneumonie), in einem anderen Fall aber kann gerade die Freisetzung des Zytokins die Erkrankung ausmachen (z.B. Sepsis).

Eine Zielsetzung unserer Arbeit war es, die Zytokinfreisetzung von Alveolarmakrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten einer $NO_2$-Exposition näher zu analysieren, wie das Surfactant Protein-A regulierend in diesen Prozess eingreift.

Unsere Ergebnisse zur Freisetzung von IL-10 und TNFα nach LPS-Stimulation bestätigten die in einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe gewonnenen Erkenntnisse, dass die Alveolarmakrophagen im Verlauf einer $NO_2$-Behandlung einen Aktivierungswechsel hin zu einer alternativen Aktivierung durchlaufen (Garn et al., 2003). Wir bestätigten im Vergleich zu Kontrolltieren einen Abfall der TNFα-Sekretion nach drei- und zwanzigtägiger $NO_2$-Exposition und zeigten eine gesteigerte IL-10-Bildung nach dreitägiger Exposition.

Die Zugabe von SP-A mit einer Konzentration von 20 µg/ml in der Zellkultur führte nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der Freisetzung von TNFα und IL-10. Nur bei Zellen von 3- beziehungsweise 20-tägig exponierten Tieren kam es zu einer in der Tendenz verminderten TNFα-Freisetzung. Auch bezüglich der IL-10-Freisetzung nach LPS-Stimulation konnten wir keinen durch SP-A in dieser Konzentration hervorgerufenen signifikanten Effekt beobachten. Nur die Alveolarmakrophagen von Tieren nach dreitägiger $NO_2$-Exposition waren zur Bildung dieses Zytokins in größerer Menge in der Lage, wobei sich lediglich eine leichte Tendenz zur gesteigerten Freisetzung von IL-10 nach Zugabe von SP-A zeigte. Da teilweise eine Tendenz für den Effekt eines Aktivierungswechsels von Alveolarmakrophagen unter $NO_2$-Exposition zu beobachten war, entschieden wir uns, eine mit 50 µg/ml unüblich hohe SP-A Konzentration einzusetzen, um eine potentielle Wirkung von SP-A doch noch aufzuzeigen. Tatsächlich konnte die Tendenz bestätigt werden, da die TNFα-Bildung der BAL-Zellen aus für 3 bzw. 20 Tage mit $NO_2$ exponierten Tiere nach LPS-Stimulation um 35 % bzw. um 25 % gehemmt wurde, die TNFα-Sekretion der Alveolarmakrophagen von Kontrolltieren und Tieren nach eintägiger $NO_2$-Exposition jedoch nicht signifikant beeinflusst wurde. Interessanterweise führte SP-A in der Konzentration von 50 µg/ml bei Zellen von dreitägig behandelten Tieren des Weiteren zu einer um 35 % gesteigerten IL-10-Synthese.

Zusammenfassend kann ausgeführt werden, dass wir zum einen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bezüglich der SP-A-Wirkung auf die Zytokinfreisetzung von stimulierten Alveolarmakrophagen nicht bestätigten konnten, zum anderen auch ein von

uns postulierter signifikanter SP-A-Effekt auf Zellen von Tieren der verschiedenen Behandlungsgruppen nicht nachweisbar war. In zahlreichen Arbeiten wurdem deutliche Effekte einer SP-A-Zugabe auf Alveolarmakrophagen nach LPS-Stimualtion beschrieben, wobei häufig von einer Inhibition der TNFα-Sekretion in einer Größenordnung von circa 40 – 80 % berichtet wurde (Alcorn et al., 2003; McIntosh et al., 1996; Sano et al., 1999; Rousseau et al., 1999). Vergleichbar mit diesen Effekten hätten die Ergebnisse unserer Versuche mit Zellen von Kontrolltieren sein müssen, doch konnten wir nach LPS-Stimualtion dieser Alveolarmakrophagen keinen SP-A-Effekt beobachten. Zu erwähnen ist, dass wir unterschiedliche Varianten des Versuchsaufbaus mit Änderungen der Art und der Konzentration der Makrophagenstimulation und Veränderungen der Dauer der SP-A-Inkubation vor Zellstimulation durchführten und auch hierbei keine stärkeren Effekte sahen (Daten nicht gezeigt). Die Beurteilung der von uns gefundenen Ergebnisse bezüglich der IL-10-Syntheseleistung ist nicht so eindeutig wie für die TNFα-Bildung. Für IL-10 liegen kaum Daten zur Beeinflussung der Sekretion durch SP-A vor, da residente Alveolarmakrophagen kaum in der Lage sind, IL-10 zu bilden (Salez et al., 2001). In dieser Arbeit zeigten wir erstmals, dass eingewanderte Makrophagen bei Entzündungsvorgängen in der Lunge nach LPS-Stimulation IL-10 bilden können und diese IL-10-Produktion durch SP-A gehemmt wird. Dies wird auch durch eine weitere Arbeit von Chabot et al. (2003) bestätigt, wo eine intratracheale Verabreichung von SP-A in vivo zu einer verminderten Bildung von IL-10 während einer LPS-induzierten Entzündung der Lungen führte. Dem gegenüber stehen Ergebnisse von Experimenten mit SP-A-knock-out-Mäusen von LeVine et al. (2002). Diese Autoren beobachteten, dass während einer Lungeninfektion mit Influenza-A-Viren die TH-2-Antwort abgeschwächt und geringere Mengen an IL-10 in den Lungen der Knock-out-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nachweisbar waren. Somit scheint in diesem Modell SP-A eine Hochregulation des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zu bewirken. Die Ergebnisse von LeVine et al. müssen aber nicht im Widerspruch zu denen von Chabot et al. stehen, handelt es sich doch um einen gänzlich anderen Versuchsaufbau mit anderem Entzündungsstimulus und daraus resultierend einer anderen Zusammensetzung des zellulären Infiltrats.

Erstmals konnten wir die Sekretionsleistung von Alveolarmakrophagen bezüglich des Chemokins MCP-1 im Verlauf der durch $NO_2$-Exposition hervorgerufenen COPD in Ratten beschreiben. Wir sahen, dass nach LPS-Stimulation die Zellen von Alveolarmakrophagen der eintägig exponierten Tiere 46 % mehr MCP-1 bildeten als

die Zellen der Kontrolltiere, wohingegen bei Zellen der für 20 Tage $NO_2$-exponierten Tiere eine tendentiell verminderte MCP-1-Bildung im Vergleich zu Zellen aus Kontrolltieren zu beobachten war. SP-A bewirkte in der Konzentration von 20 µg/ml eine in allen Tiergruppen nahezu gleich ausgeprägte Hemmung der MCP-1-Synthese um rund 30 %, in der Konzentration von 50 µg/ml um rund 40 %.

Diese Ergebnisse der verminderten MCP-1-Freisetzung nach langdauernder $NO_2$-Exopsition bestätigen unsere Hypothese, dass es in der chronischen Phase einer COPD zu einem Aktivierungswechsel der Alveolarmakrophagen kommt. MCP-1 beeinflusst bekanntermaßen die Polarisation der Th1/Th2-Immunantwort in der Weise, dass ein Abfall von MCP-1 zu einer Verschiebung zu Th2-Antworten in der Lunge führt (Traynor et al., 2002). Die von uns in allen Tiergruppen beobachtete Hemmung der MCP-1-Synthese durch SP-A kann als zusätzliche Bestätigung der antiinflammatorischen Wirkung dieses Surfactant-Proteins gewertet werden. In der Literatur gibt es allerdings bezüglich des SP-A-Einflusses auf die MCP-1-Bildung insbesondere nach LPS-Stimulation kaum Daten, jedoch berichteten Rousseau et al. (1999) von einer fast vollständigen Suppression der MCP-1-Synthese durch SP-A nach Zellstimulation mit Candida albicans.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass wir mit dem von uns verwendeten rekombinanten SP-A keine so deutlichen Effekte bezüglich der Beeinflussung der Zytokinfreisetzung von Alveolarmakrophagen nach LPS-Stimulation erzielen konnten, wie dies nach der gängigen Literatur zu erwarten gewesen wäre. Ein Grund hierfür kann sein, dass in der Charge dieses rekombinanten SP-A das Protein nur zu einem geringen Teil in aktiver Form vorlag, so dass wir in der eingesetzten Konzentration auch nur geringe Effekte sehen konnten. Die Firma BykGulden, die das rekombinante SP-A freundlicherweise zur Verfügung gestellt hatte, berichtete auch von anderen, ebenfalls nicht eindeutigen Ergebnissen, die mit dieser SP-A-Charge erzielt wurden. Ein genauerer Einblick in den Aufbau und die Ergebnisse dieser Versuche liegt uns jedoch nicht vor. In der Tendenz konnten wir die antiinflammatorische Wirkung von SP-A auf die Zytokinfreisetzung bestätigen. Interessanterweise fanden wir hierbei bezüglich der Zytokine TNFα und IL-10, dass diese Wirkung besonders auf Zellen aus chronischen Stadien ausgeübt wurde. Dieser Wechsel hin zu einem antiinflammatorischen Zytokinmuster, den wir bei Alveolarmakrophagen im Verlauf der $NO_2$-Exposition beobachteten und der durch SP-A verstärkt wurde, könnte als autoprotektive Reaktion im Verlaufe einer langdauernden Entzündung gesehen werden. Dies wird beispielsweise

deutlich, wenn man einbezieht, dass eine Imbalance zwischen Proteasen und Antiproteasen eine Hauptrolle in der Emphysementstehung spielt und IL-10 das Verhältnis der Protease MMP-9 zur Antiprotease TIMP-1 beeinflussen kann (Lim et al., 2000). Desweiteren wird in Alveolarmakrophagen von Sarkoidose-Patienten die Freisetzung der Protease MMP-2 durch Gabe von exogenem IL-10 herabreguliert (John et al., 2002).

Die von uns gefundene Veränderung der Zytokinfreisetzung kann daher möglicherweise die Emphysementstehung in der Lunge hemmen, kann aber auch andere Folgen haben. Wie bereits dargestellt, ist zur Bekämpfung zahlreicher Infektionen in der Lunge ein proinflammatorischer Aktivierungsstatus der Alveolarmakrophagen essentiell, so dass die von uns gefundenen Änderungen des Zytokinmusters von aktivierten Alveolarmakrophagen zu einer gesteigerten Infektanfälligkeit führen könnten.

Die Balance der pro- und antiinflammatorischen Aktivität des Immunsystems spielt also eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Lungenerkrankungen, wobei der jeweilige Aktivierungsstatus der beteiligten Zellen Vor- und Nachteile für verschiedene Krankheitsaspekte zu haben scheint. Zukünftig ist ein weitreichenderes Verständnis dieser Prozesse wünschenswert, um gegebenenfalls gezielte therapeutische Interventionen durchführen zu können. Hierbei wäre beispielsweise die exogene Gabe von Zytokinen oder von Substanzen, die gezielt die Freisetzung von Zytokinen induzieren können, denkbar.

# 5 ZUSAMMENFASSUNG

Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sind in der Lage, durch Phagozytose und anschließende Produktion von Radikalen, wie beispielsweise auch Superoxid, pathogene Mikroorganismen zu eliminieren. Da diese Effektorzellen des angeborenen Immunsystems in Lungen von Patienten mit COPD vermehrt vorkommen, wäre im Rahmen dieser Erkrankung ein verbesserter Schutz vor bakteriellen Infektionen zu erwarten. Die Praxis zeigt aber, dass es bei Patienten mit COPD häufig zu einer bakteriell induzierten Exazerbation kommt.

Um die diesem Phänomen zugrunde liegenden Mechanismen besser verstehen zu können, bestand die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit in der funktionellen Charakterisierung von BAL-Zellen exponierter Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer $NO_2$-induzierten Entzündung. Hierbei stellten wir die Haupthypothese auf, dass es in BAL-Zellen $NO_2$-exponierter Tiere zu einem Aktivierungswechsel hin zu einer alternativen Aktivierung kommt. In unseren Experimenten legten wir einen Schwerpunkt auf die Untersuchung des Radikal-Stoffwechsels sowie der Zytokinsekretion von BAL-Zellen von Tieren nach unterschiedlich langer $NO_2$-Exposition (24 Stunden, 3 Tage, 20 Tage) im Vergleich zu BAL-Zellen gesunder Kontrolltiere.

Wir konnten zeigen, dass die durch Zymosan-Stimulation induzierte Superoxid-Produktion in BAL-Zellen von $NO_2$-exponierten Ratten zu allen untersuchten Zeitpunkten der Entzündung signifikant vermindert war. Der Einsatz von Enzyminhibitoren offenbarte, dass die für die Superoxid-Synthese wesentlichen Enzymsysteme, die NADPH-Oxidase sowie der Komplex III der mitochondrialen Atmungskette, durch $NO_2$-Exposition in ihrer Funktion beeinflußt wurden. Bei der Untersuchung der Transskription von im oxidativen/antioxidativen Stoffwechsel beteiligten Enzymen konnten wir zeigen, dass die mRNA einzelner Isoformen der SOD und der GPx nach $NO_2$-Exposition vermehrt exprimiert wurde. Des Weiteren untersuchten wir die Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und GPx in BAL-Zellen mittels Funktionsassays. Hierbei konnten wir nachweisen, dass es in BAL-Zellen von Tieren nach 20-tägiger $NO_2$-Exposition zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität beider Enzymsysteme kam.

Im Prozess der Infektabwehr und Immunmodulation kommt neben dem Radikalstoffwechsel auch der Sekretion von Zytokinen eine besondere Bedeutung zu.

Wir untersuchten, inwieweit das Surfactant Protein-A zu unterschiedlichen Zeitpunkten der $NO_2$-induzierten Entzündung die Zytokinfreisetzung von BAL-Zellen beeinflussen kann.

Wir konnten nachweisen, dass die LPS-induzierte TNFα-Sekretion der BAL-Zellen von Tieren nach 3 oder 20 Tagen $NO_2$-Exposition im Vergleich zu der von Kontrolltieren signifikant geringer war. SP-A bewirkte in den BAL-Zellen nach 20-tägiger $NO_2$-Exposition eine weitere, jedoch nicht signifikante Hemmung der TNFα-Sekretion. Bezüglich der Sekretion von IL-10 waren nur Tiere nach 3-tägiger $NO_2$-Exposition zu einer nennenswerten Zytokinfreisetzung in der Lage. Die SP-A-Zugabe führte in der Tendenz zu einer verstärkten Sekretion dieses antiinflammatorischen Zytokins. Die Sekretion des Chemokins MCP-1 der BAL-Zellen wurde durch $NO_2$-Exposition in den einzelnen Phasen der induzierten Entzündung unterschiedlich beeinflusst. Die Zugabe von SP-A führte hingegen zu einer einheitlichen Suppression der Freisetzung des proinflammatorischen Chemokins unabhängig von einer vorherigen $NO_2$-Exposition der Versuchstiere.

Zusammenfassend zeigten unsere Untersuchungen, dass BAL-Zellen im Rahmen einer $NO_2$-induzierten Entzündung einen Aktivierungswechsel hin zu einer alternativen Aktivierung vollziehen. Hierbei sind insbesondere die Veränderungen des Radikalstoffwechsels zu nennen. Dieser Aktivierungswechsel könnte in unserem Tiermodell als autoprotektiver Mechanismus im durch $NO_2$-induzierten Inflammationsprozess gedeutet werden. Ein Überwiegen von alternativ aktivierten BAL-Zellen mit verminderter Radikalfreisetzung jedoch unterstützt eine erhöhte Infektanfälligkeit, was eine mögliche Erklärung für das gehäufte Vorkommen von Infektexazerbationen im Rahmen einer COPD darstellen könnte.

# 6 SUMMARY

Macrophages and neutrophile granulocytes have the ability to eliminate pathogenic microorganisms by means of phagocytosis and subsequent production of free radicals, such as superoxide. These effector cells of the innate immune system appear in increased numbers in lungs of patients with COPD, which may suggest a protective role of those cells from bacterial infections in this pulmonary disease. Contradictory to that, however, clinical experience shows that patients with COPD have an increased susceptibility to exacerbations induced by bacterial infections.

In order to elucidate the underlying mechanisms of this phenomenon, we aimed at characterizing BAL-cells in the lungs of rats which had been experimentally exposed to an $NO_2$-induced pulmonary inflammation. We hypothesized that BAL-cells in lungs of $NO_2$-exposed rats experience a shift towards an alternative activation pathway. We particularly emphasized the investigation of free-radical metabolism as well as the secretion of cytokines of BAL-cells at different time-points (24 hours, 3 days, 20 days) after $NO_2$-exposure as compared to BAL-cells of healthy control animals.

We could demonstrate that zymosan-induced superoxid-production was significantly reduced in BAL-cells of $NO_2$-exposed rats at all measured time-points as compared to control rats. The use of enzyme inhibitors revealed that essential enzymes for the production of superoxid radicals, such as the NADPH-oxidase as well as Complex III of the mitochondrial respiratory chain, were functionally affected by $NO_2$-exposure. Expression analysis of genes involved in free radical production, revealed that mRNA levels of particular isoforms of SOD and GPx were significantly increased in response to $NO_2$-exposure. Furthermore, we investigated the activity of the antioxidative enzymes SOD and GPx in BAL-cells by functional assays. Our data indicate that an $NO_2$-exposure for 20 days results in a significant increase in activity of both enzymes.

Another important mechanism for immunological defense and immunmodulation next to the production of free radicals is the secretion of cytokines. We therefore investigated whether the surfactant Protein-A was able to affect the cytokine-production of BAL-cells in response to $NO_2$-exposure.

We could demonstrate that LPS-induced secretion of TNF-alpha in BAL-cells was significantly reduced at 3 and 20 days after $NO_2$-exposure when compared to control animals. Treatment with SP-A resulted in an additional inhibition of TNF-alpha secretion in BAL-cells after 20 days of $NO_2$-exposure, although this inhibition lacked statistical significance. Regarding the secretion of IL-10 only animals which underwent

3 days of $NO_2$ exposition had the ability to liberate cytokines in appreciable quantity. In tendency, the administration of SP-A evoked an enhanced secretion of this anti-inflammatory cytokine. Production of the chemokine MCP-1 by BAL-cells was regulated differently in the respective phases of the inflammatory process caused by NO2-exposure. However, treatment with SP-A resulted in a suppression of secretion of this proinflammatory cytokine independently of a prior $NO_2$-exposure.

In conclusion, our experiments demonstrated that BAL cells displayed an activation switch towards an alternative activation mechanism within a $NO_2$ induced inflammation reaction. Here, the changes of the radical metabolism are particularly noteworthy. In our animal model this activational shift could be interpreted as an autoprotective mechanism in response to $NO_2$-induced inflammation. However, a prevailing of alternatively activated BAL-cells with a decreased free radical production increases the susceptibility to bacterial infection. This could possibly explain why patients with COPD suffer from increased numbers of exacerbations triggered by bacterial infections.

# 7 LITERATURVERZEICHNIS ALPHABETISCH

Adams P.F., Hendershot G.E., Marano M.A. (1999): Current estimates from the National Health Interview Survey, 1996. National Center for Health Statistics. Vital Health Stat 10(200), 1999

Aderem A., Underhill D.M., (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol 1999;17:593-623

Alcorn J.F., Wright J.R. (2004): Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD14-indepndent pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 286:L129-L136, 2004

Asahi M., Fujii J., Suzuki K., Seo H.G., Kuzuya T., Hori M., Tada M., Fujii S., Taniguchi N. (1995): Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. J Biol Chem 1995;270(36):21035-21039

Barnes P.J. (2003): New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. Ann Rev Med 2003;54:113-129

Barnes P.J. (1999): Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 1999;54:245-252

Barth P.J., Müller B., Wagner U., Bittinger A. (1995): Quantitative analysis of parenchymal and vascular alterations in $NO_2$-induced lung injury in rats. Eur Respir J., 1995, 8, 1115-1121

Bauer M.A., Utell M.J., Morrow P.E., Speers D.M., Gibb F.R. (1986): Inhalation of 0,30 ppm nitrogen dioxide potentiates exercise-induced bronchospasm in astmatics. Am Rev Respir Dis 1986 Dec;134(6):1203-8

Becker S., Daniel E.G. antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production. Cell Immunol 1990;129(2):3551-362

Beckman J.S., Koppenol W.H. (1996): Nitric oxide, superoxide, and peroxynitride: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol 1996;271:C1424-37

Bernhard W., Haslam P.L., Floros J. (2004): Translational review: From birds to Humans. New concepts on airways relative to alveolar surfactant. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2004;30:6-11

Blomberg A., Krishna M.T., Helleday R., Soderberg M., Ledin M.C., Kelly F.J., Frew A. J., Holgate S.T., Sandstrom T. (1999): Persistent airway inflammation but accomodated antioxidant and lung function responses after repeated daily exposure to nitrogene dioxide. Am J Respir Crit Care Med 1999 Feb;159(2):536-43

Borron P., McIntosh J.C., Korfhagen T.R., Whitsett J.A., Taylor J., Wright J.R. (2000): Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 278:L840-L847, 2000

Brieland J.K., Flory C.M., Jones M.L., Miller G.R., Remick D.G., Warren J.S., Fantone J.C. (1995): Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;12(1):104-9.

Brockhaus F., Brüne B. (1999): Overexpression of CuZn superoxide dismutase protects RAW 264.7 macrophages against nitric oxide cytotoxicity. Biochem J 1999;338:295-303

Broug-Holub E., Toews G.B., van Iwaarden F., Strieter R.M., Kunkel S.L., Paine R., Standiford T.J. (1997): Alveolar macrophages are required for protective ulmonary defenses in murine Klebsiella pneumonia: elimination but decreases bacterial clearence and survival. Infection and immunity Apr. 1997, p-1139-1146

Brown G. C. (2001): Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. Biochim. Biophys. Acta 1504:46-57; 2001

Campbell, E.J. (2000): Animal models of emphysema: the next generations. J Clin. Invest. 106:1445-1446

Canada A.T., Calabrese E.J. (1989): Superoxid dismutase: ist role in xenobiotic detoxification. Pharmacol Ther 1989;44(2):285-295

Cavaillon J.M. (2001): Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. Cell Mol Biol 2001;47(4):695-702

Chabot S., Salez L., McCormack F.X., Touqui L., Chignard M. (2003): Surfactant protein A inhibits lipopolysaccharide-induced in vivo production of interleukin-10 by mononuclear phagocytes during lung inflammation. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2003;28:347-353

Chen G.H., Reddy R.C., Newstead M.W., TaTEDA K., Kyasapura B.L.,. Standiford T.J. (2000): Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis-induced suppression of lung antibacterial host defense. J Immunol 2000;165(11):6496-503

Chitano P., Rado V., Di Stefano A., Papi A., Boniotti A., Zancuoghi G., Boschetto P., Romano M., Salmona M., Ciaccia A., Fabbri L.M., Mapp C.E. (1996): Effect of subchronic in vivo exposure to nitrogen dioxide on lung tissue inflammation, airway microvascular leakage, and in vitro bronchial muscle responsiveness in rats. Occup Environ Med 1996 Jun;53(6):379-86

Chow C.K. (1993): Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. Ann. N.Y. Acad. Sci.1993;686:289-298

Cox G., Crossley J., Xing Z. (1995): Macrophage engulgement of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;12:232-237

de Boer W.I., Sont J.K., van Schadewijk A., Stolk J., van Krieken J.H., Hiemstra P.S. (2000): Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. J Pathol 2000 Apr;190(5):619-26

Dinarello C.A. (2000): Proinflammatory cytokines. CHEST 2000; 118:503-508
Fiorentino D.F., Zlotnik A., Mosmann T.R., Howard M., O´Garra A. (1991): IL-10 inhibits cytokine production by actvated macrophages. J Immunol 1991;147(11):3815-22

Di Stefano A., Turato G., Maestrelli P., Mapp C.E., Ruggieri M.P., Roggeri A., Boschetto P., Fabbri L.M., Saetta M. (1996): Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. Am J Respir Crit Care Med 1996;153:629-632

Djaldetti M., Salman H., Bergman M., Djaldetti R., Bessler H. (2002): Phagocytosis – the mighty weapon of the silent warriors. Microsc. Res. Tech. 2002;57:421-431

Dörger M., Münzing S., Allmeling A.M., Messmer K., Krombach S.F. (2001): Phenotypic and functional differences between rat alveolar pleural and peritoneal macrophages. Exp. Lung Res. 27:65-76;2001

Drumm K., Buhl R., Kienast K. (1999): Additional $NO_2$ exposure induces a decrease in cytokine specific mRNA expression and cytokine release of particle and fibre exposed human alveolar macrophages. Eur J Med Res 1999 Feb 25;4(2):59-55

Erroi A., Pagani P., Sironi M., Salmona M. (1996): In vivo exposure to $NO_2$ reduces TNF and IL-6 produktion by endotoxin-stimulated alveolar macrophages. Am J Physiol 1996 Jul;271 (1 Pt 1):L132-8

Espey M. G., Miranda K. M., Feelisch M., Fukuto J., Grisham M. B., Vitek M. P., Wink D. A. (2000): Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. Ann. N. Y. Acad. Sci. 899:209-221; 2000

Ezzati M., Lopez A.D. (2003): Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. The Lancet 2003 Sept 13; 362,9387:847-52

Ezzati M., Lopez A.D., Rodgers A., Hoorn S.V., Murray C.J.L. (2002): Selected major risk factors and global and regional burden of disease. Lancet 2002; 360:1347-60

Ferret P. J., Soum E., Negre O., Fradelizi D. (2002): Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. BMC. Immunol. 3:3; 2002

Finkelstein R., Fraser R.S., Ghezzo H., Cosio M.G. (1995): Alveolar inflammation and ist relation to emphysema in smokers. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:1666-1672

Finlay G.A., O´Driscoll L.R., Russell K.J., D´Arcy E.M., Masterson J.B., Fitzgerald M.X., O´Conner C. (1997): Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:240-247

Forman H.J., Torres M. (2002): Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. Am J Respir Crit Care Med 166:S4-S8;2002

Franke-Ullmann G., Pfortner C., Walter P., Steinmuller C., Lohmann-Matthes M.L., Kobzik L. (1996): Characterization of murine lung interstitiell macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. J Immunol 1996;157(7):3097-3104

Garn H., Siese A., Stumpf S., Barth P.J., Müller B., Gemsa D. (2003): Shift toward an alternatively activated macrophage response in lungs of $NO_2$-exposed rats. Am J Respir Cell Mol Biol 2003 Mar;28(3):386-96

Gaynor C.D., McCormack F.X., Voelker D.R., McGowan S.E., Schlesinger L.S. (1995): Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages. The Journal of Immunology, 1995, 155:5343-5351.

Gemsa D., Kalden J.R., Resch K. (Hrsg.).(1997): Immunologie 4.Auflage. Georg ThiemeVerlag, Stuttgart.

Gerard C., Bruyns C., Marchant A., Abramowicz D., Vandenabeele P., Delvaux A., Fiers W., Goldman M., Velu T. (1993): Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. J. Exp. Med. 1993;177:547-550

Gibbs D.F., Warner R.L. Weiss S.J., Johnson K.J., Varani J. (1999): Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20(6):1136-1144

Gibbs D.F., Shanley T.P., Warner R.L., Murphy H.S., Varani J., Johnson K.J. (1999): Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20(6):1145-54

Giovino G.A. (2002): Epidemiology of tobacco use in the United States. Oncogene (2002) 21,7326-7340

Glasgow J. E., Pietra G. G., Abrams W. R., Blank,J., Oppenheim D. M., Weinbaum, G. (1987): Neutrophil recruitment and degranulation during induction of emphysema in the rat by nitrogen dioxide. Am. Rev. Respir. Dis. 135:1129-1136; 1987

Goerdt S., Orfanos C.E. (1999): Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. Immunity 1999;10:137-142

Goerdt S., Politz O., Schledzewski K., Birk R., Gratchev A., Guillot P., Hakiy N., Klemke C.D., Dippel E., Kodelja V., Orfanos E. (1999): Alternative versus classical activation of macrophages. Pathobiology 1999;76:222-226

Goldman R., Ferber E., Meller R., Zor U. (1994): A role for reactive oxygen species in zymosan and beta-glucan induced protein tyrosine phosphorylation and phospholipase A2 activation in murine macrophages. Biochim Biophys Acta 1994;1222(2):265-76

Gozal E., Forman H.J., Torres M. (2001): ADP stimulates the respiratory burst without activation of ERK and AKT in rat alveoalr macrophages. Free Radic Biol Med 2001;31(5):679-687

Greenberger M.J., Strieter R.M., Kunkel S.L., Danforth J.M., Goodman R.E., Standiford T.J. (1995): Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia. J Immunol 1995;155(2):722-9

Gross C.P., Anderson G.F., Powe N.R. (1999): The relation between funding by the national institutes of health and the burden of disease. N Engl J Med 1999;340:1881-1887

Groves J.T. (1999): Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. Current Opinion in Chemical Biology 1999;3:226-235

Haslett C. (1999): Granulocyte apoptosis and ist role in the resolution and control of lung inflammation. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:S5-S11

Hautamaki, R.D., Kobayashi D.K., Senior R.M., Shapiro S.D. (1997): Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science 1997 Sep 26;277(5334):2002-4

Hele D. (2002): First Siena international conference on animal models of chronic obstructive pulmonary disease, Certosa di Pontignano, University of Siena, Italy, September 30-October 2, 2001. Respir Res 2002, 3:12

Hickman-Davis J.M., Lindsey J.R., Zhu S., Matalon S. (1998): Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages. Am. J. Physiol. 274(Lung Cell. Mol. Physiol. 18):L270-L277, 1998

Hoidal J.R., Fox R.B., Le Marbe P.A., Perri R., Repine J.E. (1981): Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. Am Rev Respir Dis 1981;123(1):85-9

Honig E.G., Ingram R.H. (2001): Harrison`s principles of internal medicine, fifteenth edition 2001 by the McGraw-Hill Companies, Inc

Hubbard, A.K., Vetrano K.M., Morris J.B., Thrall R.S. (1994): Acute $NO_2$ exposure alters inflammatory cell activation and particle clearence in silicia-injected mice. J Toxicol. Environ. Health 41:299-314

Hussain S., Wright J.R., Martin II W.J. (2003): Surfactant protein A decreases nitric oxid production by macrophages in a tumor necrosis factor-alpha.dependent mechanism. Am. J Respir. Cell Mol. Biol. 2003;28:520-527

Iribarren C., Tekawa I.S., Sidney S., Friedman G.D. (1999): Effect of Cigar Smoking on the risk of cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, and cancer in men. N Engl J Med 1999;340:1773-80

Janeway C.A., Travers P. (2002): Immunobiology. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc.

Jeffery, P.K.(1999): Chairman´s summary: Inflammation in chronic obstructive lung disease. Am J Respir Crit Care Med 160: S3-S4.

Jenkins H.S., Devalia J.L., Mister R.L., Bevan A.M., Rusznak C., Davies R.J. (1999): The effect of exposure to ozone and nitrogen dioxide on the airway response of atopic asthmatics to inhaled allergen: dose- and time-dependent effects. Am J Respir Crit Care Med 1999 Jul;160(1):33-9

John M., Oltmanns U., Fietze I., Witt C., Jung K. (2002): Increased production of matrix metalloproteinase-2 in alveolar macrophages and regulation by interleukin-10 in patients with acute pulmonary sarcoidosis. Exp Lung Res 2002;28(1):55-68

Karupiah G., Hunt N.H., King N.J., Chaudhri G. (2000): NADPH oxidase, Nramp1 and nitric oxide synthase 2 in the host antimicrobial response. Rev Immunogenet 2000;2(3):387-415

Kienast K., Knorst M., Muller-Quernheim J., Ferlinz R. (1996): Modulation of IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNFα, and TNF-beta secretions by alveolar macrophages under $NO_2$ exposure. Lung 1996;174(1):57-67

Kinnula V.L., Crapo J.D. (2003): Superoxide Dismuatases in the lung and human lung diseases. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:1600-161

Knapp S., Leemans J.C., Florquin S., Branger J., Maris N.A., Pater J., van Rooijen N., van der Poll T. (2003): Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:171-179

Kong X. J., Lee S. L., Lanzillo J. J., Fanburg B. L. (1993): Cu,Zn superoxide dismutase in vascular cells: changes during cell cycling and exposure to hyperoxia. Am. J. Physiol 264:L365-L375; 1993

Kooguchi K., Hashimoto S., Kobayashi A., Kitamura Y., Kudoh I., Wiener-Kronis J., Sawa T. (1998): Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in Pseudomonas aeruginosa pneumonia. Infection and Immunity July 1998; p. 3164-3169

Kremlev S.G., Phelps D.S. (1994):Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobin production. Am. J. Physiol. 267(Lung Mol.Cell.Biol.11):L712-L719, 1994

Lacasse Y., Brooks D., Goldstein R.S. (1999): Trends in the epidemiology of COPD in Canada, 1980 to 1995. Chest / 116 / 2 / August, 1999

Lenaz G. (2001): The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. IUBMB Life 2001 Sep-Nov;52(3-5):159-64

LeVine A.M., Hartshorn K., Elliot J., Whitsett J., Korfhagen T. (2002): Absence of SP-A modulates innate and adaptive defense responses to pulmonary influenza infection. Am J Physiol 2002;282(3):L563-72

LeVine A.M., Kurak K.E., Bruno M.D., Stark J.M., Whitsett J.A., Korfhagen T.R. (1998): Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to Pseudomonas aeruginosa infection. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol 1998;19:700-708

Le Vine A.M., Kurak K.E., Wright J.R., Watford W.T., Bruno M.D., Ross G.F., Whitsett J.A., Korfhagen T.R. (1999): Surfactant protein A binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A-deficient mice. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1999;20:279-286

LeVine A.M., Gwozdz J., Stark J., Brono M., Whitsett J., Korfhagen T. (1999): Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearence in vivo. J. Clin. Invest. 1999;103:1015-1021

Li Y., Trush M.A. (1998): Diphenyleneiodium, an NAD(P9H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998; 253:295-299

Lim S., Roche N., Oliver B.G., Mattos W., Barnes P.J., Chung K.F. (2000): Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000;162:1355-1360

Liou, T.G., Campbell E.J. (1996): Quantum proteolysis resulting of single granules by human neutrophils: a novel, nonaxidative mechanism of extracellular proteolytic activity. J Immunol 1996 Sep 15;157(6):2624-31

Lomas D.A., Silverman E.K. (2001): The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res 2001,2:20-26

Lopez A.D., Murray C.C.J.L. (1998): The global burden of disease, 1990-2020. Nature medicine 1998 Nov;4(11):1241-43

MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C. (1997): Nitic oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997;15:323-50

MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C. (1997): Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997;15:323-350

Mannino D.M., Brown C., Giovino G.A. (1997): Obstructive lung disease deaths in the United States from 1979-1993. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:814-818

Martinez J.A., King T.E. Jr., Brown K., Jennings C.A., Borish L., Mortenson R.L., Khan T.Z., Bost T.W., Riches D.W. (1997): Increased expression of the interleukin-10 gene by alveolar macrophages in interstitial lung disease. Am J Physiol 1997;273:L676-83

McCormack F.X., Whitsett J.A. (2002): The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. J. Clin. Invest. 109:707-712 (2002)

McIntosh J.C., Mervin-Blake S., Conner E., Wright J.R. (1996): Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNFα activity from LPS-stimulated macrophages. Am J Physiol (Lung Cell. Mol. Physiol.15):L310-L319; 1996

Mehrad B., Strieter R.M., Standiford T.J. (1999): Role of TNFα in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. J Immunol 1999;162(3):1633-40

Meyer P.A, Mannino D.M., Redd S.C., Olson D.R. (2002): Characteristics of adults dying with COPD. Chest 2002; 122:2003-2008

Monick M.M., Carter A.B., Gudmundsson G., Geist L.J., Hunninghake G.W. (1998): Changes in PKC isoforms in human alveolar macrophages compared with blood momocytes. Am J Physiol 1998;275:L389-397

Moore T.A., Lau H.Y., Cogen A.L., Monteleon C.L., Standiford T.J. (2003): Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy during murine Klebsiella pneumoniae bacteremia: increased mortality in the absence of liver injury. Shock 2003;20(4):309-15

Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine actvities and secreted proteins. J Immunol 1986 Apr 1;136(7):2348-2357

Mosmann T.R., Moore K.W. (1991): The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. Immunol Today 1991;12(3):A49-53

Murakami S., Iwaki D., Mitsuzawa H., Sano H., Takahashi H., Voelker D.R., Akino T., Kuroki Y. (2002): Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with Toll-like receptor 2. The Journal of Biological Chemistry 2002;277(9):6830-6837

National Vital Statistics Reports, Vol. 52, No. 3, September 18, 2003

Nicod L.P. (1999): Pulmonary defence mechanisms. Respiration 1999;66:2-11

O´Byrne P.M., Postma D.S. (1999): The many faces of airway inflammation. Am J Respir Crit Care Med 1999;159: S41-S66.

Ogura M., Kitamura M. (1998): Oxidant stress incites spreading of macrophages via extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. J Immunol 1998;161(7):3569-74

Oltmanns U., Schmidt B., Hoernig S., Witt C., John M. (2003): Increased spontaneous interleukin-10 release from alveolar macrophages in active pulmonary sarcoidosis. Exp Lung Res 2003;29(5):315-28

Padmaja S., Squadrito G. L., Pryor W. A. (1998): Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. Arch. Biochem. Biophys. 349:1-6; 1998

Pagani P., Romano M., Erroi A., Ferro M., Salmona M. (1994): Biochemical effects of acute and subacute nitrogen dioxide exposure in rat lung and bronchoalveolar lavage fluid. Arch Environ Contam Toxicol 1994 Oct;27(3):426-30

Pajkrt D., Camoglio L., Tiel-van Buul M.C., de BruinK., Cutler D.L., Affrime M.B., Rikken G., van der Poll T., ten Cate J.W., van Deventert S.J. (1997): Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration. J Immunol 1997;158(8):3971-3977

Pauwels R.A., Buist S., Calverley P.M.A., Jenkins C., Hurd S.S. (2001): Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) workshop summary. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001;163:1256-1276

Pauwels R.A., Löfdahl C.G., Laitinen L.A., Schouten J.P., Postma D.S., Pride N.B., Ohlsson S.V. (1999): Long-term treatment with inhaled budenoside in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking. N Engl J Med 1999;340:1948-53

Perret P.J., Soum E., Negre O., Fradelizi D. (2002): Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. BMC Immunol. Mar12 2002;3(1)p3

Pesanti E.L. (1984): Pneumocystis carinii: oxygen uptake, antioxidant enzymes, and susceptibility to oxygen-mediated damage. Infect Immun 1984 Apr;44(1):7-11

Peters-Golden M., McNish R.W., Sporn P.H., Balazovich K. (1991): Basal activation of protein kinase C in rat alveolar macrophages: implications for arachidonate meabolism. Am J Physiol 1991;261:L462-L471

Raha S., Robinson B.H. (2000): Mitochondria, oxygen free radicals, disease and aging. Trends Biochem Sci 2000 Oct;25(10):502-8

Rembish S.J., Trush M.A. (1994): Further evidence that lucigenin-derived chemoluminescence monitors mitochondrial reactive oxygen species production. Free Radic. Biol. Med. 17:117-126; 1994

Repine J.E., Bast A., Lankhorst I. (1997): Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:341-357

Robison T.W., Duncan D.P., Forman H.J. (1990): Chemoattractant and leukotriene B4 production from rat alveolar macrophages exposed to nitrogen dioxide. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 3:21-26; 1990

Rose C.E., Sung S.S., Fu S.M. (2003): Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. Microcirculation 2003;10(3-4):273-88

Rosseau S., Hammerl P., Maus U., Walmrath H-D., Schütte H., Grimminger F., Seeger W., Lohmeyer J. (2000): Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. Am J Physiol 2000;279:L25-L25

Rosseau S., Hammerl P., Maus U., Günther A., Seeger W., Grimminger F., Lohmeyer J. (1999): Surfactant protein A down-regulates proinflammatory cytokine production evoked by Candida albicans in human alveolar macrophages. J Immunol. 1999;163:4495-4502

Salez L., van Rooijen N., Lebastard M., Tonqui L., McCormack F.X., Chignard M. (2001): Surfactant Protein A suppresses lipopolysaccharide-induced IL-10 production by murine macrophages. J Immunol 2001;166(10):6376-82

Sanlioglu S., Williams C.M., Samavati L., Butler N.S., Wang G., McCray P.B., Ritchie T.C., Hunninghake G.W., Zandi E., Engelhardt J.F. (2001): Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-alpha secretion through IKK regulation of NF-kappaB. J Biol Chem 2001;276(32):30188-98

Sano H., Sohma H., Muta T., Nomura S.I., Voelker D.R., Kuroki Y. (1999): Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. The Journal of Immunology, 1999, 163:387-395

Schaberg T., Haller H., Rau M., Kaiser D., Fassbender M., Lode H. (1992): Superoxide anion release induced by platelet-activating factor is increased in human alveolar macrophages from smokers. Eur Respir J 1992;5(4):387-93

Sohn H.O., Lim H.B., Lee Y.G., Lee D.W., Kim Y.T. (1993): Effect of subchronic administration of antioxidants against cigarette smoke exposure in rats. Arch Toxicol 1993;67(10):667-73

St.Clair D.K., Jordan J.A., Wan X.S., Gairola C.G. (1994): Protective role of manganese superoxide dismutaseagainst cigarette smoke-induced cytotoxicity. J Toxicol Environ Health 1994;43(2):239-49

Shapiro S.D. (2000): Animal Models for chronic obstructive pulmonary disease, Age of klotho and Marlboro Mice. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 22:pp.4-7

Shapiro S. D. (1999): The macrophage in chronic obstructive pulmonarx disease. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:S29-S32

Sibille Y., Reynolds H.Y. (1990): Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. Am Rev Respir Dis 1990 Feb;141(2):471-501

Silverman E.K., Speizer F.E. (1996): Risk factors for the development of chronic obstructive pulmonary disease. Med Clin North Am 1996 May;80(3):501-22

Steinhauser M.L., Hogaboam C.M., Kunkel S.L., Lukacs N.W., Striter R.M., Standiford T.J. (1999): IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairement in lung antibacterial host defense. J Immunol 1999;162(1):392-9

Steinmüller C., Franke-Ullmann G., Lohmann-Matthes M.L., Emmendörffer A. (2000): Local activation of nonspecific defense against a respiratory model: infection by application of interferon-gamma. Comparison between rat alveolar and interstitial lung macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 2000;22:481-490

Strassels S.A., Smith D.H., Sullivan S.D., Mahajan P.S. (2001): The costs of treating COPD in the United States. Chest / 119 / 2/ February, 2001

Strieter R.M., Belperio J.A., Keane M.P. (2002): Cytokines in innate host defense in the lung. J. Clin. Invest. 109:699-705 (2002)

Strieter R.M., Belperio J.A., Keane M.P. (2003): Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. Curr Opin Infect Dis 2003;16(3):193-8

Strieter R.M., Kunkel S.L., Bone R.C. (1993): Role of tumor necrosis factor-alpha in diesease states and inflammation. Crit Care Med 1993 Oct;21(10Suppl):S447-63

Sunyer J.; Basagna X., Belmonte J., Anto J.M. (2002): Effect of nitrogen dioxide and ozone on the risk of dying in patients mit severe asthma. Thorax 2002 Aug;57(8):687-93

Thomas P.S. (2001): Tumor necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. Immunol Cell Biol 2001;79(2):132-40

Tracey K.J., Cerami A. (1993): Tumor necrosis factor: an updated review of ist biology. Crit Care Med 1993 Oct;21(10Suppl):S415-22

Traynor T.R., herring A.C., Dorf M.E., Kuziel W.A., Toews G.B., Huffnagle G.B (2002): Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemotactic protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity. J Immunol 2002;168(9):4659-66

Underhill D.M. (2003): Macrophage recognition of zymosan particles. J Endotoxin Re 2003;9(3):176-80

van den Boom G., van Schayck C.P., Rutten-van Mölken M.P.M.H., Tirimanna P.R.S., den Otter J.J., van Grunsven P.M., Buitendijk M.J., van Herwaarden C.L.A., van Weel C. (1997): Active detection of chronic obstructive pulmonary disease and asthma in the general population. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:1730-1738

van der Vliet A., Eiserich J.P., Shigenaga M.K., Cross C.E. (1999): Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:1-9

van Gunsven P., Schermer T., Akkermans R., Albers M., van den Boom G., van Schayk O., van Herwaarden C., van Weel C. (2003): Short- and long-term efficiacy of fluticasone proprionate in subjects with early signs and symptoms of chronic obstructive pulmonary disease. Results of the DIMCA study. Respir Med 2003 Dec;97(12):1303-12

Verhoeven G.T., Wijkhuijs A.J., Hooijkaas H., Hoogsteden H.C., Sluiter W. (2000): Effect of inhaled glucocorticoid on reactive oxygen species production by bronchoalveolar lavage cells from smoking COPD-patients. Mediators Inflamm 2000;9(2):109-13

Wegmann M; Fehrenbach A; Heimann S; Fehrenbach H; Renz H; Garn H; Herz U (2005):
NO2-induced airway inflammation is associated with progressive airflow limitation and development of emphysema-like lesions in C57bl/6 mice. Exp Toxicol Pathol 2005 Apr;56(6):341-50

Wink D.A., Mitchell J.B. (1998): Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med 1998;4-5:434-56

Wright J.R. (1997): Immunomodulatory functions of surfactant. Physiol. Rev. 1997; 77:931-962

Yamakura F., Taka H., Fujimura T., Murayama K. (1998): Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. J Biol Chem 1998;273(23):14085-14089

Zelko I. N., Mariani T. J., Folz R. J. (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic. Biol. Med. 33:337-349; 2002

Zheng T., Zhu Z., Wnag Z., Homer R.J., Ma B., Riese R.J., Chapman H.A., Shapiro S.D. Elias J.A. (2000): Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. J Clin Invest 2000 Nov;106(9):1081-93

# ANHANG

Publikation: Olker C et al., Impaired superoxide radical production by bronchoalveolar lavage cells from NO(2)-exposed rats.
Free Radic Biol Med (United States), Oct 1 2004, 37(7) p977-87

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Danksagung

Free Radical Biology & Medicine, Vol. 37, No. 7, pp. 977–987, 2004
Copyright © 2004 Elsevier Inc.
Printed in the USA. All rights reserved
0891-5849/$-see front matter

ELSEVIER

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.028

*Original Contribution*

# IMPAIRED SUPEROXIDE RADICAL PRODUCTION BY BRONCHOALVEOLAR LAVAGE CELLS FROM $NO_2$-EXPOSED RATS

CHRISTOPH ÖLKER,* ANETTE SIESE,* SABINE STUMPF,* BERND MÜLLER,† DIETHARD GEMSA,* and HOLGER GARN*

*Institute of Immunology and †Department of Internal Medicine, Laboratory of Lung Cell Physiology, Philipps University of Marburg, Germany

(*Received* 21 *January* 2004; *Revised* 17 *May* 2004; *Accepted* 17 *June* 2004)
Available online 23 July 2004

**Abstract**—Production of superoxide radicals is a central property of professional phagocytes used to combat invading microorganisms. Even though the number of macrophages and neutrophils is often increased in the lungs of patients with chronic lung diseases, these patients frequently suffer from bacterially induced exacerbations. To understand the underlying mechanisms, we investigated the production of superoxide radicals by bronchoalveolar lavage (BAL) cells in a rat $NO_2$ exposure model (10 ppm $NO_2$ for 1, 3, or 20 days). We showed that cells from $NO_2$-exposed animals display a significantly impaired superoxide radical release after zymosan stimulation. The use of specific inhibitors (antimycin or diphenyleneiodonium [DPI]) revealed that the major enzyme systems, NADPH oxidase and complex III of the respiratory chain, are affected. In addition, we investigated gene expression and enzyme activities of antioxidant enzymes. mRNA expression was significantly enhanced for glutathione peroxidase (GPx)-3 and CuZn-superoxide dismutase (SOD) in BAL cells from animals exposed 3 and 20 days, and GPx and SOD enzyme activities were increased in BAL cells from rats exposed 20 days. In conclusion, concomitant occurrence of reduced production and increased scavenging of superoxide radicals resulted in the drastically impaired release of these radicals from BAL cells of $NO_2$-exposed rats. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords**—Superoxide radicals, Antioxidant enzymes, Macrophages, Chronic lung diseases, $NO_2$ exposure, Free radicals

## INTRODUCTION

The production of reactive oxygen and nitrogen intermediates on appropriate stimulation is an important attribute of professional phagocytes, i.e., macrophages and neutrophils [1]. These small molecules are highly toxic for certain microorganisms and, thus, these defense mechanisms represent a crucial element of the innate host defense. This becomes particularly important in the lung, which forms the largest surface of the body with direct contact to environmental influences. There, alveolar macrophages (AMs) are the major cellular component of the host's first line of defense and, in fact, AMs are more potent producers of superoxide when compared with macrophages of other origins (e.g., pleural and peritoneal macrophages) [2,3]. Occurrence of functionally active AMs is a prerequisite for effective elimination of bacteria as demonstrated by experimental depletion of AMs [4–6]. Neutrophils that infiltrate the lung during inflammatory processes are also able to eliminate microorganisms by similar pathways.

Both phagocyte populations may generate superoxide radicals by two enzyme systems, i.e., the cell membrane-bound NADPH oxidase [7] and the mitochondrial complex III of the respiratory chain [8]. Superoxide release by both enzyme systems may be detected by measuring chemoluminescence emitted during the reaction of superoxide with lucigenin [9]. Inhibitors may be applied to discriminate the contributions of the two enzyme systems to total superoxide production. Antimycin is known to specifically inhibit complex III of the respiratory chain [9] and DPI (diphenyleneiodonium) preferentially suppresses NADPH oxidase; however, at higher concentrations mitochondrial superoxide production is also influenced by DPI [10].

Address correspondence to: Dr. Holger Garn, Hospital of the Philipps University of Marburg, Department of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Biomedical Research Center (BMFZ), Hans-Meerwein-Strasse, D-35033 Marburg, Germany; Fax: #49 6421 286 6086; E-mail: garn@staff.uni-marburg.de.

Several acute and chronic inflammatory diseases of the lung, among them chronic obstructive pulmonary disease (COPD), are characterized by increased numbers of AMs and/or neutrophil granulocytes. In addition, not only the number but also the activation state of inflammatory cells with respect to the production of pro-inflammatory cytokines is altered [11–16]. Despite phagocyte activation, COPD patients frequently suffer from bacterial infections of the lung which are a major cause of exacerbations [17,18]. We therefore hypothesized that phagocyte function might be impaired with respect to production of reactive oxygen intermediates.

To test this hypothesis, we established an animal model that resembles in many aspects human COPD by exposing rats to $NO_2$ [19–23]. Within the bronchoalveolar lavage (BAL), we observed increased numbers of neutrophils and macrophages. While neutrophil numbers showed an early increase in the acute inflammatory phase (1 to 3 days of exposure) and declined thereafter, macrophage numbers remained elevated for the entire exposure period of 20 days. In addition, macrophages from $NO_2$-exposed rats showed an alternative activation pattern that is characterized by decreased ability to produce tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin (IL)-1β, and NO and enhanced production of IL-10 [24]. In the present study, we compared BAL cells from $NO_2$-exposed and untreated rats with respect to their ability to generate superoxide radicals after in vitro stimulation and investigated possible mechanisms to explain the impaired superoxide radical release by cells from $NO_2$-exposed animals.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animal exposure*

Male Fischer344 rats were obtained from Charles River Wiga (Sulzfeld, Germany) at a body weight of about 120 g. The animals were housed in wire cages at room temperature in a 12/12-h light/dark cycle and given food and water ad libitum.

Groups of rats were continuously exposed to 10 ppm $NO_2$ for 24 h, 3 days, and 20 days; control animals breathed normal air. Exposure regimens were designed so that animals in all exposure groups could be analyzed simultaneously. Exposure was carried out in airtight chambers with an inlet and outlet for the gas mixture and a ventilator to ensure equal distribution of the gas atmosphere throughout the whole chamber. $NO_2$ (Messer-Griesheim, Duisburg, Germany) was adjusted to a final concentration of 10 ppm by mixing with compressed air and directed through the chambers at a constant gas flow of 15 l/min. $NO_2$ concentration was controlled at least twice a day using a $NO_2$-sensitive electrochemical element (ECS 102-1, MPSensor Systems, Munich, Germany). Exposures were performed at 22 ± 2°C and 50 ± 5% relative humidity. Animal housing conditions and $NO_2$ exposure met German and international guidelines.

### *Bronchoalveolar lavage*

Following anesthetization by intraperitoneal application of sodium pentobarbital (100 mg/kg body wt; Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Germany) mixed with 100 IU heparin (Liquemin N, Roche, Mannheim, Germany), the tracheas were cannulated and the animals thoracotomized. The lungs were perfused via the pulmonary artery with prewarmed (37°C) perfusion buffer (PBS + $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ supplemented with 10 mM Hepes, 50 μg/ml gentamicin, and 10 U/ml penicillin, pH 7.4) until they became white. Lungs and hearts were removed en bloc and lungs were lavaged eight times with 6 ml lavage buffer ($Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ -free PBS with 10 mM Hepes, 0.2 mM EGTA, 50 μg/ml gentamicin, and 10 U/ml penicillin, pH 7.4). Buffer was allowed to passively run out while the lungs were gently agitated. Finally, BAL fluid was centrifuged at 300*g* for 10 min at 4°C to obtain alveolar cells. Contaminating red blood cells were eliminated by hypotonic lysis for 30 s with double-distilled water. Remaining cells were washed twice in PBS.

### *Lucigenin-enhanced chemiluminscence detection of superoxide radical release*

BAL cells were resuspended in cell culture medium RPMI-1640 (Linaris, Wertheim, Germany) containing 5% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 5 mM Hepes, 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, and 1% nonessential amino acids (all from Biochrom, Berlin, Germany) at a concentration of $2 \times 10^6$ living cells/ml. Two hundred microliters of the cell suspension were added per well of a 96-well Fluoronunc Maxisorp microtiter plate (Nunc, Karlsruhe, Germany) and plates were incubated for 1 h at 37°C, 5% $CO_2$, 95% humidity. For inhibitor experiments, 2.5 μl of the appropriately diluted inhibitor solution or culture medium as control were added at this time point and plates were incubated for additional 15 min. Subsequently, 25 μl of lucigenin solution (4.8 mg lucigenin [Sigma, Deisenhofen, Germany] dissolved in 10 ml culture medium) and 25 μl zymosan solution ($16 \times 10^8$ zymosan A [Sigma] particles/ml culture medium) as stimulus were added per well. Plates were immediately transferred into the temperature-conditioned (37°C) luminescence plate reader (LumiStar, BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, Germany). The kinetics of light emission was analyzed using the following conditions: each well was measured 50 times at 120 s intervals with a signal integration of 2.5 s per measurement. Data were acquired and calculated using the implemented analysis software.

Antimycin (antimycin A from *Streptomyces*; Sigma) and DPI (Sigma) were applied as inhibitors of superoxide production. Inhibitors were solved in ethanol or dimethylsulfoxide, respectively, and diluted to final concentrations in culture medium. Equivalent concentrations of solvents served as controls.

Cell viability was routinely checked at the end of each experiment using the lactate dehydrogenase release assay (Sigma). There were no significant differences in the viability of cells from the different exposure groups nor did zymosan or the applied inhibitors influence cell vitality (data not shown).

*RT-PCR*

Total RNA from BAL cells was obtained by lysis of cells using the Trizol Reagent (Gibco–Invitrogen, Groningen, The Netherlands) followed by RNA extraction according to the manufacturer's protocol. RNA quality and quantity were determined by spectrophotometry at 260 and 280 nm.

For first-strand cDNA synthesis, 1 μg of total RNA of each sample was treated with DNase I (Gibco–Invitrogen) and subsequently reverse-transcribed using an oligo$(dT)_{20}$ primer (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) and Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany). All procedures were carried out according to the supplier's recommendations.

PCRs were performed as heat-soaked PCRs using the HotStarTaq Master Mix (Qiagen). Therefore, 1 μl of first-strand cDNA was mixed with 25 μl HotStarTaq Master Mix (containing HotStarTaq Polymerase, dNTPs, and an appropriate reaction buffer), 1 μl of each sense and antisense primer (50 pmol/μl), and 22 μl double-distilled water to yield a final volume of 50 μl per reaction. The samples were subjected to 95°C for 15 min to effectively denature DNA–RNA hybrids and to activate the Taq polymerase. Subsequently, 22–30 PCR cyles (denaturation for 1 min at 94°C, primer annealing for 40 s at optimal temperature, extension at 72°C for 1 min) were performed depending on the abundance of the respective mRNA in the samples. A final extension step at 72°C for 10 min was added to ensure that all PCR fragments were completely double-stranded. PCRs were performed in a TouchDown thermal cycler (Hybaid, Heidelberg, Germany). PCR conditions had been optimized in initial experiments and all products were obtained from the linear phase of the PCR. To prove sample equality, a PCR with the housekeeping gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was included. Individual primer sequences and PCR conditions are summarized in Table 1.

Resulting PCR products were separated on 1.2% agarose gels (Gibco–Invitrogen) with 1x Tris–acetate–EDTA as running buffer. Gels were subsequently visualized by staining with ethidium bromide and densitometrically analyzed with the digital gel documentation and analysis system Bio1D (Vilbert-Lourmat, Marne la Vallée, France).

*Assays for detection of intracellular superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) enzyme activities*

Intracellular total SOD and GPx activities were assessed using the Bioxytech SOD-525TM or Bioxytech GPx-340TM assay kit (both from Oxis International, Portland, OR, USA), respectively. Therefore, $2 \times 10^6$ BAL cells were centrifuged and the pellet was dissolved in 100 μl of the respective assay buffer (contained in the kit system). Cellular structures were disrupted by five repeats of freezing and thawing and remaining particulate matter was pelleted by centrifugation at 8500*g* for 10 min at 4°C. The resulting supernatants served as samples for enzyme activity determinations that were performed according to the supplier's kit protocols. Kinetic measurements of enzyme activities were accomplished using an Ultrospec 3100 pro spectrophotometer (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany).

Table 1. Characteristics of Primers and PCR Conditions

| Gene | Primer | Sequence | Fragment size (bp) | Annealing temperature (°C) | Number of cycles |
|---|---|---|---|---|---|
| GPx-1 | Sense | 5′-ACAGTCCACCGTGTATGCCT-3′ | 510 | 60 | 22 |
| | Antisense | 5′-CGCCTGCTGTATCTGCGCAC-3′ | | | |
| GPx-3 | Sense | 5′-TTCGGCCTGGTCATTCTGGG-3′ | 384 | 60 | 30 |
| | Antisense | 5′-TGCCTGCCGCCTCATATAGG-3′ | | | |
| Catalase | Sense | 5′-GTCCAGAGTCTCTCCATCAG-3′ | 560 | 60 | 26 |
| | Antisense | 5′-CACAGGTATCTGCAGATAGT-3′ | | | |
| Mn-SOD | Sense | 5′-GCGCAGATCATGCAGCTGCA-3′ | 474 | 62 | 28 |
| | Antisense | 5′-CAGATAGTCAGGTCTGACGT-3′ | | | |
| CuZn-SOD | Sense | 5′-TGTCAGGACAGATTACAGGA-3′ | 410 | 57 | 30 |
| | Antisense | 5′-AGCAGATGCCGTCTGAGACT-3′ | | | |
| GAPDH | Sense | 5′-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3′ | 300 | 62 | 24 |
| | Antisense | 5′-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3′ | | | |

*Statistics*

All numerical data were analyzed for significance with one-way ANOVA and pairwise multiple comparison procedures using the Student–Newman–Keuls method.

## RESULTS

*Superoxide production by BAL cells of $NO_2$-exposed rats*

Phagocytes, i.e., macrophages and neutrophils, are important producers of superoxide in response to phagocytic stimuli. Using the identical $NO_2$ exposure model, we have recently demonstrated that these two cell populations represent the majority of BAL cells at all investigated time points. However, cellular composition as well as total cell numbers changed depending on the exposure time [24]. Briefly, total lavaged cell numbers increased from about 4.3 million cells per animal in controls to 8.9, 18.1, and 13.0 million cells in animals exposed 1, 3, and 20 days, respectively. BAL cells consisted of 96% macrophages and 1.7% neutrophils in untreated controls; the remainder were lymphocytes or unidentified. The relative number of neutrophils increased to 8.3 and 26.2% after 1 and 3 days exposure, and dropped to 11.7% after 20 days of $NO_2$ exposure. With the exception of Day 3, on which 8.1% of T lymphocytes were found, all other cells but the remaining 2% were macrophages, thereby representing the major cell population at all time points.

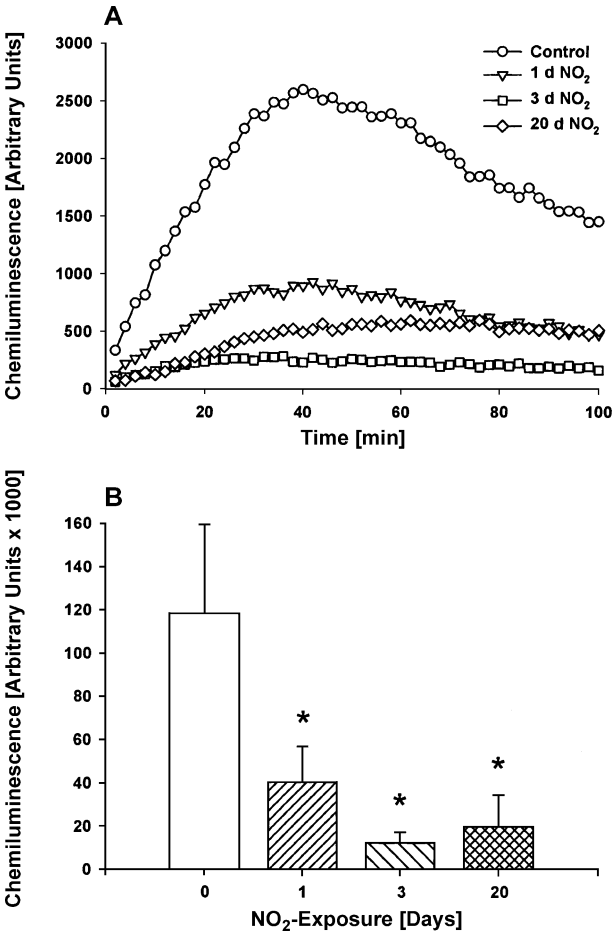


Fig. 1. Superoxide radical release of BAL cells from $NO_2$-exposed and control rats. BAL cells were stimulated in vitro with zymosan, and lucigenin-enhanced chemiluminescence was analyzed over a 100 min period after stimulation. Shown are representative chemiluminescence curves from a single animal of each of the treatment groups (A) and mean ± SD calculated chemiluminescence signals of at least 16 individually analyzed animals per group (B). *Significant statistical difference from the control group, $p < .05$.

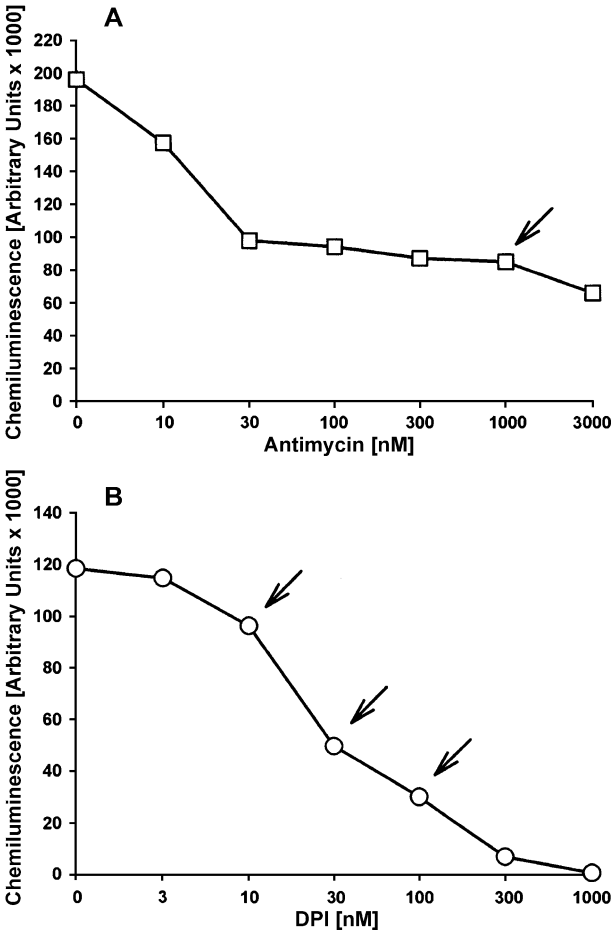


Fig. 2. Dose–response curves for the inhibition of superoxide radical release of BAL cells by antimycin (A) and DPI (B). BAL cells from control animals were stimulated with zymosan in the presence of the indicated concentrations of inhibitors of superoxide production, and the resulting chemiluminescence signals were analyzed. Arrows indicate inhibitor concentrations that were applied in subsequent experiments.

The production of superoxide was analyzed by lucigenin-enhanced chemiluminescence in BAL cells obtained from animals that had been exposed to $NO_2$ for 1, 3, or 20 days in comparison to cells from untreated controls, after in vitro stimulation with zymosan. As shown in Fig. 1, cells from untreated control animals showed the typical extent and kinetics

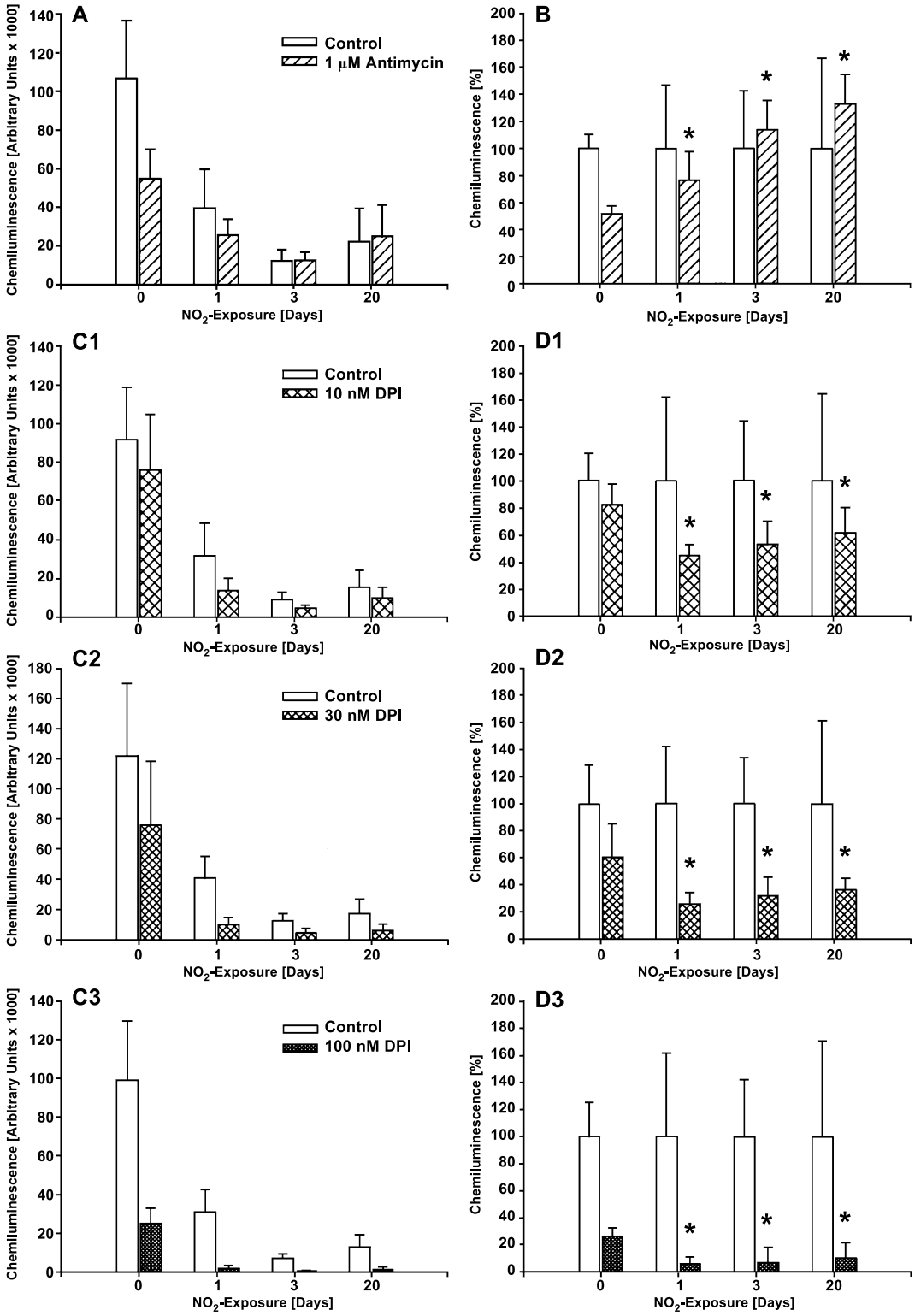


Fig. 3. Inhibition of superoxide release of BAL cells from $NO_2$-exposed and control rats by 1 μM antimycin (A and B) and DPI at concentrations of 10 nM (C1 and D1), 30 nM (C2 and D2), and 100 nM (C3 and D3). BAL cells from differentially treated rats were stimulated with zymosan in the presence of the indicated concentrations of inhibitors, and the resulting chemiluminescence signals were calculated. The absolute values are shown on the left (A and C). To focus on the major message of these experiments, the same data are also shown as relative results on the right (B and D), where the mean luminescence of cells without inhibitor was set as 100%. Results are the means ± SD of eight individually analyzed rats per group. *Significant statistical difference from the inhibitor-treated group at time zero, $p < .05$.

of superoxide production in response to the phagocytic stimulus. In contrast, superoxide production was significantly impaired in cells from all treatment groups. Already a 24 h $NO_2$ exposure resulted in markedly decreased superoxide formation, which was further reduced after exposure for 3 and 20 days. As also shown in Fig. 1A, not only was net production decreased, but the kinetics of superoxide release were also delayed in BAL cells from animals exposed 3 and 20 days.

*Inhibition of superoxide production*

To elucidate which enzyme system is responsible for the decreased superoxide production by BAL cells from $NO_2$-exposed rats, we applied two inhibitors of superoxide production. Fig. 2 shows the results of a dose-dependent inhibition of superoxide production by antimycin and DPI in zymosan-stimulated BAL cells from untreated control animals. Antimycin, which is a highly specific inhibitor of respiratory chain complex III superoxide production, led to an approximately 50% reduction in lucigenin-enhanced chemiluminescence in these control cells. This effect was observed over an ample range of concentrations as shown in Fig. 2A. To ensure complete inhibition of respiratory chain superoxide production, 1 μM antimycin was applied in consecutive experiments. In contrast to antimycin, DPI is known to preferentially inhibit NADPH oxidase; however, at higher concentrations, respiratory chain superoxide release is also influenced. Thus, applying DPI as inhibitor resulted in a continuous decrease in superoxide release by normal BAL cells (Fig. 2B). Therefore, three different concentrations of DPI (indicated by arrows in Fig. 2B) were used in the following investigations.

When antimycin was used to inhibit zymosan-induced superoxide production in BAL cells from $NO_2$-treated rats, it became evident that the extent of inhibition was lower, the longer the animals were exposed to $NO_2$. In fact, antimycin was no more able to suppress the remaining superoxide production in cells from animals exposed 3 and 20 days (Figs. 3A and 3B). These data suggest that mitochondrial superoxide production was completely abolished in BAL cells of these rats. This, in turn, implies that the remaining superoxide release is caused by NADPH oxidase activity which is supported by the results of DPI inhibition. At all doses tested, DPI induced stronger inhibition of superoxide release in cells from $NO_2$-treated animals even though the extent of the remaining superoxide production depended on the actual DPI concentration (Figs. 3C and 3D). At a DPI concentration of 100 nM almost no superoxide was detectable in BAL cells from $NO_2$-exposed rats.

*Expression and activity of antioxidant enzymes*

Phagocytes protect themselves from the damaging activities of superoxide radicals by expression of antioxidant enzymes. Superoxide may be converted to hydrogen peroxide by the action of superoxide dismutases, and hydrogen peroxide may further be reduced to water by glutathione peroxidase and catalase activities. We therefore investigated the mRNA expression and enzyme activities of these enzymes in BAL cells of $NO_2$-exposed animals.

As shown in Fig. 4, mRNA expression was differentially regulated for different forms of GPx and SOD. Whereas mRNA expression for GPx-1 was not altered in BAL cells by $NO_2$ exposure, GPx-3 expression showed a significant increase with ongoing exposure time. In control animals, almost no GPx-3 mRNA was detectable but significant amounts were found in BAL cells of rats exposed 3 and 20 days. Mn-SOD expression was

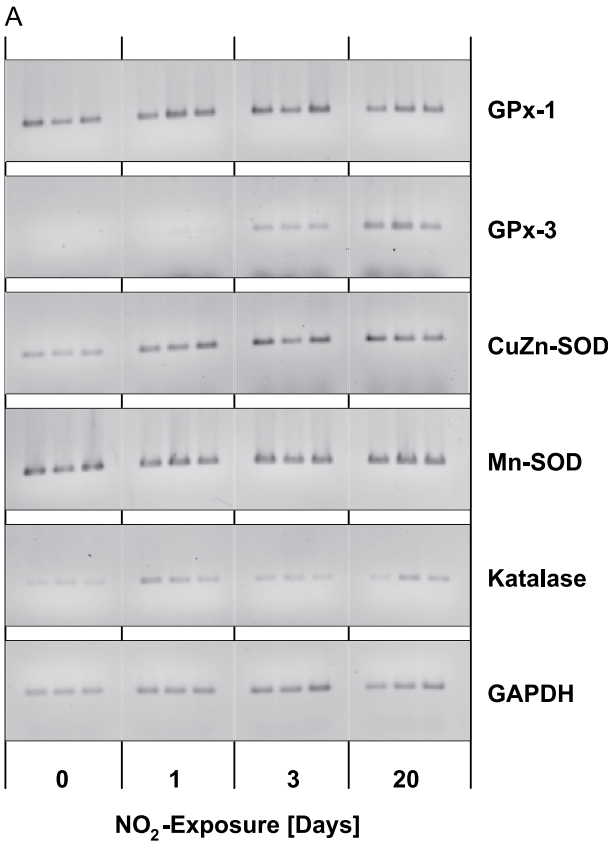


Fig. 4. RT-PCR detection of GPx-1, GPx-3, CuZn-SOD, Mn-SOD, catalase, and GAPDH mRNA expression in BAL cells of $NO_2$-exposed and untreated control rats. Total RNA was prepared from freshly isolated BAL cells, and mRNA was reverse transcribed into cDNA that was amplified by PCR under the conditions listed in Table 1. Shown are ethidium bromide-stained agarose gels of three individual animals per group (A) and respective densitometric analyses (B). Densitometric analyses are expressed as means ± SD of six animals per group. GAPDH serves as control housekeeping gene. *Significant statistical difference from the control group, $p < .05$.

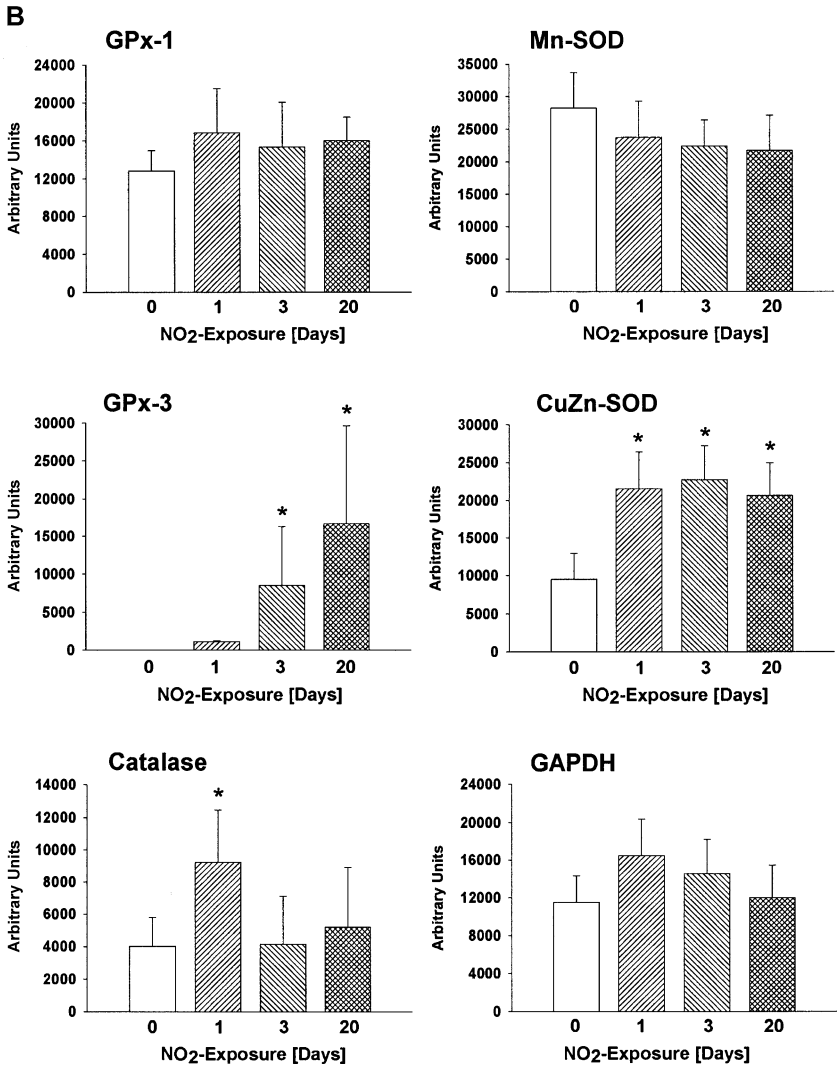


Fig. 4 (*continued*).

comparable in all treatment groups. In contrast, CuZn-SOD mRNA was demonstrated in larger amounts in BAL cells of all $NO_2$-exposed groups when compared with cells from control animals; however, there were no differences in expression between animals exposed for different times. For catalase, increased mRNA expression was observed only in BAL cells of 1 day exposed animals and declined to control levels after longer exposures.

Finally, the activity of GPx and SOD was analyzed in the BAL cells of $NO_2$-exposed rats in comparison to control animals. In contrast to the analyses of mRNA expression, actual enzyme activities could not be analyzed at the individual isoenzyme level, as all isoforms catalyze the same chemical reaction. Thus, the total intracellular activity of GPx and SOD was determined. For both enzyme systems, a significant increase was found only in cells from animals that had been exposed to $NO_2$ for 20 days (Fig. 5).

## DISCUSSION

Cigarette smoke-derived oxidants are thought to be crucial in the pathogenesis of COPD. The gas phase of one cigarette puff contains as many as $10^{15}$ organic, short-lived and highly reactive carbon- and/or nitrogen-containing radicals and a NO concentration of up to 500 ppm [25]. Thus, exposure of laboratory animals to reactive nitrogen-containing gases like $NO_2$ seems to be a useful model to mimic inflammatory processes involved in development of the human disease. Indeed, human COPD and $NO_2$-exposed rats have several features in common that comprise, for example, increased numbers of macrophages and neutrophils [26,27] and enhanced

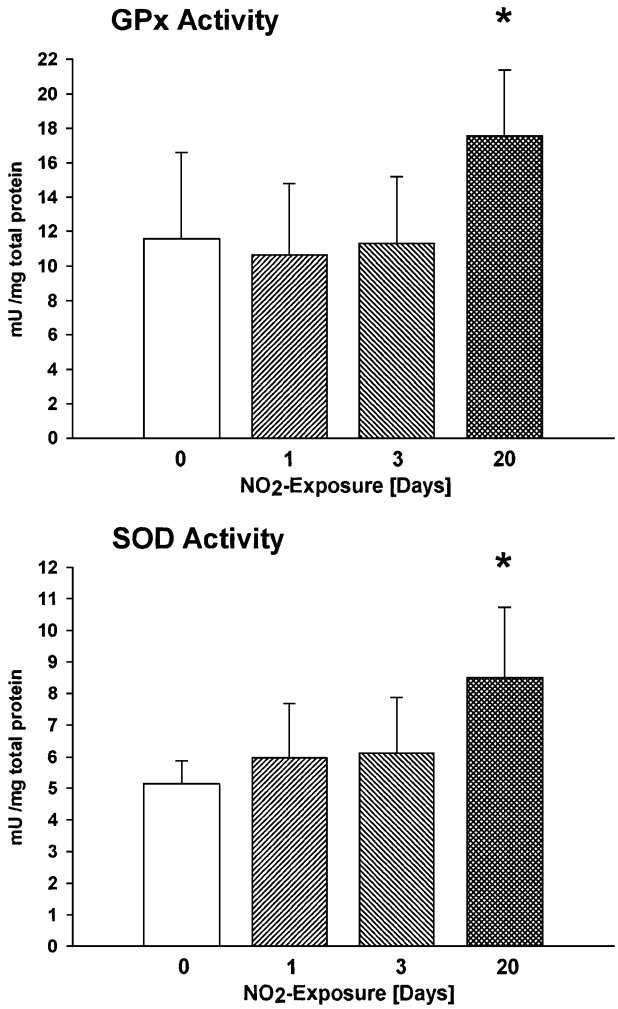


Fig. 5. Detection of total intracellular GPx and SOD activities in BAL cells from $NO_2$-exposed and untreated control rats. Freshly isolated BAL cells from differentially treated animals were lysed by repeated freezing and thawing and enzyme activities were analyzed by specific enzyme activity assays. Shown are means ± SD of five animals per group. *Significant statistical difference from the control group, $p < .05$.

AM activation with respect to morphological parameters [25] and mediator release [24,28]. Because macrophages and neutrophils may eliminate pathogens by phagocytosis and subsequent production of toxic amounts of radicals, among them superoxide, increased numbers of activated phagocytes in the lung should safeguard the host from microbial infections.

In the present study we investigated superoxide radical production by BAL cells from $NO_2$-exposed rats using lucigenin-enhanced chemiluminescence detection. We preferred to work with the whole BAL cell population instead of purified cell populations to avoid the initiation of activation steps by the purification process. It is known that macrophages and also neutrophils may become activated very easily during in vitro purification procedures. As the aim of our study was to represent the in vivo situation as close as possible we decided to avoid any risk of in vitro cell activation. Lucigenin was applied as probe because it is the most selective reagent for the detection of superoxide [29]. We are conscious of the properties of lucigenin to autoxidize or to directly stimulate NADPH oxidase [30,31]. However, we did not observe any measurable signal production in cell-free systems containing all other components or in systems including cells without any in vitro stimulation. These observations clearly indicate that in our experimental setting, neither autoxidation nor direct NADPH activation significantly contributes to signal production. Using the mentioned methodology, we could clearly show that superoxide radical production is significantly impaired in BAL cells from $NO_2$- exposed rats. This effect was already observed after 1 day of exposure and persisted over the whole exposure time of 20 days (Fig. 1). Because the composition of the BAL cell population changed over time with a maximum number of neutrophils at day 3 [24], our data imply that both cell populations, AMs and neutrophils, were affected. Thus, downregulation of superoxide radical production may rather be caused by a direct influence of the oxidative stress caused by $NO_2$ than by cell type-specific processes. Both cell populations make use of the same two enzyme systems to produce large amounts of superoxide radicals, e.g., NADPH oxidase and complex III of the respiratory chain. By use of antimycin, which specifically inhibits complex III, we were able to show that both systems contribute to almost the same extent to the total superoxide production in normal BAL cells (see Fig. 2A). The dramatic inhibition of superoxide radical production in BAL cells from $NO_2$-exposed animals clearly indicates that both enzyme systems are affected. However, by use of the inhibitors antimycin and DPI we could demonstrate that complex III is more sensitive to the $NO_2$-induced effects than NADPH oxidase, as there is no complex III activity left in the cells from animals exposed 3 and 20 days. Taken together with the data from the DPI experiments it became evident that the remaining activity in these cells is completely attributable to NADPH oxidase. These data are in accord with findings of Brown [32], who found that NO and its derivatives (among them $NO_2$) may cause inhibition of the respiratory chain. The mechanisms of inhibition of the affected enzyme systems by $NO_2$ exposure have not been elucidated. $NO_2$ itself may impose oxidative stress and, on the other hand, may provide nitrosative stress that may lead either to nitration of aromatic amino acids in proteins, e.g., formation of 3-nitrotyrosine residues in enzyme proteins, or to formation of *S*-nitrosothiols by nitrosation of thiol residues. Both mechanisms have been reported to influence enzyme activities [33–36].

Decreased levels of superoxide may be achieved not only by decreasing formation of superoxide but also by

enhancing counteracting mechanisms such as generation of antioxidants, among them antioxidant enzymes. Such autoprotective systems are of particular importance in cells that professionally produce large amounts of reactive oxygen species such as macrophages [37]. We therefore investigated whether increased expression and/or activity of antioxidant enzymes contributed to the decreased occurrence of superoxide radicals in stimulated BAL cells from $NO_2$-exposed rats. Superoxide dismutases are the only enzymes that may convert superoxide radicals to hydrogen peroxide [38] which may further be reduced to $H_2O$ by the action of catalase or glutathione peroxidases. There are three superoxide dismutase isoforms: cytosolic CuZn-SOD (or SOD1), mitochondrial Mn-SOD (SOD2), and extracellular SOD (EC-SOD or SOD3) [39]. We focused on the two intracellular SODs and detected an increased mRNA expression for CuZn-SOD in cells from all $NO_2$-exposed animal groups, whereas Mn-SOD mRNA expression showed no alterations (Fig. 4). It is known that both SODs are constitutively expressed in a variety of cell types, e.g., alveolar macrophages, and that the expression may be further increased by several stimuli, among them hyperoxia, nitric oxide, and ozone. On the basis of several observations, MnSOD has been classified as the primary SOD in lung, because mRNA expression and enzyme activity have been found to be substantially elevated by oxidants in whole lung tissue, isolated type II cells, or interstitial fibroblasts. In contrast, CuZn-SOD mRNA expression and/or activity remained more or less unchanged [38]. Thus, BAL cells show the opposite regulation pattern, at least at the mRNA level. However, even though mRNA expression for CuZn-SOD was elevated at all time points of $NO_2$ exposure, overall SOD activities were found to be increased only in cells from rats exposed 20 days (Fig. 5). These findings confirm observations by Kong et al. that elevated mRNA expression levels for CuZn-SOD do not necessarily result in increased enzyme activities [40]. Similar results were obtained for glutathione peroxidases. Even though strong induction was observed for GPx-3 at the mRNA level in rats exposed 3 and 20 days a weak increase in overall GPx activity was observed only in animals exposed 20 days (Fig. 5). In addition to the possibility that translational regulation mechanisms may be involved, it is likely that glutathione peroxidases and also SODs might have been partially inactivated by the action of reactive nitrogen species [41,42]. In conclusion, even though increased mRNA levels were observed for certain isoenzymes of SOD and GPx, increased activities of antioxidant enzymes do not seem to play a major role in the regulation of superoxide formation of BAL cells from $NO_2$-exposed rats.

A clear-cut consequence of the reduced superoxide production by stimulated BAL cells is their diminished capacity to fight bacterial infections [43–46]. Additional physiological aspects might also be of importance. First, the most reactive nitrogen compounds are reaction products of $NO_2$ or other precursors with superoxide radicals or hydrogen peroxide, e.g., peroxynitrite. Taking this into account, decreased superoxide production by BAL cells from $NO_2$-exposed animals might be a mechanism by which the cells protect themselves from a toxic action. Second, it has become evident that reactive oxygen species are also involved in signaling processes. Several reactive oxygen species have been shown to act as second messengers that, for example, induce NFκB and ERK signal transduction pathways in macrophages [1]. Impaired superoxide radical production by alveolar macrophages of $NO_2$-exposed rats may impair the regulation of inflammatory reactions in macrophages and other cells. Along this line, an alternative macrophage activation pattern has been observed in the lungs of $NO_2$-exposed rats [24]. Whether modified redox signaling processes are really involved in these changes remains to be investigated.

Controversial data exist on superoxide production by alveolar cells from COPD patients or smokers. Some investigators observed increased superoxide production by BAL cells from smokers; others found no differences [47] or even decreased superoxide release [48]. It should be noted that most of the studies were performed with the stimulus phorbol myristate acetate (PMA) instead of zymosan as done in our study. It is known that resident alveolar macrophages exert diminished reactivity to PMA, whereas newly infiltrated macrophages and neutrophils show a good response [49]. Thus, data obtained after PMA stimulation of BAL cells may rather represent changes in the BAL cell population than the capability to produce reactive oxygen species. We also obtained only very poor superoxide production when BAL cells were stimulated with PMA instead of zymosan (data not shown). If comparable impairment of phagocyte reactivity is also observed in human COPD patients, our data could provide an explanation for the increased incidence of bacterial and viral infections and resulting exacerbations.

*Acknowledgment*—This study was funded by the German Ministry of Education and Research Grant 01GC0103.

## REFERENCES

[1] Forman, H. J.; Torres, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166:**S4–S8; 2002.

[2] Dorger, M.; Munzing, S.; Allmeling, A. M.; Messmer, K.; Krombach, F. Phenotypic and functional differences between rat

alveolar, pleural, and peritoneal macrophages. *Exp. Lung Res.* **27:** 65–76; 2001.

[3] Laskin, D. L.; Weinberger, B.; Laskin, J. D. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **70:**163–170; 2001.

[4] Kooguchi, K.; Hashimoto, S.; Kobayashi, A.; Kitamura, Y.; Kudoh, I.; Wiener-Kronish, J.; Sawa, T. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* **66:** 3164–3169; 1998.

[5] Broug-Holub, E.; Toews, G. B.; van Iwaarden, J. F.; Strieter, R. M.; Kunkel, S. L.; Paine, R., III; Standiford, T. J. Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella* pneumonia: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infect. Immun.* **65:**1139–1146; 1997.

[6] Knapp, S.; Leemans, J. C.; Florquin, S.; Branger, J.; Maris, N. A.; Pater, J.; van Rooijen, N.; van der, P. T. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167:**171–179; 2003.

[7] Iles, K. E.; Forman, H. J. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol. Res.* **26:**95–105; 2002.

[8] Genova, M. L.; Pich, M. M.; Biondi, A.; Bernacchia, A.; Falasca, A.; Bovina, C.; Formiggini, G.; Castelli, G. P.; Lenaz, G. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of coenzyme Q as an antioxidant. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **228:**506–513; 2003.

[9] Rembish, S. J.; Trush, M. A. Further evidence that lucigenin-derived chemiluminescence monitors mitochondrial superoxide generation in rat alveolar macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **17:**117–126; 1994.

[10] Li, Y.; Trush, M. A. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253:**295–299; 1998.

[11] Jeffery, P. K. Inflammation in chronic obstructive lung disease. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **160:**S3–S4; 1999.

[12] Markewitz, B. A.; Owens, M. W.; Payne, D. K. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med. Sci.* **318:**74–78; 1999.

[13] O'Byrne, P. M.; Postma, D. S. The many faces of airway inflammation: asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **159:**S41–S66; 1999.

[14] Peleman, R. A.; Rytila, P. H.; Kips, J. C.; Joos, G. F.; Pauwels, R. A. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* **13:**839–843; 1999.

[15] Rennard, S. I. Inflammation and repair processes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **160:**S12–S16; 1999.

[16] Shapiro, S. D. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160:**S29–S32; 1999.

[17] Lieberman, D.; Lieberman, D.; Gelfer, Y.; Varshavsky, R.; Dvoskin, B.; Leinonen, M.; Friedman, M. G. Pneumonic vs nonpneumonic acute exacerbations of COPD. *Chest* **122:** 1264–1270; 2002.

[18] White, A. J.; Gompertz, S.; Stockley, R. A. Chronic obstructive pulmonary disease: 6. The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **58:**73–80; 2003.

[19] Chitano, P.; Rado, V.; Di Stefano, A.; Papi, A.; Boniotti, A.; Zancuoghi, G.; Boschetto, P.; Romano, M.; Salmona, M.; Ciaccia, A.; Fabbri, L; Mapp, C. E. Effect of subchronic in vivo exposure to nitrogen dioxide on lung tissue inflammation, airway micro-vascular leakage, and in vitro bronchial muscle responsiveness in rats. *Occup. Environ. Med.* **53:**379–386; 1996.

[20] Barth, P. J.; Müller, B. Effects of nitrogen dioxide exposure on Clara cell proliferation and morphology. *Pathol. Res. Pract.* **195:**487–493; 1999.

[21] Müller, B.; Barth, P. J.; Wichert, P. v. Structural and functional impairment of surfactant protein A after exposure to nitrogen dioxide in rats. *Am. J. Physiol.* **263:**L177–L184; 1992.

[22] Barth, P. J.; Uhlarik, S.; Bittinger, A.; Wagner, U.; Ruschoff, J. Diffuse alveolar damage in the rat lung after short and long term exposure to nitrogen dioxide. *Pathol. Res. Pract.* **190:**33–41; 1994.

[23] Barth, P. J.; Müller, B.; Wagner, U.; Bittinger, A. Quantitative analysis of parenchymal and vascular alterations in NO2-induced lung injury in rats. *Eur. Respir. J.* **8:**1115–1121; 1995.

[24] Garn, H.; Siese, A.; Stumpf, S.; Barth, P. J.; Müller, B.; Gemsa, D. Shift towards an alternatively activated macrophage response in lungs of $NO_2$-exposed rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28:**386–396; 2003.

[25] Repine, J. E.; Bast, A.; For the Oxidative Stress Study Group Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156:**341–357; 1997.

[26] Robison, T. W.; Duncan, D. P.; Forman, H. J. Chemoattractant and leukotriene B4 production from rat alveolar macrophages exposed to nitrogen dioxide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3:** 21–26; 1990.

[27] Glasgow, J. E.; Pietra, G. G.; Abrams, W. R.; Blank, J.; Oppenheim, D. M.; Weinbaum, G. Neutrophil recruitment and degranulation during induction of emphysema in the rat by nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.* **135:**1129–1136; 1987.

[28] Barnes, P. J. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev. Med.* **54:**113–129; 2003.

[29] Myhre, O.; Andersen, J. M.; Aarnes, H.; Fonnum, F. Evaluation of the probes 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* **65:**1575–1582; 2003.

[30] Liochev, S. I.; Fridovich, I. Lucigenin (bis-*N*-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch. Biochem. Biophys.* **337:**115–120; 1997.

[31] Vasquez-Vivar, J.; Hogg, N.; PritchardJr, K. A.; Martasek, P.; Kalyanaraman, B. Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett.* **403:**127–130; 1997.

[32] Brown, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1504:**46–57; 2001.

[33] van der Vliet, A.; Eiserich, J. P.; Shigenaga, M. K.; Cross, C. E. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease?. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160:**1–9; 1999.

[34] Espey, M. G.; Miranda, K. M.; Feelisch, M.; Fukuto, J.; Grisham, M. B.; Vitek, M. P.; Wink, D. A. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann. NY Acad. Sci.* **899:**209–221; 2000.

[35] Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101:**4003–4008; 2004.

[36] Kirsch, M.; Korth, H. G.; Sustmann, R.; de Groot, H. The pathobiochemistry of nitrogen dioxide. *Biol. Chem.* **383:**389–399; 2002.

[37] Ferret, P. J.; Soum, E.; Negre, O.; Fradelizi, D. Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. *BMC Immunol.* **3:**3; 2002.

[38] Kinnula, V. L.; Crapo, J. D. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167:** 1600–1619; 2003.

[39] Zelko, I. N.; Mariani, T. J.; Folz, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene

structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* **33:**337–349; 2002.
[40] Kong, X. J.; Lee, S. L.; Lanzillo, J. J.; Fanburg, B. L. Cu,Zn superoxide dismutase in vascular cells: changes during cell cycling and exposure to hyperoxia. *Am. J. Physiol.* **264:**L365–L375; 1993.
[41] Padmaja, S.; Squadrito, G. L.; Pryor, W. A. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **349:**1–6; 1998.
[42] Lawler, J. M.; Song, W. Specificity of antioxidant enzyme inhibition in skeletal muscle to reactive nitrogen species donors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294:**1093–1100; 2002.
[43] Blanchard, T. G.; Yu, F.; Hsieh, C. L.; Redline, R. W. Severe inflammation and reduced bacteria load in murine *Helicobacter* infection caused by lack of phagocyte oxidase activity. *J. Infect. Dis.* **187:**1609–1615; 2003.
[44] Segal, B. H.; Ding, L.; Holland, S. M. Phagocyte NADPH oxidase, but not inducible nitric oxide synthase, is essential for early control of *Burkholderia cepacia* and *Chromobacterium violaceum* infection in mice. *Infect. Immun.* **71:**205–210; 2003.
[45] LaCourse, R.; Ryan, L.; North, R. J. Expression of NADPH oxidase-dependent resistance to listeriosis in mice occurs during the first 6 to 12 hours of liver infection. *Infect. Immun.* **70:** 7179–7181; 2002.
[46] Mastroeni, P. Immunity to systemic salmonella infections. *Curr. Mol. Med.* **2:**393–406; 2002.
[47] Schaberg, T.; Haller, H.; Rau, M.; Kaiser, D.; Fassbender, M.; Lode, H. Superoxide anion release induced by platelet-activating factor is increased in human alveolar macrophages from smokers. *Eur. Respir. J.* **5:**387–393; 1992.
[48] Verhoeven, G. T.; Wijkhuijs, A. J.; Hooijkaas, H.; Hoogsteden, H. C.; Sluiter, W. Effect of an inhaled glucocorticoid on reactive oxygen species production by bronchoalveolar lavage cells from smoking COPD patients. *Mediators Inflamm.* **9:**109–113; 2000.
[49] Monick, M. M.; Carter, A. B.; Gudmundsson, G.; Geist, L. J.; Hunninghake, G. W. Changes in PKC isoforms in human alveolar macrophages compared with blood monocytes. *Am. J. Physiol.* **275:**L389–L397; 1998.

## ABBREVIATIONS

AM — alveolar macrophage
BAL — bronchoalveolar lavage
COPD — chronic obstructive pulmonary disease
DPI — diphenyleneiodonium
GAPDH — glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPx — glutathione peroxidase
PMA — phorbol myristate acetate
RT-PCR — reverse transcription polymerase chain reaction
SOD — superoxide dismutase

# Verzeichnis der akademischen Lehrer

**Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:**

Aumüller, Basler, Bertalanffy, Bien, Cetin, Czybayko, Daut, del Rey, Eilers, Garn, Gemsa, Grzeschik, Hasilik, Hoyer, Kern, Klenk, Kohlmann, Krieg, Kroll, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmitt, Schnabel, Seitz, Sommer, Steiniger, Suske, von Wichert, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

**Meine akademischen Lehrer in Innsbruck waren:**

Daxecker, Dierich, Fritsch, Glossmann, Jaschke, Kofler, Mikuz, Poewe, Puschendorf, Pfeiffer, Schwarz, Winkler.

**Meine akademischen Lehrer in Magdeburg waren:**

Götte, Huth, Klein, Lehnert, Lobmann, Lippert, Malfertheiner, Neumann, Wagemann, Wallesch.

## Danksagung

Das erste Dankeschön möchte ich an unsere Arbeitsgruppe richten, in erster Linie an Dr. Holger Garn als ersten Ansprech- und Gesprächspartner, aber auch an Dr. Annette Siese, Sabine Stumpf und natürlich an Herrn Professor Dr. Gemsa. Ihnen allen verdanke ich ein sehr interessantes Thema meiner Arbeit, wobei sich dank der hervorragenden fachlichen und persönlichen Betreuung ein Raum auftat, in dem ich mich frei bewegen konnte.
Die Erinnerungen an die Zeit im Institut für Immunologie lassen mich immer mit Freude an Marburg zurückdenken.

Ein nächster Dank gilt meinen Eltern. Ihre immerwährende Unterstützung meiner verschiedensten Ziele hat mir stets viel Halt gegeben, ihr Feingefühl als kritische, wegweisende und verstehende Gesprächspartner hat mich geprägt und mir neue Horizonte eröffnet.

Ein weiterer Dank gilt meinem Bruder Peter, der mich stets mit Rat und vor allem auch mit Tat bei allen computertechnischen Problemen dieser Arbeit unterstützt und zur Lösung dieser Probleme maßgeblich beigetragen hat.

Abschließen möchte ich die Arbeit mit dem Dank an meine Frau Andrea:
Einfach Danke für alles!