

Aus dem Institut für Umwelttoxikologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktorin: Frau Prof. Dr. H. Foth)



**Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen  
und ihre toxikologische Anwendungsprüfung**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Thomas Wilhelm Bernhard Stock  
geboren am 05. Oktober 1967 in Weißenfels/Saale

Gutachter: Frau Prof. Dr. Foth  
Frau Prof. Dr. Degen (Dortmund)  
Prof. Dr. Kahl (Göttingen)

30.07.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000003746**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003746>]

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung einer Primärzellkultur normaler humaner Bronchialepithelzellen. Erst die Entwicklung einer Explantationskultur erfüllte, im Gegensatz zu digestiven Selektionsversuchen, die Anforderungen an qualitative und quantitative Eigenschaften einer primären, reproduktiven Kultur epithelialer Zellen bronchialen Ursprungs. Diese Zellkultur fungiert als Modell der epithelialen Auskleidung des Bronchialbaumes, da die metabolischen Potenzen des Bronchialepithels der Lunge neben dem Hauptstoffwechselorgan Leber zunehmend in das Blickfeld des Interesses rücken, da die Lunge ein Organ großer medizinischer, individualhygienischer und gesundheitspolitischer Bedeutung ist.

Im Rahmen der Charakterisierung der Zellkultur wurde die bronchoepitheliale Originarität der ausgewachsenen Zellen befundet. Bei der elektronenmikroskopischen Visualisierung des Auswuchses konnten filamentäre Strukturen des Zytokeratins, eines Bausteins der epithelialen Zytoskelettarchitektur, sowie für Epithelien typische Mikrovilli nachgewiesen werden. Da die Primärkultur monophasisch und serumfrei betrieben wurde, war eine Zilienexpression nicht zu erwarten und nicht vorhanden. Eine immunhistochemische Detektion des Zytokeratins belegte ebenfalls den bronchoepithelialen Charakter unserer Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen. So konnten die Formationen von Zytokeratin und Zytokeratin 8/18 im Zytosol der kultivierten Zellen demonstriert werden. Eine Gegenprobe mit Vimentin, einem Marker für Zytoskelettstrukturen von Zellen mesenchymalen Ursprungs, zeigte lediglich punktuelle Verunreinigungen, die eine Reinheit der Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen  $\geq 95\%$  belegt und die Interpretation von Daten für die Bronchialepithelzellen gewährleistet. Bei der Untersuchung der Proteinexpression im Westernblot konnte für die kultivierten Zellen für Zytokeratin 18 eine interindividuelle Streuung und für Zytokeratin 19 ein konstitutives Auftreten beobachtet werden.

Im Rahmen der Detektion fremdstoffmetabolisierender Enzyme konnte für das CYP2E1-Protein eine Niederregulierung in der Kultur verzeichnet werden. Die Expression der mRNA des CYP2E1 und weiterer CYP-Isoformen verwies auf interindividuelle Unterschiede. Durch Ethanolinduktion konnte eine CYP2E1-Stabilisierung erreicht werden. Dies wurde im Chlorzoxazonassay durch den CYP2E1-spezifischen Umsatz von CLX zu 6-OH-CLX demonstriert. Der Nachweis einer direkten Dosis-Wirkungs-Beziehung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit eines Komplexen Stoffgemisches an Bronchialepithelzellen veranschaulichte im Cometassay die Eignung unseres Modells zur Untersuchung gentoxischer Fragestellungen.

Stock, Thomas: Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen und ihre toxikologische Anwendungsprüfung.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2002

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung	1
1.1	Anatomisch-physiologische Aspekte des Bronchialbaumes	2
1.2	Das Cytochrom-P450-System	4
1.2.1	Die Cytochrom-P450-Expression der Lunge	5
1.2.2	Die Cytochrome P450 2E1, 2B7, 2F1 und 4B1 in der Lunge	6
1.3	Das Cometassay	8
1.4	Zielstellung	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien	12
2.1.2	Antikörper, Antigene und Primer	13
2.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.4	Medien zur Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen	14
2.2	Methoden	16
2.2.1	Gewinnung des humanen Bronchialgewebes	16
2.2.2	Präparation des Bronchialbaumes und Kultivierung der Zellen	17
2.2.3	Elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen der kultivierten Zellen	19
2.2.4	Die Proteinanalytik	20
2.2.5	Die mRNA-Analytik	24
2.2.6	Das Chlorzoxazonassay	27
2.2.7	Das Cometassay	30
2.2.8	Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Die Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen	36
3.1.1	Übersicht der gewonnenen Resektate	36
3.1.2	Die selektive Gewinnung und Kultivierung normaler humaner Bronchialepithelzellen	36
3.1.3	Charakterisierung der Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen	39
3.2	Die Expression der Cytochrom-P450-Isoformen in der Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen	41
3.2.1	Die Cytochrom-P450 <sub>2E1</sub> -Proteinexpression	41
3.2.2	Die mRNA-Expression der Cytochrom-P450-Isoformen 2E1, 2B7, 2F1 und 4B1	42

3.2.3	CYP2E1-Aktivitäten im Chlorzoxazonassay	43
3.3	Normale humane Bronchialepithelzellen in Gentoxizitätsuntersuchungen	44
3.3.1	Der Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung	44
3.3.2	Normale humane Bronchialepithelzellen im Cometassay	44
4	Diskussion	49
4.1	Die Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen	49
4.1.1	Die Materialgewinnung	49
4.1.2	Serumfreiheit als Selektionskriterium	49
4.1.3	Die Mediensupplementierung	50
4.1.4	Die Adhärenzoptimierung	52
4.1.5	Der Vergleich der Kultivierungsmethoden	53
4.1.6	Die dargebotenen Charakteristika der kultivierten Zellen	54
4.2	Die Auswertung der Cytochrom-P450-Expression der kultivierten Zellen	60
4.2.1	Die Entwicklung der Cytochrom-P450-Expression auf der Ebene der Proteine und mRNA	60
4.2.2	Der Einfluß des Cytochrom-P4502E1-Induktors Ethanol auf die Kultur	64
4.3	Bewertung normaler humaner Bronchialepithelzellen in Gentoxizitätsexperimenten	65
4.4	Schlußfolgerungen	68
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	73
7	Thesen	79
	Lebenslauf	I
	Selbständigkeitserklärung	II
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	III
	Veröffentlichungen	IV
	Danksagung	VI

## Abkürzungsverzeichnis

6-OH-CLX	6-Hydroxy-Chlorzoxazon
A	Adenin
AII	Alveolarzelltyp II
A549	pulmonale Adenokarzinomzelllinie mit AII-Zellursprung
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Kopiedesoxyribonukleinsäure
CK	Zytokeratin
CLX	Chlorzoxazon
CYP	Cytochrom P 450
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E64	Transepoxysuccinyl-l-leucylamido (4-guanidino)-butan
ECL	verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykolbis (?-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	bidestilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	destilliertes Wasser
HBS	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethansulfonsäuregepufferte Salzlösung
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

HRP	Meerrettichperoxidase
ID	Identifikationsnummer
i.p.	intraperitoneal
IPP	Immunpräzipitation
KSG	Komplexes Stoffgemisch
L	Leibovitz
LHC	Laboratorium der Humanen Karzinogenese
LMP	niedriger Schmelzpunkt
MCDB	Abteilung für Molekular-, Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität von Colorado
M-MLV	Moloney Murin Leukämie Virus
mRNA	Botenribonukleinsäure
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NEEO	Niedrige Elektroendosmose
NHBE	normales humanes Bronchialepithel
NHBEC	normale humane Bronchialepithelzellen
NHBECM	Medium für normale humane Bronchialepithelzellen
NMP	normaler Schmelzpunkt
PAc	Phenacetin
PAH	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
r.H.	relative Feuchtigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Gedächtnisinstitut
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Festphasenextraktion

T	Thymin
T <sub>3</sub>	3, 3', 5-Trijodthyronin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-?	transformierender Wachstumsfaktor ?
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X 100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
U	Umdrehungen
Univ.	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen

Physikalische Größen und ihre Dimensionen sowie chemische Formeln wurden, falls nicht ausgeschrieben, in den verbindlichen SI-Symbolen kodiert.

## 1 Einleitung

Zu der augenscheinlich vordergründigen respiratorischen Funktion des bronchopulmonalen Systems geraten die metabolischen Potenzen der Lunge neben dem Hauptstoffwechselorgan Leber zunehmend in das Blickfeld des Interesses. Es wird vermutet, daß die Leber neben gastrointestinal auch bronchopulmonal aufgenommene Fremdstoffe und Gifte in prä- oder akutreaktive Metabolite konvertiert und diese hämatogen die Lunge und deren Zellpopulationen erreichen. Für dieses Modell ist zu beachten, daß diese Metaboliten verschiedene membranöse Schranken und zahlreiche Abwehrsysteme passieren müssen, ehe sie mit den Zielstrukturen in der Zelle interagieren können, was, den hochreaktiven Charakter dieser Metabolite bedenkend, eher unwahrscheinlich ist. Diese Gifte werden lediglich in geringeren Konzentrationen bronchopulmonal inkorporiert. Wenn man im Gegensatz dazu davon ausgeht, daß diese reaktiven Metaboliten in den bronchopulmonalen Zellen selbst generiert werden, so müßten lediglich intrazelluläre Kompartimente überwunden werden, um mit Zielstrukturen wie DNA oder Proteinen zu interagieren [111]. Zweifellos werden die meisten bronchopulmonalen Gifte und Karzinogene inhalativ aufgenommen. So werden bronchopulmoepitheliale Zellen weitaus höheren Konzentrationen von Fremdstoffen ausgesetzt als Leberzellen. Es ist zu erwarten, daß das bronchopulmonale Epithel selbst einen bedeutenden Beitrag zum lokalen Fremdstoffmetabolismus leistet. Dafür spricht auch, daß viele inhalativ aufgenommene Fremdstoffe einen lipophilen Charakter haben, exemplarisch seien hier die PAH angeführt, und somit lokal eine lange Verweildauer und hohe Konzentration erzielen. Diese Wirkstoffe werden daher als Eintrittspfortenagenzien bezeichnet [22, 40]. Arbeiten an isoliert perfundierten Organen von Leber und Lunge bei Ratten zeigen für die Lunge beim Organvergleich in Bezug auf die Organmasse und die metabolisch aktiven Zellformen sogar eine höheren Substratumsatz und damit ein höheres karzinogenes Risiko als für die Leber [34,35,118,119].

Fremdstoffmetabolisierende Enzyme wie CYP2E1 katalysieren die metabolische Aktivierung von inhalativ aufgenommenen Karzinogenen wie Nitrosaminen, Benzol und niedermolekularen halogenierten Kohlenwasserstoffen, die durch Tabakrauch und zivilisationsbedingt in die Atmosphäre eingebracht werden [138]. Auch aus diesem Grunde ist das bronchopulmonale System unverändert von großer medizinischer, individualhygienischer und gesundheitspolitischer Bedeutung. Laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes aus dem Jahre 2001 ist das Bronchialkarzinom das häufigste Malignom des Mannes. Die Letalität hat sich im letzten Jahrzehnt auf hohem Niveau gehalten. Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat auch die Inzidenz bei Frauen dramatisch zugenommen. Im wesentlichen ist der Anstieg der Inzidenz bei Frauen verantwortlich für die Progression der Letalität des Bronchialkarzinoms in Deutschland. Als

der wichtigste Risikofaktor gilt hierfür das Rauchen. Klinische Studien bestätigen das wiederholt. Es wird vermutet, daß 90 % der Bronchialkarzinomerkrankungen des Mannes und 60 % der Erkrankungsfälle der Frau auf das Rauchen zurückzuführen sind. Dabei ist das Risiko, ein Bronchialkarzinom zu entwickeln, unabhängig von der Art des Tabakkonsums [126].

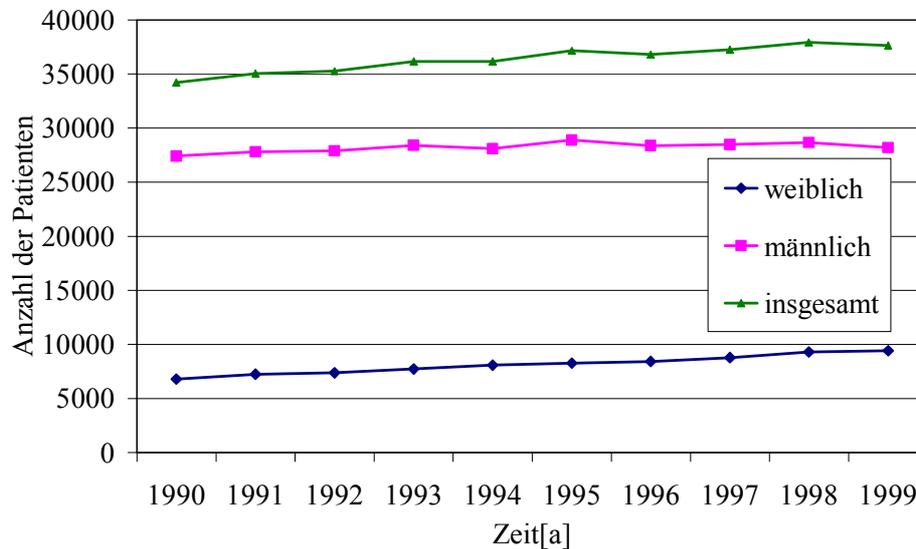


Abb.1: Dieses Diagramm zeigt die geschlechtsspezifische Letalität an Karzinomerkrankungen des Atmungssystems in Deutschland von 1990 bis 1999 [126].

Verschiedene Studien zeigen für Raucherinnen ein höheres Bronchialkarzinomrisiko als für Raucher. Raucherinnen haben in ihrem nichttumorösen Lungengewebe einen signifikant höheren Anteil an aromatischen DNA-Addukten als Raucher. Gleichzeitig zeigen Raucherinnen in ihrem nichttumorösen Lungengewebe einen signifikant höheren Anteil an CYP1A1mRNA als Raucher. Möglicherweise können Geschlechtsunterschiede in der Anzahl der DNA-Addukte durch die unterschiedliche CYP1A1mRNA-Expression erklärt werden [86].

Untersuchungen konnten eindrucksvoll zeigen, daß interspezifische Unterschiede im Fremdstoffmetabolismus existieren. Hervorzuheben ist hier vor allem die differente Expression der Enzyme der CYP2D-Familie. Während nur ein aktives humanes CYP2D6 bekannt ist, besitzen Ratten fünf bis sechs CYP2D. Diesem abweichenden Verteilungsmuster in der Enzymaktivität wird bei der Testung von Medikamenten Rechnung getragen. Bei entsprechender Fragestellung werden daher statt Ratten z.B. Beagle verwendet, da deren Enzymausstattung für CYP2D der menschlichen Situation eher gerecht wird, als die der Ratten [91].

## 1.1 Anatomisch-physiologische Aspekte des Bronchialbaumes

Das Atmungssystem umfaßt die Nase, einschließlich Nasennebenhöhlen, Pharynx, Larynx, die Trachea, die der Lappen- und Segmentstruktur der Lunge folgenden gleichnamigen Bron-

chien, die sich weiter in Bronchien und Bronchioli verzweigen und die endlich die Alveolen beschicken, wo der Gasaustausch stattfindet. In den präalveolären Strukturen erfolgt das Anfeuchten, Reinigen, Erwärmen und Verteilen der Atemluft. Im Rahmen dieser Arbeit waren die Abschnitte des Luftweges, die am Stammbronchus beginnend sich über die Lappenbronchien erstrecken, in den Segmentbronchien fortsetzen und im Bronchusbereich enden, von Interesse.

Die Stamm- und Lappenbronchien haben noch einen ähnlichen Aufbau wie die Trachea. Sie besitzen gemischte Drüsen, sogenannte Glandulae bronchiales. In der Lamina propria formiert sich die glatte Muskulatur zu einer geschlossenen Schicht. Die hufeisenförmigen Hyalinknorpelspannen werden in den kleineren Bronchien allmählich durch einzelne, kleinere und dünnere Plättchen aus elastischem Knorpel abgelöst. Dabei bleibt die zirkuläre Muskelschicht in unverminderter Stärke bestehen. Das mehrreihige respiratorische Epithel, das seinen Namen von den sich auf mehrere Reihen projizierenden Nuklei der Einzelzellen, die alle Kontakt zur Basallamina haben, geht jedoch allmählich in einschichtiges Flimmerepithel mit zahlreichen Becherzellen über [41].

Acht verschiedene Zellarten des Bronchialepithels werden histologisch unterschieden. Diese differieren nicht nur in der Ultrastruktur sondern auch in ihrer Funktion und in ihrer Sensibilität gegenüber inhalativ aufgenommenen Fremdstoffen. Folgende Zellarten werden beschrieben: zilienträgende Flimmerepithelzellen, Basalzellen, Mukogranulomzellen, neuroendokrine Zellen, Bürstenzellen und sekretorische Zellarten wie die muköse Becherzellen, Clarazellen und seröse Zellen. Außerdem ist eine Vielzahl von Mischtypen bekannt.

- Zilienträgende Flimmerepithelzellen: sind an der Basalmembran angeheftet und erstrecken sich in das Bronchiallumen. Der apikale Zellpol ist reichlich mit Mitochondrien versorgt, und die apikale Oberfläche wird von einem Zilienrasen, in den einige lange Mikrovilli eingesprengt sind, bedeckt. Der Großteil des Zytoplasma ist im Vergleich zu anderen Zellen elektronenklarer. Es werden  $10^9$  Zilien  $\text{cm}^{-2}$  im Bronchialepithel gezählt. Eine Zilie ist 5 bis 10  $\mu\text{m}$  lang und mißt im Durchmesser 0,2  $\mu\text{m}$ . Die Zilienbewegung besteht aus einem raschen Schlag, wobei an der Zilienspitze Geschwindigkeiten bis zu  $2,5 \text{ mms}^{-1}$  erreicht werden. Während des Vorwärtsschlages ist die Zilie aufgerichtet, so daß sie ein größeres Umgebungsvolumen durchläuft als bei dem langsamen, rückführenden Abrollvorgang. Es treten Schlagfrequenzen um die 30 Hz auf. Es kommt so ein Flüssigkeitsstrom in Schlagrichtung zustande, der Fremdkörper nach proximal transportiert.
- Basalzellen: kleine, abgeflachte Zellen, mit einem schmalen Zytoplasmasaum, die fest mit der Basalmembran verwachsen sind und nicht das Bronchiallumen erreichen. Das Zyto-

plasma ist reichlich mit Intermediärfilamenten gefüllt. Eine große Zahl an Desmosomen verbindet diese Zellen mit den benachbarten Epithelzellen. Die teilungsfähigen Basalzellen werden funktionell auch als Stratum generativum angesehen. Sie liefern Intermediärzellen nach, die sich weiter zu Flimmerepithelzellen differenzieren können und somit für den Ersatz abgestoßener Flimmerepithelzellen sorgen.

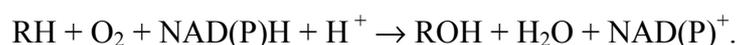
Die sekretorische Zellarten sind zu verschiedenen Anteilen über den Tracheobronchialbaum verteilt. Diese Zellen kommen als sezernierende Zellen in Betracht, da ihr Zytoplasma über eine Vielzahl sphärischer, membranverpackter Einschlüsse, die als sekretorische Granulome identifiziert wurden, verfügt.

- Muköse Becherzellen: sind angefüllt mit vielen Granulomen unterschiedlicher Elektronendichte. Der Nukleus ist im basalen Teil der Zelle zusammengepreßt und die Zellorganellen sind zwischen den Granulomen im Zytoplasma verstreut.
- Clarazellen: der Nukleus, umgeben von rauhem endoplasmatischem Retikulum, ist im basalen Teil der Zelle gelegen. Das glatte endoplasmatische Retikulum füllt mehrheitlich den apikalen Teil der Zelle aus. Mitochondrien und kleine elektronendichte Granulome sind zwischen das glatte endoplasmatische Retikulum im Bereich der Zellspitze eingestreut. Die Clarazellen sind die, möglicherweise sogar die hauptsächlichen, Zielzellen für die metabolische Aktivierung von Xenobiotika durch das CYP-Monooxygenasesystem in der Lunge.
- Seröse Zellen: der Nukleus ist im basalen Teil der Zelle gelegen. Die Zelle ist hauptsächlich von rauhem endoplasmatischem Retikulum, einem prominenten Golgiapparat und elektronendichten Granulomen ausgefüllt [39,105].

## 1.2 Das Cytochrom-P450-System

Garfinkel und unabhängig davon Klingenberg waren 1958 die Entdecker eines CO-bindenden Pigmentes aus Lebermikrosomen der Ratte, welches bei  $\lambda = 450\text{nm}$  ein Absorptionsmaximum aufweist [37,58]. Omura und Sato zeigten 1964, daß es sich bei diesem Pigment um ein Hämoprotein der Cytochrom-b-Typenreihe handelt, nachdem diese bereits 1962 nach dem Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 450\text{nm}$  den Begriff Cytochrom P450 einführten [97].

Funktionell handelt es sich um eine Monooxygenase, weil ein Atom eines Sauerstoffmoleküls in das Substrat RH eingefügt wird, wogegen das zweite Atom zu Wasser reduziert wird. Daher auch die Bezeichnung als mischfunktionelle Oxygenasen:



Körperfremde inkorporierte Substanzen werden auch Xenobiotika genannt. CYP spielen eine bedeutende Rolle im Metabolismus dieser Xenobiotika. Dieser Metabolismus verläuft in zwei Phasen:

1. Funktionalisierungsphase: aliphatische und aromatische Hydroxilierung, Epoxidierung, N- und S-Oxidation, N- und O-Desalkylierung, Desaminierung, Entschwefelung und oxidative Dehalogenierung sind Grundtypen der CYP-katalysierten Reaktionen,
2. Konjugation verschiedener funktioneller Gruppen durch entsprechende Enzyme (Transferasen).

Alle CYP enthalten am N-Terminus eine nicht abspaltbare, hydrophobe Sequenz, mit der sie in der Membran verankert sind. Sonst ist das Enzym auf der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums exponiert. Der Bereich, an dem die Hämgruppe über Cystein gebunden ist, ist hochkonserviert. Die Enzyme stehen in der Membran in Kontakt mit der NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, die ebenfalls zur Zytoplasmaseite exponiert ist. Sie setzen ganz allgemein hydrophobe Substrate um, wobei die Reaktionsprodukte häufig Substrate für die ebenfalls in den Membranen vorkommenden UDP-Glucuronyltransferasen sind. Einige CYP befinden sich an den Mitochondrienmembranen [62].

CYP sind entsprechend ihrer Sequenzhomologie in Familien und Subfamilien aufgeteilt. Besteht eine Übereinstimmung über 40% in der Aminosäuresequenz, erfolgt die Einteilung in eine Familie. Über 55% Homologie in der Aminosäuresequenz führt zur Einordnung in eine Subfamilie. Über 1200 Sequenzen der CYP sind bekannt.

Beim Menschen sind gegenwärtig 17 Familien des Cytochrome P450 Gens und 42 Subfamilien bezeichnet. Davon sind 55 sequenzierte CYP-Gene und 29 Pseudogene, Gene die ein insuffizientes Protein kodieren, beschrieben.

Die Nomenklatur der humanen CYP ist folgendermaßen festgelegt: CYP kodiert für Cytochrom P450, die erste Zahl bezeichnet die Familie, der folgende Großbuchstabe die Subfamilie des Enzyms und die letzte Zahl kennzeichnet das Einzelenzym. Wird das Gen beschrieben, kennzeichnet ein eventuell anhängiges „P“ als Pseudogen [91].

### **1.2.1 Die Cytochrom-P450-Expression der Lunge**

Im Vergleich zu dem Hauptstoffwechselorgan Leber bietet die Lunge nur einen Bruchteil der Enzymausstattung. McManus et al. zeigten, daß nur geringe Mengen CYP und entsprechende Aktivitäten in humanen Lungenproben nachweisbar waren [81]. Prough et al. demonstrierte

sehr geringe Mengen im Umfang von ungefähr 10 pmol CYP je mg Protein in humanen Lungenmikrosomen [108]. Spätere Messungen korrigierten den CYP-Gehalt in humanen Lungenmikrosomen um eine Zehnerpotenz nach unten. Wheeler und Guenther konnten nur 1 pmol je mg Protein feststellen [140].

Mutationen der CYP-Gene oder Defekte der Enzyme sind ursächlich für verschiedene Erkrankungen des Menschen, wie z.B. die Entstehung eines primären kongenitalen Glaukoms bei einem CYP1B1-Defekt. Die Induktion der Enzyme kann einen Risikofaktor für die Karzinogenese sein, da Prokarzinogene zu Karzinogenen aktiviert werden können [91].

### 1.2.2 Die Cytochrome P450 2E1, 2B7, 2F1 und 4B1 in der Lunge

CYP-Isoform	CYP2E1	CYP2B7	CYP2F1	CYP4B1
Locus ID	1571	1556	1572	1580
Position	10q24.3-qter	19q13.2	19q13.1-q13.2	1p34-p12

Tab.1: Zusammenstellung der in dieser Arbeit untersuchten CYP mit ihrer jeweiligen Genlokusidentifikationsnummer (-ID) und der entsprechenden Position auf dem Chromosom [91].

Die CYP2-Familie ist die größte CYP-Familie des Menschen. Etwa ein Drittel der CYP gehören zur CYP2-Familie. Viele dieser Proteine hydroxylieren Steroide, wobei diese CYP2-Proteine geschlechtsspezifisch exprimiert werden.

Einige Enzyme der CYP2-Familie metabolisieren Xenobiotika. Sie haben phylogenetisch die Funktion, den Umsatz von Giftstoffen, die der Organismus mit der Nahrung aufnimmt, zu beschleunigen [73].

Außer der Substratoxygenierung wird für CYP2E1 unter Sauerstoffmangel beschrieben, reduzierende Dehalogenierungen durchzuführen, die zu zytotoxischen Reaktionsprodukten führen können [23,42]. CYP2E1 bevorzugt niedermolekulare Substrate unabhängig von ihrer Struktur oder Polarität [72]. CYP2E1 ist ein konstitutives und induzierbares Enzym [95,121]. Eine ungewöhnliche Charakteristik des CYP2E1 ist dessen hervorgehobene high-spin Konfiguration, welche die Bildung von ROS nach der Induktion des Enzymes ermöglicht [101]. Deshalb ist CYP2E1 in der Lage, in Abwesenheit eines Substrates O<sub>2</sub> zu aktivieren und in den katalytischen Kreislauf einzuschleusen, wobei ein oder zwei Elektronen transferiert werden können. Abhängig von den konkreten Bedingungen entstehen verschiedene ROS, die zytotoxisch und mutagen agieren können. So kann die Induktion des CYP2E1 einmal zur Zytotoxizität oder Karzinogenität beim Versagen der verschiedenen Abwehrmechanismen führen [60].

CYP2E1-katalysierte Metabolite können zytotoxisch wirken oder DNA-Schäden verursachen. Als endogene Substrate dienen Fettsäuren und Ketonkörper. CYP2E1 ist bereits einige Stun-

den nach der Geburt transkriptionell aktiviert. Xenobiotika wirken doppelt, in dem sie die translatorische Effizienz erhöhen und die Degradation des Proteins inhibieren. CYP2E1-mRNA- und Enzymgehalt werden als Antwort auf pathophysiologische Bedingungen verändert, die durch Hormone, wie Insulin, Glukagon, Wachstumshormone und Leptin und durch Wachstumsfaktoren, wie den epidermalen und hepatozytären Wachstumsfaktor gesteuert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, daß CYP2E1 unter fester homöostatischer Kontrolle liegt [94].

CYP2E1 ist vermehrt induziert bei Ketonämie, bei Diabetikern, beim Fasten, bei fettreicher Ernährung, bei Adipositas oder nach Hypophysektomie [73].

Für CYP2E1 sind sehr viele Substrate bekannt, die es metabolisieren kann. In Tab.2 sind einige Repräsentanten aufgeführt.

Stoff	Substrat	Induktor	Karzinogen
Ethanol	+	+	
Methanol	+	+	
n-Propanol		+	
Ethanal	+	+	
Azeton	+	+	
Diehylether	+	+	
Benzol	+	+	+
Styrol	+	+	+
Tetrachlormethan	+		+
Trichlormethan	+		+
Dichlormethan	+		+
Vinylchlorid	+		+
Isoniazid	+	+	
Paracetamol	+		+
Chlorzoxazon	+		
Dimethylsulfoxid		+	
Dimethylnitrosamin	+		+
Diethylnitrosamin	+		+

Tab.2: Zusammenfassung der wesentlichen Substrate und Induktoren des CYP2E1. CYP2E1-vermittelte karzinogene Wirkstoffe sind ebenfalls aufgeführt [73].

Ein kompetitiver spezifischer Inhibitor des CYP2E1 ist Disulfiram und unspezifische Inhibitoren sind Diallylsulfid und Diallylsulfonepoxid [33,73].

Es wird für CYP2E1 eine Verbindung zur Entstehung von mit dem Rauchen assoziierten nasopharyngealen Karzinomen in Betracht gezogen [73].

Das CYP2E1-Gen umfaßt 11413 Basenpaare. Es beinhaltet 9 Exons. Es werden z.Zt. mindestens 13 Allele des CYP2E1 beschrieben. Das CYP2E1-Protein ist 46 kD schwer [135].

28 Patienten wurden auf ihre CYP2E1-Expression durch eine immunhistochemische Färbung im Tumor- und gesunden Bronchialgewebe untersucht. Seromuköse Drüsen zeigten in 19 und

das bronchiale Gewebe in 18 Fällen eine CYP2E1-Expression. In Bronchialkarzinomen von 13 Patienten ließen sich CYP2E1-Expressionen nachweisen. 11 von diesen Patienten zeigten auch im Normalgewebe CYP2E1. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der CYP2E1-Expression im Vergleich zwischen den pathohistologischen Diagnosen Adeno- und Plattenepithelkarzinom. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der CYP2E1-Expression im Vergleich zwischen Tumor- und gesunden Bronchialgewebe [57].

Material von Bronchiallavagen und -biopsien von Nichtrauchern wurde auf das Vorhandensein von CYPmRNA untersucht. Bei der RT/PCR dieses frisch gewonnenen Zellmaterials waren CYP1A1, CYP1B1, CYP2B7, CYP2E1, CYP2F1 und CYP4B1 nachweisbar [142].

Den Metabolismus von Benzol auf die in dieser Arbeit untersuchten CYP haben Powley und Carlson in Mikrosomenpräparationen von Leber und Lunge bei Mensch, Ratte und Maus untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß CYP2B und möglicherweise auch CYP2F nur eine marginale Rolle spielen, wogegen CYP2E1 den Hauptumfang des Benzols biotransformiert [107].

CYP2B6- und CYP2B7mRNA wurde in der humanen Lunge bereits nachgewiesen [43].

Bei der Detektion von CYP2B7mRNA in der Bronchiallavage und in Zelllinien konnte keine Korrelation zu Rauchgewohnheiten der Probanden festgestellt werden [143].

CYP2F1 ist das einzige Enzym, daß aus der CYP2F-Subfamilie beim Menschen exprimiert wird. CYP2F1 aktiviert den Lungenschadstoff 3-Methylindol. Andere katalytische Funktionen des Enzymes sind noch weitgehend unverstanden [134].

Die CYP4-Familie metabolisiert körpereigene Substrate. Die CYP4 sind in den Arachidon-, Leukotrien- und Fettsäurestoffwechsel integriert. Ein im Tiermodell beschriebener Einfluß eines Peroxisomenproliferationsrezeptors auf die Regulation der CYP4-Familie konnte bislang für den Menschen nicht nachgewiesen werden. Das CYP4B1 wurde in der humanen Lunge und in der Plazenta des Menschen detektiert [27]. Das CYP4B1-Gen umfaßt  $\approx 2 \times 10^4$  Basenpaare [46].

### **1.3 Das Cometassay**

Der Mensch ist meist berufs- und umweltbedingt gegenüber Stoffgemischen und nicht gegenüber Einzelsubstanzen exponiert. In vielen alltäglichen Bereichen, wie dem Arbeitsumfeld, dem Haushalt oder auch in der Freizeit, ist der Mensch derartigen Expositionen ausgesetzt.

Deponieausgasungen, Dieselabgase und wie bereits angeführt der Zigarettenrauch sind Beispiele für Stoffgemische, deren exakte Zusammensetzung teilweise noch ungeklärt ist.

Aus der Arbeit des Verbundprojektes „Gesundheitliche Risiken durch Plasmaätzprozesse in der Halbleiterindustrie“ wurde ein KSG übernommen, das als Abprodukt bei Plasmaätzprozessen in der Halbleiterindustrie entstand [9]. Das Projekt umfaßte zwei Teilgebiete, in denen die Abprodukte chemoanalytisch sowie gen- und toxikologisch untersucht wurden. Das ausgewählte Gemisch, welches sich aus einer Vielzahl von halogenierten Kohlenwasserstoffen zusammensetzt, soll beispielhaft für ähnliche komplexe Stoffgemische stehen [10].

Abprodukte gelangen kaum in die Umwelt, da moderne Plasmaätzanlagen geschlossene Systeme sind. Allerdings bedürfen auch diese Systeme regelmäßiger Wartungsarbeiten und sind von Havariesituationen nicht ausgeschlossen. Hier liegen die potentiellen gesundheitlichen Gefahren für den Menschen, da die angegebenen Expositionsrisiken vor allem eine inhalative Inkorporation dieses KSG nach sich ziehen [8,117].

Bei den analytisch erfaßten organischen Verbindungen dieses KSG handelt es sich um hoch- oder perchlorierte, teilweise stickstoffhaltige Kohlenwasserstoffe. Es waren aliphatische offenkettige und zyklische, gesättigte und ungesättigte, aromatische und heterozyklische Verbindungen, häufig mit stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen, nachweisbar. Als organische Leitsubstanzen wurden Pentachlorpropionitril und Hexachlorbenzol beschrieben. Weiterhin wurden in höheren Konzentrationen Chloroform, Trichloracrylnitril, Dichlormethoxytriazin, Hexachlormethylpyrazin, Octachlorcyclopentan sowie 60 weitere chlorierte Verbindungen dargestellt [9].

Nur wenige Verbindungen des KSG sind toxikologisch gut charakterisiert, zur Mehrzahl der Verbindungen liegen keine Angaben vor. Die bisher untersuchten halogenierten Kohlenwasserstoffe wurden als Einzelkomponenten untersucht. Daten zu komplexen Stoffgemischen stehen bislang kaum zur Verfügung [9,10].

Für halogenierte Kohlenwasserstoffe sind u. a. Leberschädigungen, Nervenschädigungen sowie kanzerogene und mutagenen Wirkungen als akute und chronische Verläufe bekannt. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde dokumentiert, daß die Vielstoffgemische aus Plasmaätzprozessen über ein schwaches bis mittleres allgemeintoxisches und über ein erhebliches gentoxisches und embryotoxisches Potential verfügten [7,9,11,117].

Im Tierexperiment wurden toxikologische Untersuchungen der Targetorgane Leber, Herz, Lunge, Niere und Magen durchgeführt. In gentoxikologischen Experimenten wurden an Eukaryoten Schwester-Chromatid-Austausche, Chromosomenaberrationen und die Mikrokernraten in polychromatischen Erythrozyten der Ratte untersucht und der Flügelmosaiktest an *Drosophila* durchgeführt. Die Genmutationsraten bei Prokaryoten wurden im AMES-Test erfaßt [7,9,10]. Aus den vorliegenden chemoanalytischen Daten sind diese Wirkungen der

Gemische nicht ohne weiteres erklärbar. Die Wirkschwellen für toxische Effekte der Verbindungen mit bekannter Wirkung liegen z. T. erheblich oberhalb der analytisch nachgewiesenen Werte.

Bei der Exposition gegenüber Stoffgemischen treten häufig Kombinationswirkungen auf. Die Vielzahl der im Gemisch nachgewiesenen Komponenten und die chemoanalytische Zusammensetzung lassen Interaktionen beim vorliegenden Gemisch mit großer Sicherheit erwarten. Dabei sind folgenden Möglichkeiten denkbar: die einzelnen Verbindungen beeinflussen sich in keiner Weise, d. h., sie wirken unabhängig voneinander, sie wirken antagonistisch oder sie wirken synergistisch [87].

1984 wurde von Östling und Johanson zum ersten Mal die Methode der Einzelzellgelelektrophorese publiziert [98]. Wegen seiner Sensitivität, seiner Einfachheit in der Durchführung, der Unabhängigkeit von Zellzyklen und der Eignung von allen kultivierbaren Zellsystemen findet der Test häufig Anwendung [96,106,114]. Vorteilhaft ist die Möglichkeit, Effekte an Einzelzellen beobachten zu können und dadurch relativ wenig Zellmaterial zu benötigen.

Das in dieser Arbeit verwendete alkalische Cometassay dient zum Nachweis von Chromosomeneinzelstrangbrüchen, zu einem geringen Prozentsatz auch von Chromosomendoppelstrangbrüchen und stellt einen Indikatortest für die Gentoxizität dar.

In eukaryotischen Zellen liegt die DNA supercoiled im Zellkern vor. Das Supercoiling wird durch Einzelstrangbrüche in der DNA aufgelöst, die eine Entspannung der DNA induzieren. Da es im alkalischen Milieu zur Aufspaltung der komplementären Basenpaarung kommt, können sich die DNA-Fragmente im elektrischen Feld bewegen und die Einzelstrangbrüche werden detektierbar.

Nach Zellyse, Relaxationszeit und Elektrophorese wird die DNA durch Anfärbung mittels eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes, z. B. Ethidiumbromid, im Fluoreszenzmikroskop in Form eines Kometen sichtbar [87].

1997 beschrieb Yendle Faktoren, die Einfluß auf die Länge der Kometenschweife nehmen können und die die Ergebnisse bei falsch gewählten Methodenansätzen beeinflussen bzw. verfälschen können. Hinweise wurden vor allem zur Relaxationszeit der DNA gegeben [148].

#### **1.4 Zielstellung**

Es bestand die Aufgabe, eine Kultur von NHBEC zu etablieren. In Bezug auf die Fremdstoffmetabolisierung stellt die Lunge ein potentiell Filterorgan für inhalativ aufgenommene und systemisch anfallende Fremdstoffe dar. Um Aussagen für den humanen Organismus zu erhalten, wurden tierexperimentelle Daten sowie an humanen immortalisierte Zelllinien oder an hu-

manen Nativgeweben gewonnene Ergebnisse interpretiert. Daten für humane Primärkulturen sind in der Literatur selten. Für diese Arbeit mußte daher ein geeignetes Modellsystem etabliert werden. Neben der Erstellung einer Kultur von NHBEC mußte der bronchoepitheliale Charakter dieser Kultur demonstriert werden.

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen am Beispiel der mRNA- und Proteinexpression des CYP2E1 und der mRNA-Expression der CYP2B7, 2F1 und 4B1. Hier interessierte die Nativexpression und vor allem die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme im Kulturverlauf normaler humaner Bronchialepithelzellen. Die Aktivität des CYP2E1 sollte im Rahmen eines Funktionsassays nachgewiesen werden, bei dem der CYP2E1-spezifische Umsatz von CLX in 6-OH-CLX ausgenutzt wird. Außerdem war eine Aussage darüber zu treffen, wie sich NHBEC in spezifischen Versuchsanordnungen am Beispiel des Cometassays bewähren, die umwelttoxikologische Fragestellungen betreffen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

##### 1. Reagenzien für die Organpräparation und Zellkultur

L 15 (Seromed), MCDB 153 (Seromed), DMEM (Gibco), RPMI 1640 (Gibco), epith-o-ser<sup>®</sup> (CC-Pro), BSA (Sigma), FKS (CC-Pro), Humanserum (Sigma), Penicillin/Streptomycin (Serva), Gentamycin (Seromed), Amphotericin B (Sigma), L-Glutamin (Sigma), Insulin (Sigma), Rinderhypophysenextrakt (Sigma), Hydrokortison (Sigma), T<sub>3</sub> (Sigma), EGF (Sigma), Retinolsäure (Sigma), Transferrin (Sigma), Epinephrin (Sigma), Phosphoethanolamin-Lösung (Seromed), Ethanolamin-Lösung (Seromed), Isopropanol (Merck), PBS Dulbecco (Seromed), Trypsin 0,25% (Sigma), Trypsininhibitor II S (Sigma), Elastase (Sigma), DNase (Sigma), Percoll (Pharmacia), Collagen R (Sigma), Fibronectin (Sigma)

##### 2. Reagenzien für die Westernblot- und RT/PCR-Analytik

Polyacrylamid (Bio-Rad), SDS (Böhringer Mannheim), TEMED (Sigma), APS (Sigma), PVDF-Membran (Millipore), Whatmanpapier 3MM (Whatman), Coomassi-Färbung (Serva), Tween 20 (Sigma), Glycin (Roth), Rainbow-Marker (Amersham), Trizol<sup>®</sup> (Gibco), NEE0 (Roth)

##### 3. Reagenzien für den CLX-Assay

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O (Merck), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (Merck), Pac (Aldrich), Glucose-6-phosphat (Böhringer Mannheim), Glucose-6-phosphatdehydrogenase (Böhringer Mannheim), CLX (Aldrich), 6-OH-CLX (Ultrafine), NADP<sup>+</sup> (Sigma), BSA (Sigma)

##### 4. Reagenzien für die Gentoxizitätsuntersuchungen

NMP- (Serva), LMP-Agarose (SeaPlaque<sup>®</sup> FMC BioProducts), CaCl<sub>2</sub> (anhydr.) (Sigma), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Jenapharm), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), KCl (Merck), MgCl<sub>2</sub> (Merck), MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (Aldrich Chemical Co.Ltd.), MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (Sigma), NaCl (Roth), NADP (Serva), Na-EDTA (Aldrich Chemical Co.Ltd.), NaOH (Chemapol), Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Merck), Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (Merck), Na-Sarconisat (Merck-Schuchardt), Tris (Paesel+Lorei GmbH), Triton X-100 (Sigma), Trypanblau (Seromed), Ethidiumbromid (Sigma), DMSO (Serva), Erdnußöl (Universitätsapotheke), Ethanol (Merck), Methanol (Merck), Glucose (Serva), Glucose-6-Phosphat (Serva), L-Glutamin (Sigma)

## 2.1.2 Antikörper, Antigene und Primer

### 1. Antikörper

- Antihuman Zytokeratin, Quelle: Maus, Klon: MNF116, Hersteller: DAKO
- Antihuman Zytokeratin 8/18, Quelle: Maus, Klon: 5D3, Hersteller: Novocastra
- Antivimentin, Quelle: Maus, Klon: V9, Hersteller: DAKO
- Biotinylated Anti-Mouse Sekundäntikörper H+L, Quelle: Pferd, Hersteller: Vector
- Antihuman CYP 2E1-Antikörper, Polyklonaler Antikörper, keine Kreuzreaktivität zu anderen CYP-Isoformen, Immunogen: Ratten-CYP 2E1, Quelle: Ziege, Hersteller: Daiichi Pure Chemicals Co., Lieferant: Gentest Co.
- CK18 Monoklonaler Antikörper IgG<sub>1</sub>, Quelle: Maus, Lieferant: Santa Cruz Biotechnology Inc.
- CK19 Monoklonaler Antikörper IgG<sub>1</sub>, Quelle: Maus, Lieferant: Santa Cruz Biotechnology Inc.
- Anti-Ziege-Sekundäntikörper, HRP-konjugiert, zur Verfügung gestellt durch Dr. Dieter Runge
- Anti-Maus-Sekundäntikörper, HRP-konjugiert, zur Verfügung gestellt durch Dr. Dieter Runge

### 2. Antigene der Positivkontrollen

- Humanhepatozyten HH 660, 1.d (= erster Kulturtag), 8.d (= achter Kulturtag), CK- und CYP2E1-positiv, Alter: 2 a, Geschlecht: männlich, Todesursache: Tod durch Ertrinken, zur Verfügung gestellt durch Dr. Dieter Runge
- Human CYP2E1-Mikrosomen, Lieferant: Gentest Co.

### 3. Primer

- CYP2B7 oberer 5'GGA ACT TCG GAA ATC CAA GG 3'  
unterer 5'CCA TGT GGA GCA GGT AGG TG 3'
- CYP2E1 oberer 5'CCT TCC TCC TGC TGG TGT CC 3'  
unterer 5'GCC GGA TGT CCT TCC AGG TA 3'
- CYP2F1 oberer 5'GGG GAA GAG AAG CAT TGA GG 3'  
unterer 5'GCC TGG TGG TCG TGG ACG CT 3'
- CYP4B1 oberer 5'TTC TCC TCC TTG GGC CTG TGG 3'  
unterer 5'AGC AGG CCT CTC CCA ATC CAC 3'
- $\beta$ -Actin oberer 5'ACG GCT CCG GCA TGT GCA AG 3'  
unterer 5'TGA CGA TGC CGT GCT GCA TG 3'

### 2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Präparierbesteck (Aesculap), 4-0 Prolene (Ethicon), Reaktionsgefäße (Eppendorf), Zentrifugenröhrchen (Greiner), Kulturschalen (Nunc), Lab-Tek II chamber slide system (Nunc), Einmalkunststoffpipetten (Greiner), Sterilfilter (Sartorius), 60µm und 250µm Nylonnetze (Kranich), Kühlschrank (Nunc), Parafilm (Roth), Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Assistent), Objektträger: speziell rauh geschliffen (Menzel), Pipettus (Witteg), Dewargefäß (Roth), Kühltasche mit Kühlakkumulatoren (Roth), Mikrowelle (Deawoo), Schlauchpumpe (Schütt), Magnetrührer (Schütt), Wärmebad mit rotierendem Boden (Schütt), Ultrathurrax: T25 (Janka & Kunkel), Sicherheitswerkbank: Hera Safe, Lamin Air HB 2448 (Heraeus), Taumelscheiben: Rocky 3D (Fröbel-Labortechnik), Heidolph Polymax 1040 (Schmitt), Brutschrank: Function Line (Heraeus), Biocenter 2001, Inkubator OV5 (Biometra), Transferkammer T22 tankblot (Biometra), Zentrifugen: CS-15R (Beckman), Biofuge fresco, Biofuge 13, Megafuge 1.0R (Heraeus), Elektrophoresekammer: Horizontal-Midi-Gel Molecular-Bio-Products (Biotech-Fischer), Netzteile: Biometra, Phero-STAB 0652 Biotech-Fischer, Dunkelkammersystem (raytest), RT-PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf), Stereolichtmikroskop (Zeiss), Axioskop 20 mit Auflichtfluoreszenz (Zeiss), Filmkassette (Kodak), Hyperfilm ECL (Amersham), Entwickler (Kodak), Fixierer (Kodak), ECL-Kit (Amersham), Folie Saran (Dow), Photometer Microplate Reader Benchmark (Bio-Rad), Spektrophotometer mit Software UV-WinLab, Lambda 14 (Perkin Elmer), Spektrophotometer DU 7500 (Beckman), Branson B 15 cell disruptor (Branson), HPLC 1100er Serie (Hewlett-Packard), ENVI-18 endcapped Säulen (Supelco), Hypersil ODS Vorsäule (Knauer), Hypersil ODS C18 Säule (Hewlett-Packard), 1040A HPLC Diodenreihendetektor (Hewlett-Packard), Nitrozellulosestreifen (Bio-Rad), beheizbare Umwälzpumpe (Schütt), Silikonschläuche mit Verbindern (Schütt), Wärmetauscher (Universitätsglasbläser), Doppelmantelgefäß (Universitätsglasbläser)

### 2.1.4 Medien zur Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen

#### 1. Zelllinienmedium

Als Basismedium diente DMEM. Es wurden  $580\text{mg l}^{-1}$  L-Glutamin und  $3,7\text{g l}^{-1}$  Natriumbicarbonat ergänzt, durch Begasung mit  $\text{CO}_2$  der pH auf 7,4 justiert, das Medium sterilfiltriert und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Zum Gebrauch wurden 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Pen/Strep zugefügt.

#### 2. Humanes AII-Medium

Als Basismedium diente DMEM. Es wurden  $2\text{mM}$  L-Glutamin,  $2,5\mu\text{g ml}^{-1}$  Amphotericin B und  $10\mu\text{g ml}^{-1}$  Gentamycin ergänzt, durch Begasung mit  $\text{CO}_2$  der pH auf 7,4 justiert, das

Medium sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Zum Gebrauch wurden 10% Humanserum und 1% Pen/Strep zugefügt.

### 3. NHBECM

Als Basismedium diente MCDB 153 [16]. Hier handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Medium, daß den empfohlenen Aminosäure- und Salzkonzentrationen des LHC-9 ähnelt. Zur Erzeugung des NHBECM war vorbereitend die Herstellung der Stammlösungen notwendiger Ingredienzien unter der Sterilbank erforderlich:

- Insulin-Stammlösung: 30 mg Insulin wurden in 15 ml 4 mM HCl gelöst, die aliquotierte Stammlösung wurde bei 4°C gelagert.
- Hydrokortison-Stammlösung: 72 mg Hydrokortison wurden in 20 ml 95 %-igem Ethanol gelöst, die aliquotierte Stammlösung wurde bei 4°C gelagert.
- EGF-Stammlösung: 100 µg EGF wurden in 2 ml BSA und 18 ml HBS gelöst, die aliquotierte Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.
- Transferrin-Stammlösung: 50 mg Humantransferrin wurden in 1 ml BSA und 9 ml HBS gelöst, anschließend sterilfiltriert, die aliquotierte Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.
- Epinephrin-Stammlösung: 10 mg Epinephrin wurden in 10 ml einer 10 mM HCl-Lösung gelöst, die aliquotierte Stammlösung wurde bei -70°C gelagert.
- Retinolsäure-Stammlösung: 20 mg Retinolsäure wurden in 20 ml DMSO gelöst, die aliquotierte Stammlösung wurde bei -70°C in Aluminiumfolienwickel gelagert.
- T<sub>3</sub>-Stammlösung: 13 mg T<sub>3</sub> wurden in 20 ml 50 %-igem n-Propanol gelöst, die aliquotierte Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

Zu 500 ml MCDB 153 werden folgende Substanzen in der folgenden Reihenfolge zugesetzt und mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt:

1. 439,761 mg L-Glutamin
2. 1,25 ml Insulin-Stammlösung
3. 0,1 ml Hydrokortison-Stammlösung
4. 0,5 ml EGF-Stammlösung
5. 1 ml Transferrin-Stammlösung
6. 1,25 µl Phosphoethanolamin-Lösung: Die Lagerung der handelsüblichen Lösung erfolgte bei 4°C.
7. 1,25 µl Ethanolamin-Lösung: Die Lagerung der handelsüblichen Lösung erfolgte bei 4°C.
8. 0,25 ml Epinephrin-Stammlösung
9. 0,05 ml Retinolsäure-Stammlösung

10. 5 µl T<sub>3</sub>-Stammlösung

11. 25 mg Gentamycin

12. 22,5 mg Rinderhypophysenextrakt

Die Einstellung des Mediums auf einen pH = 7,4 erfolgte durch Begasung mit CO<sub>2</sub>. Nach einer Sterilfiltration portionierte man das Medium in sterilen 250 oder 500 ml-Flaschen.

#### 4. Beschichtungsmedium für die Kulturschalen

Das Beschichtungsmedium wurde auf Basis des L 15-Mediums hergestellt [71]. 100 ml L15-Medium wurden 1 mg Fibronectin, 3 mg Collagen R und 1 mg BSA zugesetzt. Dann sterilfiltrierte man das Medium. Es konnte nun bei 4°C gelagert werden, oder es wurde gleich zur Beschichtung der Kulturschalen verwendet. Die Kulturschalen wurden unter der Sterilbank mit 0,2 mlcm<sup>-2</sup> Beschichtungsmedium gefüllt. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 24h bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % r.H. Danach wurde das überschüssige Beschichtungsmedium abgesaugt, und der den Kulturschalenboden bedeckende Feuchtigkeitfilm bekam Gelegenheit anzutrocknen. Jetzt konnten die Kulturschalen beschickt oder in Aluminiumfolie verpackt bei 4°C gelagert werden. Die Kulturschalen waren in dieser Form sechs Wochen lagerbar.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung des humanen Bronchialgewebes

Das Gewebe zur Anlage einer Kultur von NHBEC gewann man aus Resektaten von Patienten, die sich auf Grund eines Bronchialkarzinomes, pulmonaler Metastasen eines extrabronchopulmonalen Primärkarzinomes oder einer inflammatorischen Genese einer Lob- oder Pneumektomie unterziehen mußten.

Nach der Absetzung der Lunge oder des Lungenlappens durch den Operateur wurde das Resektat im Operationssaal auf ein Abdecktuch gebettet und der zentrale Bronchialbaum mit Hilfe eines entsprechenden Operationsbesteckes, welches die Instrumentierende anreichte, präpariert. Es wurde ein hinreichender Abschnitt des Bronchus distal des Absetzungsrandes und proximal des Tumors entnommen. Die Präparation erfolgte unter sterilen Kautelen.

Die Lunge oder der Lungenlappen sowie der Absetzungsrand wurden der weiteren pathohistologischen Diagnostik zugeführt.

Der entnommene Bronchus wurde in eiskaltem PBS dreimal gewaschen. Zur Nativdiagnostik frostete man einen Teil des Materials in flüssigem Stickstoff ein, welcher in einem Dewargefäß mitgeführt wurde. Der andere Teil wurde in eiskaltes L 15- Medium getaucht. Der Trans-

port des Bronchus in das Institut erfolgte in einer Kühltasche, die mit tiefgekühlten Kühlakkumulatoren bestückt war.

## 2.2.2 Präparation des Brochialbaumes und Kultivierung der Zellen

Unter einer Sicherheitswerkbank erfolgte die weitere Aufarbeitung. Die Skelettierung des Bronchus wurde mit einem Präparierbesteck komplettiert, wobei sorgfältig die Stromareste entfernt wurden.

Alle Präparationstechniken wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 1. Modifizierte Methode nach Dobbs et al. [30]:

Zuerst fragmentierte man den gewonnenen Bronchus in 5-10 mm<sup>2</sup> große Stücke und wusch diese in eiskaltem PBS. PBS wurde als gebrauchsfertiges Salzgemisch bezogen, entsprechend aufgelöst, autoklaviert und portioniert. Um interzelluläre und epithelolaminäre Verbindungen zu trennen, wurden die Fragmente für 30 min in 15 ml Trypsinlösung, die gebrauchsfertig bezogen wurde, bei 37°C in einem Wärmebad mit rotierendem Boden inkubiert. 15 ml Trypsin-inhibitor wurden zur Beendigung der enzymatischen Epithelzelladhäsion appliziert. 500 mg Trypsininhibitor wurden in 100 ml DMEM gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Anschließend erfolgte unter Stereolichtmikroskopie eine weitere mechanische Destromierung. Zur interzellulären Adhäsion inkubierte man das Gewebe in 20 ml DNase250-Lösung 10 min im Schüttelwärmebad.

DNase250-Lösung	DNase50-Lösung
75 % (v/v) PBS	20 % (v/v) DNase250-Lösung
0,025 % (w/v) DNase	60 % (v/v) PBS
25 % (v/v) FKS	20 % (v/v) FKS
10 I.E. Pen/Strep	10 I.E. Pen/Strep

Zum weiteren mechanischen Aufschluß passagierte man durch zwei Netze von 250 und 60 µm Porengröße, wobei die Gewebefragmente mit einer Pipette gegen das Netz gerieben wurden. Während der Netzpassage wurde mit DMEM gespült und die resultierende Zellsuspension für 8 min bei 140xg zentrifugiert. Das Pellet resuspendierte man in 10 ml DMEM. Zur Selektion der NHBEC wurde die Zellsuspension über einen Percollgradienten mit 250xg über 30 min ungebremst zentrifugiert.

Percoll (pH = 7,4)	hohe Dichte	niedrige Dichte
	61,28 % (v/v) Percoll	25,9 % (v/v) Percoll
	9,44 % (v/v) PBS	9,52 % (v/v) PBS
	4,72 % (v/v) FKS	4,76 % (v/v) FKS

Die in der Grenzschicht angereicherten Zellen wurden erneut zur interzellulären Adhäsion in 3 ml DNase50 und 5 ml DMEM 5 min inkubiert. Wieder wurde für 8 min bei 140xg zentrifugiert. Die Zellen wurden im Zelllinienmedium aufgenommen, ausplattiert und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % r.H. in einem Brutschrank kultiviert.

## 2. Modifizierte Methode nach Robinson et al. [113]:

### Elastaseperifusionslösung

430 I.E. Elastase vom Schweinepankreas in 100 ml PBS

Der Bronchialbaum wurde zuerst mit einem lumenentsprechenden Schlauchverbinder kanüliert. Eine Dichtepfung mit PBS schloß sich an. Eventuell vorhandene Leckagen wurden mit einer 4-0 Prolenenaht abgedichtet. Der kanülierte Bronchus wurde im Inneren eines Glastrichter befestigt und dieser Trichter mit der Spitze nach oben auf das mit der Elastaseperifusionslösung gefüllte Doppelwandgefäß gestülpt, so daß die Verdunstungs- und Wärmeverluste reduziert werden konnten. Das Doppelwandgefäß wurde durch eine beheizbare Wasserpumpe auf 37°C erwärmt. Die Elastaseperifusionslösung wurde durch einen Silikonschlauch, der das Doppelwandgefäß über die Trichterspitze verließ, m.H. einer Rollerpumpe abgesaugt. Die Lösung wurde über einen im Gegenstromprinzip betriebenen Wärmetauscher, der ebenfalls durch die beheizbare Wasserpumpe erwärmt wurde, über ein kurzes Schlauchstück dem kanülierten Bronchus zugeführt. Nach der Bronchuspassage floß die Elastaseperifusionslösung zurück in das Doppelwandgefäß, und ging erneut in den Kreislauf. Die Perifusion dauerte 20 min. Die Betriebstemperatur von 37°C wurde regelmäßig kontrolliert. Im Anschluß wurde der Bronchus fragmentiert. Es folgten zwei Netzpassagen mit 250 und 60 µm Porengröße, wobei die Gewebefragmente mit einer Pipette gegen das Netz gerieben wurden. Während der Netzpassage wurde mit DMEM gespült und die resultierende Zellsuspension 8 min bei 200xg zentrifugiert. Das Pellet resuspendierte man in 10 ml DMEM. Zur Selektion der NHBEC wurde die Zellsuspension über einen Percollgradienten 20 min bei 200xg ungebremst zentrifugiert. Es fand der gleiche Percollgradient wie bei der modifizierten Präparationsmethode nach Dobbs et al. Anwendung [30]. Die in der Grenzschicht angereicherten Zellen wurden zur interzellulären Adhäsion in 3 ml DNase50 und 5 ml DMEM 5 min inkubiert. Wieder wurde für 8 min bei 200xg zentrifugiert. Die Zellen wurden in Humanem AII-Medium aufgenommen, ausplattiert und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % r.H. in einem Brutschrank kultiviert.

## 3. Modifizierte Methode nach Lechner et LaVeck [68]:

Zuerst erfolgte die Fragmentierung der Bronchuswand in 5-10 mm<sup>2</sup> große Stücke. Die epitheliale Schicht der Fragmente des proximalen Bronchialbaumabschnittes wurde von ihrer

Unterlage gelöst. Bei distalen Bronchialbaumabschnitten, wo eine mechanische Destromierung technisch nicht gelang, wurde die Bronchuswandarchitektur belassen. Erneut wurde dreimal in PBS gewaschen. Jetzt wurden sechs bis acht Epithelstücke in einer 60 mm-Ø-Kulturschale, die mit einer Haftmatrix beschichtet war, ausgelegt, mit dem Deckel verschlossen und einer fünfminütigen Adhäsionsphase ausgesetzt. Es wurden 4 ml NHBECM zugesetzt. Die Auswachskultur lagerte bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % r.H. in einem Brutschrank. Medienwechsel erfolgte bedarfsgerecht in zwei- bis dreitägigem Rhythmus.

Die Kultur stand nun zu Versuchszwecken bereit oder konnte, wenn kein vitales Zellmaterial notwendig war, eingefroren werden. Zum Zwecke des Einfrierens wurden die Kulturschalen mit Aluminiumfolie ummantelt, mit einem Folienschreiber gekennzeichnet und in ein bereitgestelltes Dewargefäß, das mit flüssigem Stickstoff gefüllt war, getaucht. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zum Splitten von subkonfluenten Monolayern wurde unter der Sicherheitswerkbank die Kulturschale mit 1,5 ml Trypsinlösung, die auf 37°C erwärmt wurde, für 5 min inkubiert. Die Digestion wurde durch Zugabe von 4,5 ml kalten PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 125xg zentrifugiert, das Pellet in NHBECM resuspendiert und die Zellen in beschichteten Kulturschalen ausplattiert.

### **2.2.3 Elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen der kultivierten Zellen**

#### **1. Elektronenmikroskopische Untersuchung der NHBEC**

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von Herrn Prof. Dr. Holzhausen im Institut für Pathologie der Univ. vorgenommen. Zur elektronenmikroskopischen Diagnostik ließen wir die Zellen in gekammerten Objektträgern auswachsen. Diese wurden vorher nach dem gleichen Regime wie die Kulturschalen beschichtet. Die Bronchialepithelstücke wurden nach dem Erreichen der Subkonfluenz von den Objektträgern entfernt. Die Objektträger wurden Herrn Prof. Dr. Holzhausen zur Auswertung übergeben.

#### **2. Immunhistochemische Untersuchungen der NHBEC**

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Bahn im Institut für Pathologie der Univ. geleistet. Zur immunhistochemischen Diagnostik ließen wir die Zellen in gekammerten Objektträgern auswachsen. Diese wurden vorher nach dem gleichen Regime wie die Kulturschalen beschichtet. Die Bronchialepithelstücke wurden nach dem Erreichen der Subkonfluenz von den Objektträgern entfernt. Die Zellkultur wurde mit PBS gewaschen und in 70%-igem Ethanol für 5min fixiert. Erneut wurde mit PBS gewaschen und mit den

primären Antikörpern Antihumanzytokeratin, Antizytokeratin 8/18 und Antivimentin für 50 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaliger Spülung mit PBS wurde für 30 min der sekundäre Antikörper zugefügt. Für weitere 30 min wurde der Avidin-Biotin-Complex inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ AEC unter Sichtkontrolle. Daran schloß sich bedarfsgemäß eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin an.

## 2.2.4 Die Proteinanalytik

### 1. Proteinassay für Gesamtzelllysate mit dem BCA-Assay

IPP-Puffer: Zum aktuellen Gebrauch wurde je 100 ml IPP-Puffer ein Proteaseinhibitorgemisch zugegeben:

1 %-iges Triton X-100	1 mg Aprotinin	
150 mM NaCl	1 mg Antipain	
10 mM EDTA	1 mg Leupeptin	4 µM Phenanthrolin
1 mM EGTA	1 mg Pepstatin	4 µM PMSF
	1 mg E64	und 4 µM Natriumvanadat.

Nativgewebe mußte im Ultrathurrax unter IPP-Pufferschutz zerkleinert, suspendiert und in Reaktionsgefäße überführt werden. Tiefgefrorene Zellkulturen wurden unter IPP-Puffer auf Eis aufgetaut, abgeschabt und in Reaktionsgefäße überführt. Bei 4°C wurden die Probengefäße 20 min bei 13000 Umin<sup>-1</sup> zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Das Pellet war bei geplanter Weiterverwendung bei -80°C einzufrieren. Der Überstand wurde mit 0,9 %iger NaCl-Lösung 1:10 verdünnt. Die Originalproben wurden auf Eis gelagert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde gegen eine Standard-BSA-Verdünnungsreihe auf einer 96er-Platte nach der Zugabe von 200 µl Assayfarblösung, bestehend aus Cu(II)SO<sub>4</sub> 1:50 in BCA gelöst, wobei der Farbstoff 15 min bei 37°C inkubieren mußte, photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm doppelbestimmt. Nach den Meßdaten wurde eine Eichkurve der Proteinkonzentration erstellt.

### 2. Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Unter Verwendung des Vertikalelektrophoresesystems wurden die Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen in Anlehnung an die Methode von Laemmli elektrophoretisch aufgetrennt [63].

Herstellung von SDS-Polyacrylamidminigelen

Die SDS-Polyacrylamidminigele unterteilen sich in Sammel- (7 % Acrylamid) und Trenngel (10 % Acrylamid). Das Trenngel wurde folgendermaßen hergestellt:

10 %-iges Trenngel: 10 ml Acrylamid (29,2:0,8)  
7,5 ml 1,5 M Trispuffer pH = 8,8

12,035 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Für 10min wurde im Wasserstrahlvakuum entgast. Durch die Zugabe der folgenden Komponenten wurde die Polymerisation eingeleitet:

300 µl 10 %-ig SDS

15 µl TEMED

150 µl 10 %-ig APS.

Jetzt konnte das Gel gegossen werden. Um eine gleichmäßige Polymerisation und eine exakte Grenzschicht zu erzielen, wurde das Trenngel mit Wasser überschichtet. Nach 1h wurde das Wasser abgesaugt und ein zehnzähliger Kamm eingesetzt, der als Platzhalter für die Probenauftragungstaschen fungierte. Das Sammelgel wurde folgendermaßen hergestellt:

7 %-iges Sammelgel: 2,33 ml Acrylamid (29,2:0,8)

2,5 ml 0,5 M Trispuffer pH = 6,8

5,015 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Für 10 min wurde im Wasserstrahlvakuum entgast. Durch die Zugabe der folgenden Komponenten wurde die Polymerisation eingeleitet:

100 µl 10 %-ig SDS

5 µl TEMED

50 µl 10 %-ig APS.

Das Trenn- wurde mit dem Sammelgel überschichtet. Es härtete 1h aus. Der Kamm wurde aus den Taschen des Sammelgels entfernt und gegebenenfalls waren die Taschen zu spülen und abzusaugen.

### 3. Probenvorbereitung

Unter Einsatz einer Probenmasse von 30 µg wurde zu einem Volumen ad 25 µl 2xProbenpuffer aufgefüllt.

2xProbenpuffer für SDS-Gele

100 mM Tris    200 mM DTT            0,2 %-ig Bromphenolblau

4 %-ig SDS    20 %-ig Glyzerin

Gleichzeitig wurde der Rainbow-Marker als Molekulargewichtsstandard vorbereitet.

Die Denaturierung der Probe erfolgte bei 95°C für 5 min.

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde in die Vertikalgelelektrophoresekammer überführt. Die Taschen wurden auf ihre Integrität geprüft, mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt und mit den Proben versehen.

Elektrophoresepuffer: 25,6 mM Tris            191,8 mM Glycin            0,1 % (w/v) SDS

Für 35-45 min. wurde an das Gel bei Beachtung der Polarität eine Spannung von 200 V angelegt. Anschließend wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel markiert.

#### 4. Gelelektrophorese

Gelelektrophoretisch separierte Proteine sind im Gel immunologischen Analysen schwer zugänglich. Daher wurden die Proteine und deren Trennkonfiguration mittels Naßtransfers aus dem Gel auf eine PVDF-Membranen kopiert und immobilisiert. Nach Inkubation der auf der Membran präsentierten Proteine mit primären mono- oder polyklonalen Antikörpern wurden die resultierenden Immunkomplexe mittels eines sekundären peroxidasekonjugierten Antikörpers unter Verwendung des ECL-Systems visualisiert.

#### 5. Naßtransfer

Der Naßtransfer wurde anderen Transfermethoden vorgezogen. Eine PVDF-Membran wurde entsprechend des Formates des Trenngels zurechtgeschnitten. Für 15 s mußte die Membran in absolutem Methanol aktiviert werden, um dann für 2 min in destilliertem Wasser geschwenkt und für 10 min in Transferpuffer äquilibriert zu werden.

Transferpuffer:        50 mM Tris                    95 mM Glycin                    0,005 % (w/v) SDS

Für den Transfer des Proteins aus dem Gel in die Membran wurde die Kassette sandwichartig beschickt. Folgende Schichtung war, mit der schwarzen Seite beginnend, einzuhalten: getränkter Schwamm, getränktes Whatmanpapier, Gel, PVDF-Membran, getränktes Whatmanpapier, getränkter Schwamm. Luftblasen waren bei jeder neuen Lage auszuwalzen.

Unter Beachtung der Polung wurde die Kassette in die Transferkammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt. Nun wurde für 60min eine Spannung von 100V angelegt. Der Transferpuffer wurde dabei mit Hilfe eines Magnetrührers umgewälzt. Nach Beendigung des Transfers war der Kassetteninhalt zu trennen. Die Membran wurde in destilliertem Wasser gewaschen. Das Gel wurde auf vollständigen und gleichmäßigen Transfer mit Hilfe der Coomassie-Färbung überprüft. Das Gel wurde für 5 min in Coomassie-Blau gefärbt und mittels Entfärber differenziert.

#### Coomassie-Färbelösung

500 mg Coomassie  
100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>  
100 ml Methanol  
20 ml Essigsäure

#### Coomassie-Entfärbung

100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>  
80 ml Methanol  
20 ml Essigsäure

Die Färbelösung wurde vor Gebrauch filtriert.

## 6. Immunochemischer Nachweis von CK und CYP2E1

Waschpuffer: 20 mM TrisHCl (pH = 7,5) 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20

1 %-iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung: 1 g Milchpulver je 100 ml Waschpuffer

5 %-iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung: 5 g Milchpulver je 100 ml Waschpuffer

### - Detektion des CK

Die unspezifischen Proteinbindungsstellen wurden mit 5 %-iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung über Nacht bei 4°C blockiert. Jetzt wurde die Membran 2h mit dem primären Antikörper gegen CK in 5 %-iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung bei Raumtemperatur in einer Verdünnung 1:1000 inkubiert. Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung mit 1 %-iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung. Jetzt war die Membran 1h mit dem sekundären Antikörper in 1 %-iger Milchpulver-Waschpuffer-Lösung bei Raumtemperatur in einer Verdünnung 1:2500 zu inkubieren. Erneut mußte viermal mit Waschpuffer-Lösung gewaschen werden. In der Waschlösung wurde die Membran in die Dunkelkammer überführt.

### - Detektion des CYP2E1

Für mindestens 1h wurde die Membran in 5 %-iger Milchpulver-PBS-Lösung gelagert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Der primäre Antikörper wurde 1h bei Raumtemperatur in 5 %-iger Milchpulver-PBS-Lösung in einer Verdünnung von 1:500 inkubiert. Jetzt wurde die Membran dreimal 5min mit 0,1%igem Tween 20 in PBS gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Nun mußte der sekundäre peroxidasekonjugierte Antikörper 1h bei Raumtemperatur in 0,5%-iger Milchpulver-PBS-Lösung in einer Verdünnung von 1:5000 inkubieren. Es schloß sich eine Waschung für dreimal 5min mit 0,1%-igem Tween 20 in PBS an. In der Waschlösung wurde die Membran in die Dunkelkammer überführt.

## 7. Photographische Auswertung der Membranen in der Dunkelkammer

Eine ausreichende Menge an dem Peroxidasesubstrat Luminol und dem Cosubstrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die die Substratlösungen A und B des ECL-Systems beinhalten, wurde in 1:1 Anteilen gemischt und die Membranen 1min inkubiert. Auf einer gereinigten Glasscheibe legte man die Membranen mit der Proteinseite nach oben, saugte das überschüssige ECL ab und deckte mit einer zugeschnittenen Folie die Membran ab. Lufteschlüssen wurden ausgestrichen. Die Membran wurde in eine Fotokassette verbracht und ein entsprechender Filmstreifen auf der Membran positioniert. Die Belichtungszeit, die anfänglich 1min betrug, wurde nach dem Entwickeln und Fixieren optimiert, in dem man ein ideales Verhältnis von Belichtungs- und Entwicklungszeit suchte.

## 8. Abspaltung der Antikörper

Spalltlösung: Lagerung bei 4°C      0,2 M Glycin      0,005 %-iges Tween 20

Die Membran, bei der eine Aufspaltung der Proteinbindung vorgesehen war, wurde zweimal für 1h in 100 ml Spalltlösung bei 80°C schaukelnd inkubiert, wobei nach der ersten Stunde ein Wechsel der Spalltlösung vorgesehen war.

### 2.2.5 Die mRNA-Analytik

#### 1. RNA-Isolation mit Trizol

Die gesamtzelluläre RNA wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi mittels Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung der Trizol-Reagenz isoliert [18]. Falls nicht anders angegeben wurden die einzelnen Isolierungsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden ausschließlich RNase-freie Lösungen verwendet.

Zum Lysieren der Zellen benetzte man die Zellkulturschale mit 1ml Trizol je 10 cm<sup>2</sup> Kulturfläche. Gewebeteile wurden unter Trizolschutz im Ultrathurrax zerkleinert.

Die Lösung war mit einer Pipette mehrmals aufzuziehen, um die DNA-Kernproteine zu lösen. Die Dissoziation von Nukleinsäure-Protein-Komplexen erfolgte bei fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde mit 200 µl Chloroform pro eingesetztem 1 ml Trizol versetzt und 15 s manuell geschüttelt. Wieder erfolgte eine Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur. Jetzt wurde die Probe bei 4°C, 12000xg und 15 min zentrifugiert. Die obere, wäßrige, RNA-enhaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Probengefäß überführt. Der phenolische Unterstand, in dem sich die DNA und das Protein angereichert hatten, wurde für die Aufarbeitung dieser Fraktionen bei -20°C gelagert. Zur RNA-Fällung wurde 500 µl Isopropanol pro eingesetztem 1 ml Trizol hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein gelartiges Pellet wurde nach der Zentrifugation bei 4°C, 12000xg und 15 min, gewonnen. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. 1 ml 75 %-iges Ethanol pro eingesetztem 1 ml Trizol wurde zur Herauslösung kontaminierender Salze hinzugegeben und manuell geschüttelt. Nun wurde erneut bei 4°C, 7500xg und 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde kurz luftgetrocknet. Eine vollständige Trocknung war nicht empfehlenswert, da sich sonst die Resuspensionsfähigkeit verschlechterte. Das Pellet wurde unter mehrmaligem Aufziehen mit der Pipette in 40 µl DEP-Wasser gelöst. Die Probe wurde für 10 min bei 60°C inkubiert, um einzelsträngige RNA zu gewinnen. 5 µl der Probe wurden zur photometrischen Messung bei 260 und 280 nm 995 µl Wasser zugefügt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gefrostet und bei -80°C gelagert.

## 2. mRNA-Quantifizierung

Die quantitative Bestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke. Aus der gemessenen Absorption bei 260 nm ist die Konzentration (Absorption = 1 entspricht einer RNA-Konzentration =  $40 \mu\text{gml}^{-1}$ ) der gelösten RNA unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung zu ermitteln.

Der Quotient der gemessenen Absorption bei 260 nm (Nukleinsäure) und bei 280 nm (Proteine) diene als Maß der Reinheit der Präparation. Liegt im Idealfall reine RNA, vor ist der Quotient  $260/280 = 2$ .

## 3. RT/PCR

2  $\mu\text{g}$  RNA der Probe wurden mit DEP-Wasser ad 4  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Der Probenrest wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  kurz gelagert oder bei  $-80^\circ\text{C}$  erneut tiefgefroren. Nun erfolgte die DNase Behandlung der Lösung: 1  $\mu\text{g}$  RNA je eingesetztem  $\mu\text{g}$  RNA wurden in 1  $\mu\text{l}$  RNA-freiem DNase 10x Reaktionspuffer gelöst und ad 10  $\mu\text{l}$  DEP-Wasser aufgefüllt. Für 30 min war die Lösung bei  $37^\circ\text{C}$  zu inkubieren. 1  $\mu\text{l}$  DNase-Stopplösung wurde zur Reaktionsbeendigung hinzugefügt. Für 10 min erfolgte bei  $65^\circ\text{C}$  die DNase-Inaktivierung.

Zur cDNA-Synthese wurde 1  $\mu\text{l}$  Primerhexamer zugegeben und die Probe für 5 min bei  $70^\circ\text{C}$  inkubiert und dann auf Eis gelagert.

Mastermix 1 je Probe:

- M-MLV 5xReaktionspuffer 5  $\mu\text{l}$
- dNTP 1,25  $\mu\text{l}$
- rRNasin<sup>®</sup> RNAinhibitor 0,625  $\mu\text{l}$
- M-MLV RT 1  $\mu\text{l}$
- DEP-Wasser ad 13  $\mu\text{l}$

12  $\mu\text{l}$  der Probe wurden mit 13  $\mu\text{l}$  Mastermix gemischt und 1 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und weitere 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert. An dieser Stelle war eine Unterbrechung des Versuchs möglich, wobei eine Zwischenlagerung bei  $4^\circ\text{C}$  erfolgen sollte.

Mastermix 2 je Probe:

- Puffer 5  $\mu\text{l}$
- Mg 3  $\mu\text{l}$
- dNTP 1  $\mu\text{l}$
- Taq-Polymerase 0,23  $\mu\text{l}$
- Primer 2,5  $\mu\text{l}$
- DEP-Wasser ad 45  $\mu\text{l}$

5  $\mu\text{l}$  der Probe je Versuchsansatz wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 45  $\mu\text{l}$  Mastermix 2 versetzt und 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert.

- Regime für CYP:
  - Deckel mit 100°C
  - Initialdenaturierung t = 2min,  $\vartheta = 94^{\circ}\text{C}$
  - Denaturierung t = 30 s,  $\vartheta = 94^{\circ}\text{C}$       )
  - Annealing t = 1 min,  $\vartheta = 58^{\circ}\text{C}$             } 36 Zyklen
  - Extension t = 1 min,  $\vartheta = 72^{\circ}\text{C}$             )
  - Halten bei 4°C
- Regime für  $\beta$ -Aktin:
  - Deckel mit 100°C
  - Initialdenaturierung t = 2min,  $\vartheta = 94^{\circ}\text{C}$
  - Denaturierung t = 30 s,  $\vartheta = 94^{\circ}\text{C}$       )
  - Annealing t = 1 min,  $\vartheta = 55^{\circ}\text{C}$             } 26 Zyklen
  - Extension t = 1 min,  $\vartheta = 72^{\circ}\text{C}$             )
  - Halten bei 4°C

Die Proben wurden bei 4°C gelagert.

#### 4. Elektrophorese der RT/PCR-Produkte

Bei dem Probenauftrag auf Parafilm wurden 12  $\mu\text{l}$  Probe in vorgelegtem 3  $\mu\text{l}$  Blaulaufpuffer gemischt. Dann wurde ein 2 %-iges Agarosegel hergestellt. 0,8 g Agarose wurden in 40 ml 1xTBE Puffer in einem mit perforierter Haushaltsfolie verschlossenen Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle auf mittlerer Stärke für 2 min aufgelöst. Zwischenzeitlich wurde das Erhitzen unterbrochen, um die Lösung zwecks Überkochschutz zu schwenken.

5xTBE-Puffer pH = 8:      54,45 g Tris              25 ml 0,5 M EDTA  
                                   27,5 g Borsäure        H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> ad 1l

Die Agaroselösung wurde auf 40°C abgekühlt. Dann erfolgte der luftblasenfreie Guß in den mit Kämmen bestückten Gelträger. Das Gel mußte 30 min aushärten, nachdem der Gelträger bereits in der Elektrophoresekammer plaziert wurde. Dann wurden die Wände entfernt. Das 2 %-ige Agarosegel wurde mit TBE-Puffer überschichtet. Nun wurden die Kämmen entfernt. 14  $\mu\text{l}$  der Proben wurden in die Geltaschen aufgetragen und bei einer Gleichspannung von 50 V bei Beachtung der Polung für 90 min in der Elektrophorese aufgetrennt. Die Anfärbung in 1:10<sup>4</sup> Ethidiumbromid-TBE-Puffer erfolgte je Gel für 15 min. Eine ausreichende mindestens fünfzehnminütige Entfärbung in 1xTBE Puffer war für die Kontrastanhebung notwendig.

Die Fluoreszenz des in die cDNA interkalierenden Ethidiumbromids ermöglichte unter UV-Licht eine Visualisierung der cDNA-Banden in unserer Dunkelkammer. Die Auswertung wurde am Rechner durchgeführt.

## **2.2.6 Das Chlorzoxazonassay**

### **1. Induktion des NHBE**

Das Ziel der Untersuchung war der Nachweis der Funktionalität und der Stabilisierbarkeit oder Induzierbarkeit des CYP2E1 im NHBE. Als Induktor benutzten wir Ethanol. Zu diesem Zwecke wurden die bei der Präparation gewonnenen bronchoepithelialen Fragmente einem Stimulus von 40mM Ethanol ausgesetzt. Das Ethanol wurde dem Medium zugegeben. Medienwechsel wurde täglich durchgeführt. Dabei wurde jeweils ein Kulturansatz in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Je nach Ergiebigkeit des Ansatzes wurde die Induktion über vier bis fünf Tage durchgeführt. Das Chlorzoxazonassay wurde im BgVV durch Frau Dr. Bernauer durchgeführt. Daher wurden die Proben auf Trockeneis gelagert, isoliert verpackt und versandt.

### **2. Probenvorbereitung**

Die Proben erreichten ihr Ziel jeweils in tiefgefrorenem Zustand. Dann wurden die Proben in eine vorgekühlte Porzellanschale überführt, mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem ebenfalls vorgekühltem Pistill zunächst zerhackt und dann, unter weiterer bedarfsge-rechter Stickstoffzugabe zerrieben. Die Teilchen wurden mit einem Spatel in graduierte, spitz zulaufende 10 ml-Glasröhrchen überführt, mit 200-500 µl gekühltem, 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,4 (gelagert bei 4°C) versetzt und unter Wasser-Eis-Kühlung mit bis zu 20 Impulsen bei 20 kHz homogenisiert. Die Anwendung von Trispuffer ergab im Gegensatz zum Phosphatpuffer eine Aktivitätserhöhung. Dann wurde über Gaze abfiltriert und nochmals mit wenig Puffer nachgespült. Das so erhaltene Homogenat wurde gesplittet, ein Aliquot wurde für die Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

Zuerst werden die Proben 1:10 mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt. Die Originalproben wurden auf Eis gelagert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde gegen eine Standard-BSA-Verdünnungsreihe auf einer 96-Platte nach der Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz, welche fünf Minuten inkubieren mußte, photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm doppelbestimmt. Nach den Meßdaten wurde eine Eichkurve der Proteinkonzentration erstellt. Der andere Teil wurde für die HPLC-Bestimmung eingesetzt. Der Nachweis der CYP2E1-Aktivität beruht auf dem CYP2E1-spezifischen Umsatz von CLX in 6-OH-CLX. Für diese

Untersuchung wurde eine modifizierte Methode nach Peter et al. angewendet, die eine hohe Sensitivität für die Ermittlung geringer Hydroxylaseaktivitäten des Enzyms zeigt [13,103].

### 3. Das CLX-Assay

- 60 mM KOH: 340 mg wurden in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst.
- 30 mM CLX-Stammlösung: 47,1 mg CLX wurden in 10 ml 60 mM KOH gelöst. Die Lagerung erfolgte in 0,5 ml Portionen in Schraubvials bei  $-20^\circ\text{C}$ .
- 100 mM Phosphatpuffer:
  1. 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung (alkalisch): 57,058 g wurden in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst. Die Lösung wurde bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.
  2. 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (sauer): 13,609 g wurden in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst. Die Lösung wurde bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

Aus der 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung und der 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung waren täglich frische 0,1 M Lösungen herzustellen:

- 25 ml 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung wurden zu 250ml mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgefüllt.
- 5 ml 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung wurden zu 50ml mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgefüllt.

Die alkalische  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung wurde in einem Becherglas vorgelegt und mit der sauren  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung wurde auf  $\text{pH} = 7,4$  titriert.

- 1 M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung:

0,203 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  wurden in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst. Die Lösung wurde bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.
- Regenerierendes System:

60,8 mg Glucose-6-phosphat und 10 mg NADP wurden eingewogen, und es wurden 800  $\mu\text{l}$  0,1 M Phosphatpuffer, 100  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung und 80  $\mu\text{l}$  Glucose-6-Phosphatdehydrogenase zupipettiert und die Lösung gut gemischt.

- 43 %-ige  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (w/w): 30 ml 85 %-ige  $\text{H}_3\text{PO}_4$  wurden in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst.
- 0,1 M Trispuffer,  $\text{pH} = 7,4$  wurde bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.
- PAc als interner Standard  $c_{\text{PAc}}=150\mu\text{gml}^{-1}$  wurde in [3:17 (v/v)] Acetonitril/Wasser gelöst.

In Schliffreagenzgläsern wurden folgende Lösungen zugegeben:

- 0,96-4,67 mg Protein in entsprechenden Volumina, optimal 10  $\mu\text{l}$ , werden durch Zugabe des 0,1 M Trispuffers auf ein Volumen von 940  $\mu\text{l}$  eingestellt. Jetzt wurden 10  $\mu\text{l}$  CLX-Stammlösung in KOH zupipettiert. Das Gemisch wurde geschüttelt und 3 min bei  $37^\circ\text{C}$  vorinkubiert.
- Die Reaktion startete nach der Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  des regenerierenden Systems.

- 20 min wurde bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Probenvolumen beträgt 1 ml.
- Nach weiteren 20 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl 43 %-iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt.
- Jetzt wurden die Proben auf Eis gestellt und 5 µl PAc zupipettiert und gemischt.

Eine Negativkontrolle ohne CLX wurde je Probe mitgeführt.

300 nmol CLX wurden in 60 mM KOH bei 37°C mit 0,96 – 4,67 mg Protein aus den aufgearbeiteten Proben inkubiert. Ebenfalls zugegeben wurde ein NADPH-erzeugendes System bestehend aus Glukose-6-phosphat, NADP<sup>+</sup> und Glukose-6-phosphatdehydrogenase in 0,1 M Trispuffer bei pH = 7,4 zu einem Endvolumen von 1ml. Nach 20min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl 43 %-iger (w/w) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt. 4,18 nmol PAc wurden als interner Standard hinzugegeben und die Gemische wurden durch die SPE mit Hilfe von ENVI-18 endcapped Säulen aufgereinigt.

Vorschrift für SPE:

- Lösungen:
  1. Acetonitril für HPLC
  2. H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> täglich frisch
  3. 3:17 (v/v) Acetonitril/Wasser
  4. 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung: 13,609 g wurden in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst. Dann wurde 1:10 verdünnt und mit verdünnter H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH = 2,5 eingestellt.
- Das Gerät wurde mit Säulen und Zentrifugengläsern bestückt. Danach erfolgte die Konditionierung der Säulen mit: 2x1 ml Acetonitril, 2x1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, 2x1 ml 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung.
- Jetzt erfolgte der Probenauftrag, wobei 1 ml Probe langsam gegebenenfalls druck- oder vakuumunterstützt durchlief.
- Nun wurden die Säulen mit 3x100 µl 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung und 2x250 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und mit N<sub>2</sub> oder Vakuum getrocknet.

Zur Elution werden die Zentrifugengläser entfernt und Gefäße zum Auffangen des Eluates eingesetzt. Mit 3x200 µl Acetonitril wurde langsam eventuell mit Zwischenstopp eluiert. Abschließend wurde das Eluat 10-15min eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 µl 3:17 (v/v) Acetonitril/Wasser aufgenommen, 1 min gemischt und 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Dann wurden die Proben in HPLC-Meßgefäße überführt.

Nach der Elution mit Acetonitril und der Evaporation des Lösungsmittels wurden die Rückstände in 100 µl [3:17 (v/v)] Acetonitril/Wasser aufgelöst und in einem HPLC der 1100er

Serie unter Verwendung einer 2,1 x 120 mm Hypersil ODS C18 Säule, welche mit einer 2x30 mm Hypersil ODS Vorsäule versehen war, analysiert. Für die Elution wurden isokratische Bedingungen [3:17 (v/v)] Acetonitril/0,5 %-iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,25 mlmin<sup>-1</sup> eingehalten. Die Effluente wurden bei 297 nm unter Verwendung eines 1040A HPLC Detektionssystems, eines Diodenreihendetektors, gemessen. Die Formation des 6-OH-CLX wurde im Vergleich zu einer Standardkurve, die aus käuflich erworbenem 6-OH-CLX dargestellt wurde, quantifiziert und zur Bestimmung der CYP2E1-Hydroxylaseaktivität verrechnet. Jede Probe wurde doppelbestimmt.

## 2.2.7 Das Cometassay

### 1. Das KSG

Bezeichnung der Verbindung	Gehalt in 2,5g Gemisch [mg]
Tetrachlorethen	0,022
Dichloracrylnitril	0,047
Trichloracrylnitril	3,0
Pentachlorethan	0,015
Hexachlorethan	0,215
Pentachlorpropionitril	14,5
Trichlortriazin	1,075
Pentachlormethacrylonitril	0,115
Hexachlorbutadien 1,3	0,1
Hexachlorpropen	0,042
Dichlormethoxytriazin	0,65
Pentachlorallylnitril	0,217
t-Pentachlorcrotonitril	0,25
Dichlorhydroxytriazin	0,045
Tetrachlorpyrazin	0,825
Hexachlorcyclopentadien	0,01
Dichlortriazin-2-amin	0,207
Heptachlorbutyronitril	0,004
Pentachlorpyridin	2,225
Pentachlorbenzol	0,024
o-Tetrachlorcyanopyridin	0,002
m-Tetrachlorcyanopyridin	0,017
Octachlorpropan	0,525
Octachlorcyclopenten	1,075
o-Heptachlorpicolin	1,075
m-Heptachlorpicolin	2,225
Hexachlorbenzol	3,25

Tab.3: Auszug aus der Zusammensetzung des KSG [9]

Das KSG wurde in einer Konzentration von 1mgml<sup>-1</sup> in 0,5%-iger DMSO-Lösung suspendiert. In Vorversuchen zeigte sich die 0,5%ige DMSO-Lösung als optimale Suspensionskon-

zentration. Diese Konzentration wirkte nicht zytotoxisch auf die NHBEC. Diese Suspension wurde als Stammlösung vor jedem Experiment frisch angesetzt [87].

## 2. Vitalfärbung mittels Trypanblau

Der Farbstoff Trypanblau kann intakte Membranen lebender Zellen nicht überwinden. Dagegen erreicht Trypanblau das Zytoplasma toter Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist. Da Trypanblau ein saurer Farbstoff ist, dessen höchste Aufnahmefähigkeit bei einem pH von 7,5 besteht, bindet er sich als Anion leicht an Proteine [74].

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen 5 min trypsiniert und in PBS gewaschen. Die Zellkonzentration betrug ca.  $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ . 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden mit 50  $\mu\text{l}$  0,25 %-iger steriler angewärmter Trypanblaulösung versetzt. Das Gemisch wurde 3 min bei 37°C inkubiert.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte sofort in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Alle ungefärbten Zellen und alle Zellen, welche über eine leichte bis tiefblaue Färbung verfügten, wurden gezählt. Etwa 400 Zellen wurden für jede Testkonzentration ausgewertet und der prozentuale Anteil membrangeschädigter Zellen ermittelt [87].

## 3. Cometassay

Beschichtung der Objektträger

NMP-Agarose 1 % in  $\text{H}_2\text{O}$  LMP-Agarose 0,5 % in PBS

NMP-Agarose 0,6 % in PBS

Lysierungslösung: pH = 10

10 mM Trispuffer

2,5 mM NaCl

100 mM Na-EDTA

1 % Na-Sarconisat

Endlysierungslösung:

durch Zusatz von

1 % Triton X-100

10 % DMSO

zur Lysierungslösung

Elektrophoresepuffer: pH = 13

1 mM Na-EDTA

300 mM NaOH

Neutralisationspuffer: pH = 7,5

0,4 mM Trispuffer

Färbung:

20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid

Die NHBEC wurden vor der Behandlung 5 min trypsiniert, um sie von der Plastikoberfläche der Kulturschale zu lösen, abzentrifugiert, gezählt und 40000 Zellen in einem Reaktionsgefäß für eine bestimmte Zeit mit der Testkonzentration, die dem Kulturmedium zugesetzt wurde, behandelt.

Speziell aufgerauhte Objektträger wurden mit 1 ml 1% NMP Agarose beschichtet. Dieser Überzug wurde nach kurzer Antrocknung wieder abgeschabt und der Objektträger mit einer Grundschicht von 300 µl 0,6 % NMP-Agarose erneut überschichtet, mit einem Deckglas belegt und diese und die folgende Agaroseschichten wurden über einer eisgekühlten und feuchtigkeitsisolierten Glasscheibe zum Erstarren gebracht.

Nach der Entfernung des Deckglases wurde die Grund- mit der Zellschicht belegt. Dazu wurden die behandelte NHBEC in 85 µl 0,5 % LMP-Agarose resuspendiert und auf den vorbeschichteten Objektträgern aufgebracht, mit je einem Deckglas abgedeckt und 10 min über Eis gelagert. Mit einer abschließenden Deckschicht aus 85 µl 0,5% LMP-Agarose wurde die Zellschicht geschützt. Die Objektträger wurden wiederum 10 min über Eis gelagert. Nach der Entfernung des Deckglases inkubierten die Objektträger für 1h in der Lysierungslösung bei 4°C. Die Lyse dient der Freilegung der DNA aus dem Kern. Die Endlyserungslösung wurde synchron der Lyse zugefügt. Danach wurden die Objektträger in die Elektrophoresekammer überführt und 1h im stark basischen Elektrophoresepuffer vorinkubiert. Der stark basische Elektrophoresepuffer bewirkt eine Relaxation der DNA. Der lichtgeschützte Elektrophoreselauf erfolgte 30min bei 25V und 300 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger mit Neutralisationspuffer bei Raumtemperatur ab gespült. Die Objektträger wurden in Neutralisationspuffer über Nacht im Kühlschrank gelagert. Mit 60 µl Ethidiumbromidlösung erfolgte die Färbung [80].

Als Positivkontrolle wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Konzentration von 300 µM inkubiert [125].

Zum Ausschluß weitere Schädigungen oder Photoreparatur der DNA durch Lichtenergie erfolgte die Durchführung des Cometassay weitestgehend im Dunkeln oder bei Rotlicht [125].

Die mikroskopische Auswertung erfolgte sofort nach der Färbung mit einem Auflichtfluoreszenzmikroskop, Filtersatz Nr.15 (Anregungswellenlänge 510 nm/ Emission 595 nm).

Die Kometenschweiflänge wurde mit Hilfe eines Okularmikrometers gemessen [130]. Es wurden je 50 Kometen pro Objektträger ausgewertet [47].

In der Literatur werden häufig digitale Auswertungssysteme beschrieben, die den DNA-Gehalt der Kometenlänge, das sogenannte Tailmoment messen. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Tests standen derartige digitale Auswertungssysteme noch nicht zur Verfügung [31].

Die Längenmessung der Kometen ist aber völlig ausreichend und zweckmäßig, um Aussagen über das Ausmaß an DNA-Schäden zu treffen und Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen erfassen zu können [130].

#### 4. Der S9-Mix – ein externes Metabolisierungssystem

Nicht alle genotoxischen Substanzen wirken direkt genotoxisch. Viele Stoffe wirken indirekt. Sie werden erst durch ihre Metabolisierung genotoxisch.

Da die meisten in-vitro-Kulturen nicht über die erforderliche Enzymausstattung verfügen, die für die Metabolisierung im intakten Säugerorganismus vorhanden ist, muß bei der in-vitro-Testung ein externes Metabolisierungssystem eingesetzt werden.

Eine dem Säugerorganismus annähernd vergleichbare Stoffwechselsituation wird durch Zugabe eines externen Metabolisierungssystems im in-vitro-System geschaffen. Die Leber wird als das geeignetste Organ für die Gewinnung eines externen Metabolisierungssystems angesehen [38]. In der Leber, dem Hauptstoffwechselorgan für exogene und endogene Substrate, werden CYP besonders stark exprimiert. Die Rolle dieser Enzyme für die Ent- und Giftung ist bereits eingehend besprochen worden. Durch Oxidation metabolisieren sie lipophile Fremdstoffe zu hydrophilen Produkten, die, nach einer Phase-II-Reaktion, vom Körper ausgeschieden werden können [26].

Durch die Zugabe von Induktoren, z. B. Aroclor, kann eine Expression von verschiedenen CYP ausgelöst werden. Dies findet Anwendung bei der Herstellung der sogenannten S9-Fraktion aus Rattenleber zur Präparation des S9-Mixes. Der S9-Mix zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an CYP aus.

##### - Arocloraufbereitung

Durch ein Gemisch aus polychlorierten Biphenylen, welches in der Literatur als Aroclor 1254 bezeichnet wird, erfolgte die enzymatische Leberaktivierung. Aroclor ist der gebräuchlichste Induktor [21]. Zur Herstellung des Homogenates können auch andere Organe, z. B. die Lunge, verwendet werden. Es gibt keine Hinweise auf ein bevorzugtes Aktivierungssystem, da das KSG zahlreiche halogenierte Kohlenwasserstoffe ohne bislang bekannte genotoxische Wirkung enthält. Da für Aroclor die meisten Daten zur Verfügung standen, wurde dieser Induktor gewählt.

##### - Leberaktivierung und Herstellung der S9-Fraktion

Vor der Applikation wurde Aroclor in einer Konzentration von  $200 \text{ mgml}^{-1}$  in Erdnußöl gelöst [21]. Einer männlichen Wistar-Ratte mit einem Mindestgewicht von 250 g wurden fünf Tage vor Versuchsbeginn  $500 \text{ mgkg}^{-1}$  Aroclor 1254 i.p. injiziert. Am Versuchstag wurde die Ratte durch eine  $50 \text{ mgkg}^{-1}$  Pentobarbitalinjektion i.p. narkotisiert und unter sterilen Bedingungen sofort laparotomiert. Nach dem Ausbluten wurde die Leber exstirpiert und bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Leber wurde anschließend gewogen, zerschnitten und je g Leber mit 3

ml 0,15 M steriler KCl versetzt. Nach der Homogenisierung wurde das Gemisch in sterilen Plastikzentrifugenröhrchen 10 min bei 4°C mit 6000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in sterile Kryoröhrchen verteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

- Herstellung des S9-Mix

Lösungen zur Herstellung des S9-Mix:

- Phosphatstammlösung

A: 4,804 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ad 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ .

B: 6,286 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  ad 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ .

Es wurden 19,6 ml von Lösung A und 80,4 ml von Lösung B gemischt, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und die Phosphatstammlösung autoklaviert.

- Magnesiumchlorid

406,51 mg  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  ad 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ .

- Kaliumchlorid

615 mg KCl ad 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ .

Beide Lösungen wurden durch Mikrofiltration sterilisiert.

- NADP

726 mg NADP ad 20 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ .

- Glucose-6-phosphat

304 mg Glucose-6-phosphat ad 20 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ .

Die Sterilisation beider Lösungen erfolgte durch Mikrofiltration. Die Lösungen wurden in sterile Röhrchen pipettiert und bei -30°C eingefroren.

Vor Testbeginn wurde aus der S9-Fraktion der S9-Mix hergestellt und dazu das NADP, das Glucose-6-Phosphat und die S9-Fraktion auf Eis aufgetaut.

Anteile am S9-Mix in der Reihenfolge der Zugabe:

1. Phosphatstammlösung	30 %
2. KCl	20 %
3. $\text{MgCl}_2$	20 %
4. S9-Fraktion	10 %
5. NADP	10 %
6. Glucose-6-phosphat	10 %

Um Auskristallisierungsprozesse einzelner Komponenten zu verhindern, mußte diese Reihenfolge eingehalten werden.

#### - Der Einsatz des S9-Mix

Der Versuchsablauf des Cometassays wurde nicht wesentlich beeinflusst. Der Zellsuspension wurde S9-Mix in einer Konzentration von 10 % zugesetzt. Die Behandlungsdauer darf 3h nicht überschreiten, da S9-Mix bei längerer Einwirkung zytotoxisch wirken kann [77,132].

#### **2.2.8 Statistik**

Angegeben werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung. Zur Verifizierung signifikanter Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wird der t-Test nach Student angewendet. Dieser geht von der Nullhypothese aus, die unterstellt, daß keine Unterschiede zwischen der Prüf- und Kontrollgruppe vorliegen bzw. nur durch Zufall bedingt sind. Signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben liegen vor, wenn diese Hypothese bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  widerlegt werden konnte. Sie werden im folgenden mit \* gekennzeichnet.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Die Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen**

##### **3.1.1 Übersicht der gewonnenen Resektate**

Von 35 Patienten, die sich ab Juni 1997 bis Juni 1999 einem thoraxchirurgischen Eingriff in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Univ. unterzogen haben, konnte Gewebe für die Etablierung einer Kultur NHBEC an unserem Institut für Umwelttoxikologie der Univ. gewonnen werden. Die Angaben zu den Patienten sind der Tab. 4 zu entnehmen. Der Gewebegewinn erfolgte immer aus dem Resektat, das nach den Gesichtspunkten der Tumorchirurgie entfernt wurde. Es wurde den Patienten für diese Versuche niemals Gewebe entnommen. Die laufende Patientenummer wurde immer zur Bezeichnung der Kultur bzw. der Probe weitergeführt. Eine zweite Zahl nach der ID kennzeichnet die Explantationsgeneration.

##### **3.1.2 Die selektive Gewinnung und Kultivierung normaler humaner Bronchialepithelzellen**

Da im Querschnitt des präparierten Bronchus verschiedene Zellpopulationen aus unterschiedlichen Keimblättern zur Organbildung beitragen, bestand die Aufgabe, die Zellen des Bronchialepithels selektiv zu isolieren oder zu gewinnen.

###### **1. Modifizierte Methode nach Dobbs et al. [30]:**

Die Versuche, Bronchusfragmente einer Digestion mittels einer Trypsinlösung auszusetzen, hatten das Ziel, ein Gemisch aus bronchialen Epithelzellen und weiteren Zellen anderer Populationen zu gewinnen. In der angeschlossenen Zentrifugation war die Selektion der bronchialen Fraktion des Gemisches geplant. Im Ergebnis der Kultivierung der so gewonnenen Zellen mußte festgestellt werden, daß die Ausbeute an Zellen sehr klein war und daß lediglich vereinzelte Fibroblasten lichtmikroskopisch darstellbar waren. Bronchiale Epithelzellen waren nicht detektierbar. Bei den in Tab. 4 mit einem \* gekennzeichneten ersten drei Präparationen handelte es sich um Aufarbeitungen, die nach der modifizierten digestiven Methode nach Dobbs et al. angefertigt wurden.

###### **2. Modifizierte Methode nach Robinson et al. [113]:**

Die Versuche, einen Bronchialbaumabschnitt einer Digestion mittels Perifusion einer Elastaselösung zu unterziehen, hatten das Ziel, selektiv eine Populationen bronchialer Epithelzellen zu gewinnen. Durch den angeschlossenen mechanischen Aufschluß und die Netzpassagen sollten die separierten differenzierten Bronchialepithelzellen eines Bronchialbaumabschnittes

ID	G	Geb.-dat.	Diagnose	Lokalisation	Therapie	Präp.-tag	ML
*1	w	01.01.41	Adeno-CA	rechts zentral	Pneumonektomie	16.06.97	neg
*2	m	26.11.33	Adeno-CA	rechter Unter-La	Unterlappenresektion	25.06.97	neg
*3	m	05.03.39	anaplastisches CA	linker Ober-La	Pneumonektomie	04.07.97	neg
*4	m	22.09.36	Adeno-CA	rechter Ober-, Mittel-La	obere Bilobektomie	05.08.97	neg
*5	m	13.02.35	kleinzelliges CA	links zentral	Pneumonektomie	10.09.97	neg
*6	m	03.10.31	bronchiolo-alveoläres CA	linker Ober-La	Oberlappenresektion	16.09.97	neg
*7	m	29.12.26	Metastase	linker Ober-La	atypische Resektion	27.11.97	neg
*8	m	11.12.44	Adeno-CA	links zentral	Pneumonektomie	03.12.97	neg
*9	m	07.06.35	Adeno-CA	linker Unter-La	Unterlappenresektion	10.12.97	neg
*10=0	m	22.01.40	Hamartochondrom	Lingula	Lingularesektion	07.01.98	
1	m	02.06.26	kleinzelliges CA	linker Ober-La	Pneumonektomie	16.01.98	pos
2	w	24.11.34	Metastase	rechter Mittel-La	Mittellappenresektion	19.02.98	pos
3	w	21.09.37	Bronchiektasien	linker Unter-La	Unterlappenresektion	26.02.98	pos
4	m	25.05.25	Plattenepithel-CA	rechter Ober-La	Oberlappenresektion	05.03.98	pos
5	m	04.04.52	Plattenepithel-CA	linker Unter-La	Unterlappenresektion	06.03.98	pos
6	m	01.04.38	Plattenepithel-CA	links zentral	Pneumonektomie	13.05.98	pos
7	m	05.01.28	Plattenepithel-CA	linker Ober-La	Oberlappenresektion	18.05.98	pos
8	m	28.01.47	Plattenepithel-CA	rechter Ober-La	Oberlappenresektion	22.05.98	pos
9	m	17.09.30	anaplastisches CA	rechter Ober-La	Oberlappenresektion	02.06.98	pos
10	m	19.09.38	Adeno-CA	linker Unter-La	Unterlappenresektion	06.06.98	pos
11	m	23.06.24	Plattenepithel-CA	rechter Unter-La	untere Bilobektomie	26.06.98	pos
12	m	22.08.35	anaplastisches CA	rechter Mittel-La	Mittellappenresektion	07.09.98	pos
13	m	23.08.47	Adeno-CA	rechter Ober-La	Oberlappenresektion	09.09.98	pos
14	m	26.09.34	Plattenepithel-CA	linker Ober-La	Oberlappenresektion	28.09.98	pos
15	m	22.04.42	Adeno-CA	links zentral	Pneumonektomie	05.11.98	pos
16	m	10.10.28	Adeno-CA	rechter Ober-La	Oberlappenresektion	13.11.98	pos
17	m	15.12.37	Plattenepithel-CA	rechter Ober-La	Pneumonektomie	30.11.98	pos
18	m	07.02.21	Plattenepithel-CA	linker Unter-La	Unterlappenresektion	03.12.98	pos
19	m	06.09.30	Adeno-CA	rechter Ober-La	Oberlappenresektion	09.02.99	pos
20	m	27.12.34	Plattenepithel-CA	rechter Unter-La	untere Bilobektomie	10.02.99	pos
21	m	03.01.33	Adeno-CA	linker Unter-La	Unterlappenresektion	24.03.99	pos
22	m	16.07.32	Plattenepithel-CA	rechter Unter-La	untere Bilobektomie	16.04.99	pos
23	m	04.06.41	Plattenepithel-CA	rechter Ober-La	Pneumonektomie	29.04.99	pos
24	m	18.10.28	Plattenepithel-CA	linker Unter-La	Unterlappenresektion	27.05.99	pos
25	m	16.10.36	Adeno-CA	rechter Ober-La	Pneumonektomie	24.06.99	pos

Tab.4: Darstellung der positiven (pos) oder negativen (neg) Kulturverläufe bei der Gewinnung von Monolayern (ML) von NHBEC. Die aufgelisteten Daten der Patienten (ID), wie das männliche (m) oder weibliche (w) Geschlecht (G), das Geburtsdatum (Geb.-dat.), die Diagnose mit histologischer Klassifizierung des Karzinoms (CA), die Lokalisation der Erkrankung mit Angabe des betroffenen Lungenlappens (La) und die am OP-Tag = Präparationstag (Präp.-tag) durchgeführte Therapie, dienen bedarfsgemäß der Klärung retrospektiver Fragestellungen.

zur Verfügung stehen. Im Ergebnis der Kultivierung der so gewonnenen Zellen mußte festgestellt werden, daß die Ausbeute an Zellen sehr klein war und daß lediglich vereinzelte Fibroblasten lichtmikroskopisch darstellbar waren. Bronchiale Epithelzellen waren nicht detektierbar. Bei den in der Tab. 4 mit einem \* gekennzeichneten Präparationen Nr. \*4 bis \*9 handelte

es sich um Aufarbeitungen, die nach der modifizierten digestiven Methode nach Robinson et al. angefertigt wurden.

### 3. Modifizierte Methode nach Lechner et LaVeck [68]:

Nach dieser Methode konnten selektiv durch die Wahl der Kulturbedingungen NHBEC in Monolayerdimension reproduziert werden. Nach zwei bis drei Wochen Auswachszeit stand ein subkonfluent Monolayer zur Verfügung. Jetzt konnten die Fragmente zur erneuten Aussaat in frische Kulturschalen überführt werden. Es waren individuelle Schwankungen in der Auswachsgeschwindigkeit bei gleichen Kulturbedingungen zu verzeichnen. Bei den in der Tab. 4 aufgeführten Präparationen Nr.1 bis 25 handelte es sich um Aufarbeitungen, die nach der modifizierten Methode nach Lechner et LaVeck angefertigt wurden.

Die Abbildungen 2, 3 und 4 zeigen mikroskopische Aufnahmen der Kultur NHBEC.

Die in der Tab. 4 mit \*10 bezeichnete Probe stellt einen Sonderfall dar. Es handelte sich um einen Patienten, der, mit einem Rundherd unklarer Dignität in der Lingula pulmonis sinistri, sich einer diagnostischen Thorakotomie unterzog. Als diagnostisch-therapeutische Maßnahme wurde eine Lingularesektion durchgeführt. Da es sich bei der Schnellschnittdiagnose um einen benignen Tumor, ein Hamartochondrom, handelte, konnte auf eine Lappenresektion verzichtet werden. Da bei diesem Resektat keine Bronchusanteile vorhanden waren, wurde in Absprache mit dem Operateur vom Lingularesektat eine Pulmonalgewebeprobe präpariert.

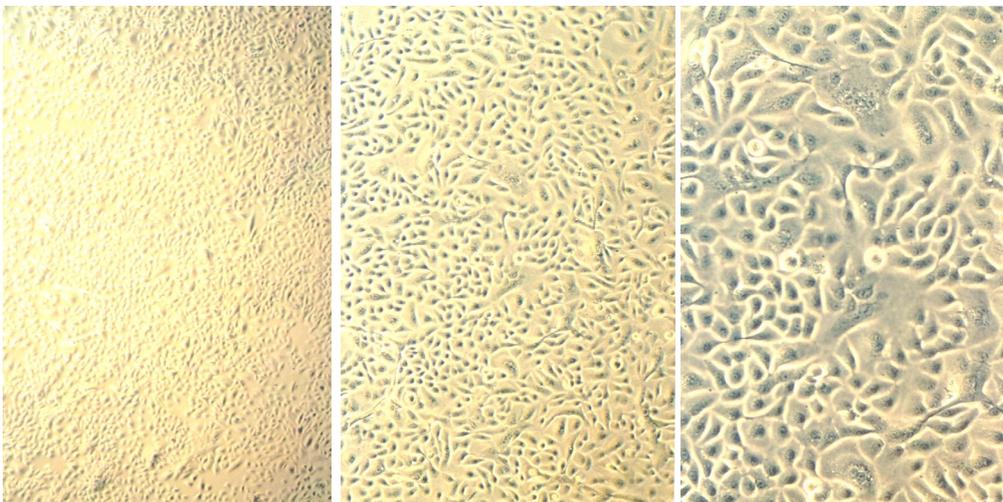


Abb.2: Monolayer der NHBEC in Phasenkontrastmikroskopie; linkes Bild 12,5 x, Mitte 25 x, rechtes Bild 50 x

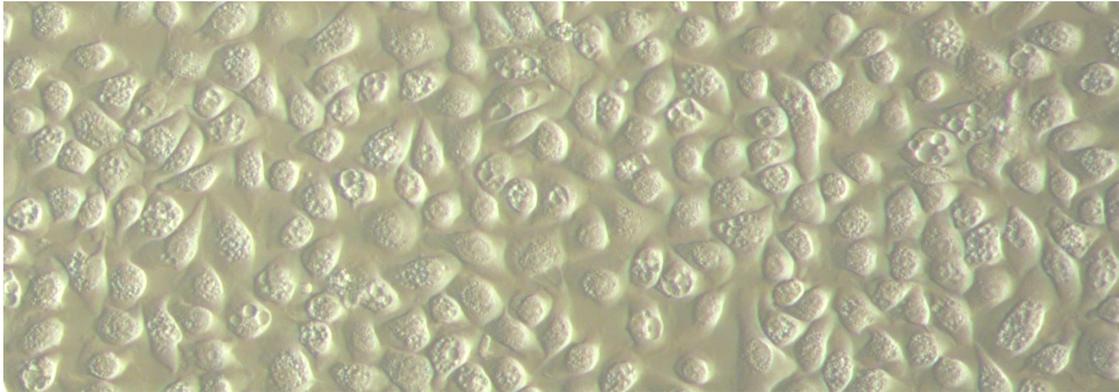


Abb.3: Monolayer der NHBEC in Hoffmannkontrastmikroskopie, das typisches „Pflasterstein“-relief ist zytopnominisch unter den praktizierten Kulturbedingungen; 200 x

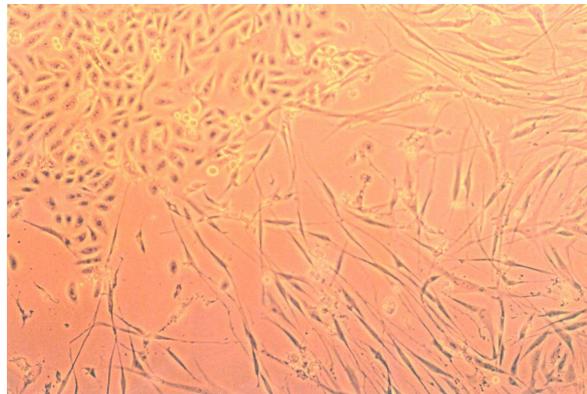


Abb.4: Phasenkontrastmikroskopie, Bei alten Kulturen um die vierte Explantationsgeneration konnte eine zunehmende Erschöpfung der Fragmente mit einer auftretenden Fibroblastenkontamination beobachtet werden. Links oben: NHBEC, rechts unten: Fibroblasten; 25 x

### 3.1.3 Charakterisierung der Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen

Elektronenmikroskopisch konnte in Abb. 5 gezeigt werden, daß es sich bei den kultivierten Zellen um differenzierte Zellen epithelialen Charakters handelte. Von den Bronchialepithelzellen wurden in der Kultur Zytokeratinfilamente exprimiert, die sich in charakteristischer Weise im Zytosol darstellten. Desweiteren boten die Bronchialepithelzellen ein typisches Erkennungsmerkmal epithelialer Zellen: es wurden Mikrovilli von der Zellmembran ausgestülpt. In den Zellmembranausstülpungen waren keine tubulären Filamente nachweisbar. Eine ziliäre Differenzierung war zu diesem Zeitpunkt negativ.

Mit Hilfe immunhistochemischer Arbeitstechniken konnte der bronchoepitheliale Charakter der Kultur der NHBEC nachgewiesen werden. Die Abb. 6 illustriert dieses Ergebnis. Durch die Detektion von Markern epithelialer Filamentstrukturen des Zytoskelettes, in dieser Arbeit Zytokeratin und das spezifische CK8/18, konnte bei flächenhaft, positivem Ergebnis für diese Marker der bronchoepitheliale Charakter der Zellkultur gezeigt werden. Um eine Verunreinigung der Kultur NHBEC mit Zellen mesenchymalen Ursprunges auszuschließen, wurde ein

Marker für mesenchymale, Intermediärfilamentstrukturen des Zytoskelettes: das Vimentin gewählt. Die Gegenreaktion mit Antivimentin zeigte lediglich punktuelle Verunreinigung mit Zellen mesenchymalen Ursprungs.

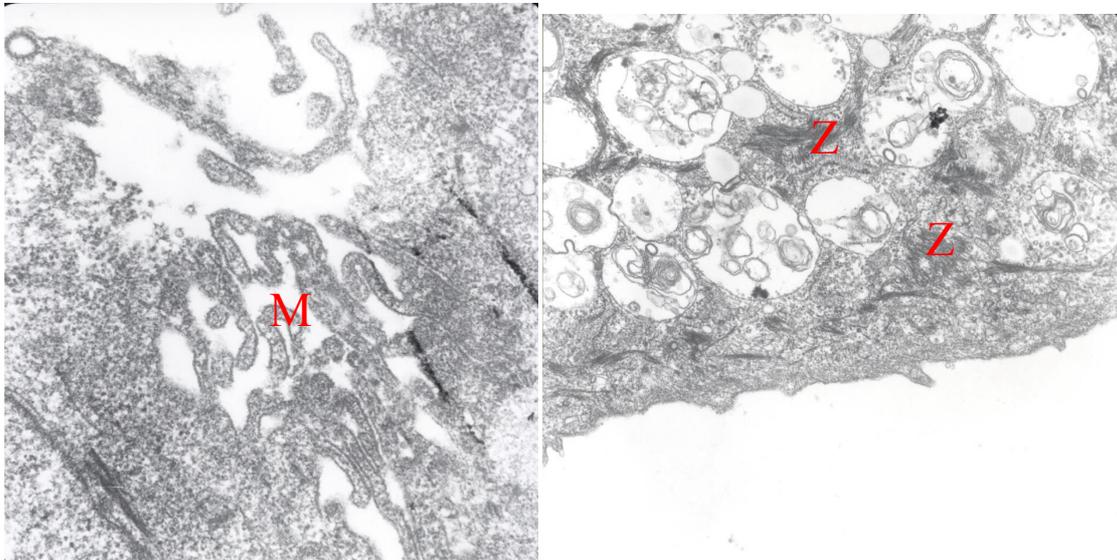


Abb.5: Elektronenmikroskopie NHBEC, linkes Bild membranöse Ausstülpungen in Form von Mikrovilli (M) 30000 x, rechtes Bild Zytokeratinfilamente (Z) 20000 x

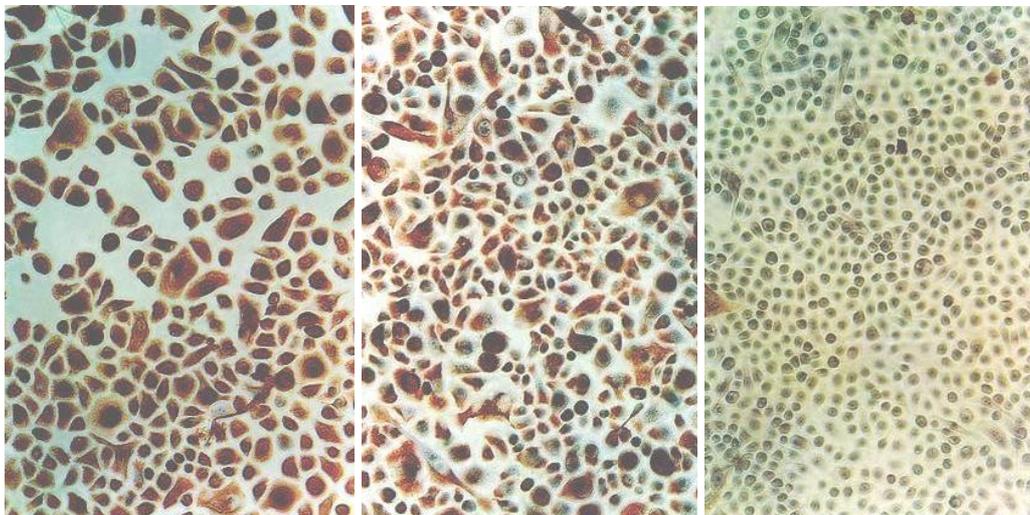


Abb.6: Immunhistochemische Detektion von Zytokeratin (linkes Bild), CK8/18 (Mitte) und Vimentin (rechtes Bild), für Zytokeratin und CK8/18 konnte eine flächenhaft positive Reaktion (rotbraune zytosolische Färbung) gezeigt werden, für Vimentin konnten nur punktuelle Reaktionen gefunden werden; 25 x

CK18 und CK19 waren m.H. der Westernblotanalytik detektierbar. Abb.7 dokumentiert, daß CK18 durch variables Auftreten imponiert. Für CK19 konnte eine konstitutive Proteinexpression festgestellt werden, wie es Abb.8 zeigt.

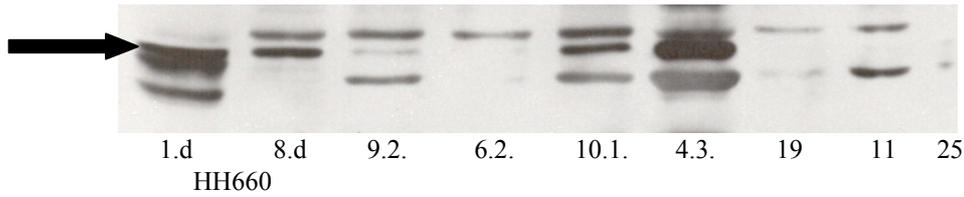


Abb.7: Westernblotanalytik des CK18 bei NHBEC und NHBE, Positivkontrolle HH660 1.d und 8.d

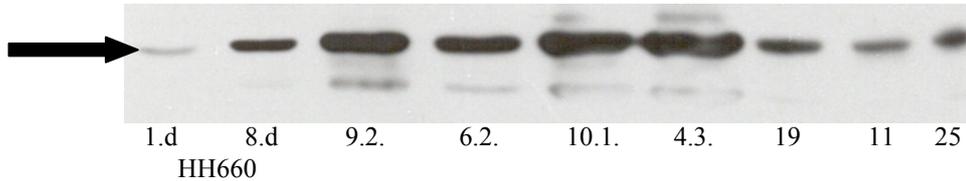


Abb.8: Westernblotanalytik des CK19 bei NHBEC und NHBE, Positivkontrolle HH660 1.d und 8.d

ID	11	19	25	4.3.	6.2.	9.2.	10.1.
CK18	n	n	n	p	n	p	p
CK19	p	p	p	p	p	p	p

Tab.5: Auswertung und Zusammenfassung der Westernblotanalytik von CK18 und CK19 bei NHBEC und NHBE, positive (p) und negative (n) Signale wurden erfasst. Proben-ID s. 3.1.1

### 3.2 Die Expression der Cytochrom-P450-Isoformen in der Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen

#### 3.2.1 Die Cytochrom-P450E1-Proteinexpression

Für CYP2E1 konnte im frischen NHBE immer ein Signal erzielt werden. Auch für einen peripheren Lungenabschnitt 18L war das Enzym detektierbar. Im Gegensatz dazu war die CYP2E1-Proteinexpression im Kulturverlauf bis auf die positive Ausnahme 4.3. immer negativ.

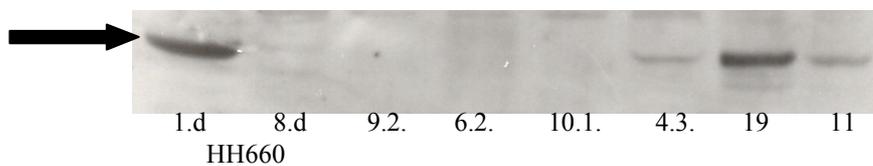


Abb.9: Westernblotanalytik des CYP2E1, NHBEC und NHBE, Positivkontrolle HH660 1.d und 8.d

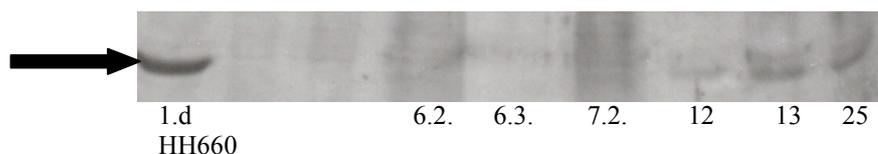


Abb.10: Westernblotanalytik des CYP2E1, NHBEC und NHBE, Positivkontrolle HH660 1.d

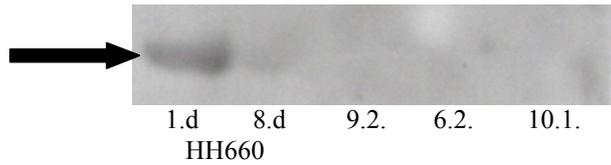


Abb.11: Westernblotanalytik des CYP2E1 für NHBEC, Positivkontrolle HH660 1.d und 8.d

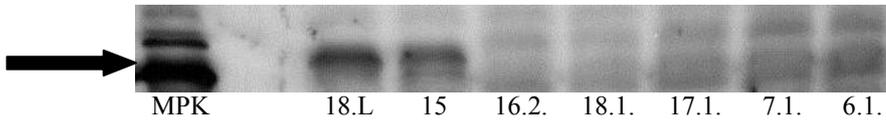


Abb.12: Westernblotanalytik des CYP2E1 für NHBEC und NHBE, mikrosomale CYP2E1-positive Kontrolle (MPK), 18.L war eine Probe des peripheren Lungengewebes

ID	11	12	13	15	19	25	18L
CYP2E1	p	p	p	p	p	p	p

ID	4.3.	6.1.	6.2.	6.3.	7.1.	9.1.	9.2.	9.3.	10.1.	16.2.	17.1.	18.1.
CYP2E1	p	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n

Tab.6: Auswertung und Zusammenfassung der Westernblotanalytik von CYP2E1, die obere Tabelle beinhaltet die Ergebnisse für frisches NHBE mit der peripheren Probe 18L, die untere Tabelle nimmt die Ergebnisse der Kultur auf. Positive (p) und negative (n) Signale wurden erfasst. Proben-ID s. 3.1.1

### 3.2.2 Die mRNA-Expression der Cytochrom-P450-Isoformen 2E1, 2B7, 2F1 und 4B1

Im Rahmen der RT/PCR konnte für CYP2E1mRNA ein konstitutives Auftreten bis auf die Peripherieprobe 0 festgestellt werden. CYP2B7mRNA war in allen Proben detektierbar. CYP2F1mRNA war nur in der Peripherieprobe 0 nachzuweisen. CYP4B1mRNA wurde in keiner Probe exprimiert.

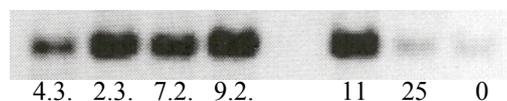


Abb.13: RT-PCR CYP2B7 von NHBEC und NHBE

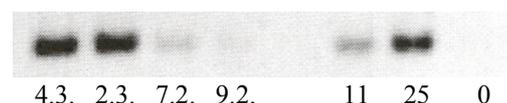


Abb.14: RT-PCR CYP2E1 von NHBEC und NHBE

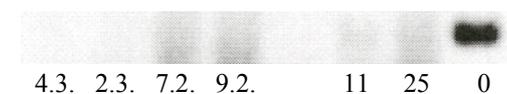


Abb.15: RT-PCR CYP2F1 von NHBEC und NHBE



Abb.16: RT-PCR CYP4B1 von NHBEC und NHBE



Abb.17:RT-PCR  $\beta$ -Actin von NHBEC und NHBE

4.3. 2.3. 7.2. 9.2. 11 25 0

	0	11	25	2.3.	4.3.	7.2.	9.2.
CYP2B7	p	p	p	p	p	p	p
CYP2E1	n	p	p	p	p	p	(p)
CYP2F1	p	n	n	n	n	n	n
CYP4B1	n	n	n	n	n	n	n

Tab.7: Auswertung und Zusammenfassung der RT/PCR der CYP-Isomere von NHBEC und NHBE. Positive (p) und negative (n) Signale wurden erfaßt. Proben-ID s. 3.1.1

### 3.2.3 CYP2E1-Aktivitäten im Chlorzoxazonassay

Das NHBE von drei Proben 21, 22 und 23 wurde mit 40mM Ethanol über vier Tage bei täglichem Medienwechsel inkubiert. Bei Probe 24 (Kontrolle) wurde der tägliche Medienwechsel ohne Ethanolzusatz durchgeführt. Im BgVV wurde die Aktivitätsmessung durchgeführt. In der Kontrolle ist eine Verdopplung des CYP2E1-spezifischen CLX-Umsatzes zu verzeichnen. Nachdem für die Proben 22 und 23 anfänglich keine Aktivität zu verzeichnen war, konnten nach 96h wieder Aktivitätswerte festgestellt werden. Probe 21 zeigte im Vier-tagesverlauf eine stetige Steigerung des CLX-Umsatzes. Durch Einwirkung von 40mM Ethanol konnte hier die höchste Vervielfältigung der CYP2E1-Aktivität nach 96h um den Faktor 4,65 im Vergleich zum Frischgewebe notiert werden.

ID	21(+40mM E)	22(+40mM E)	23(+40mM E)	24(-40mM E)
t[h]	a[pmol/minmg]	a[pmol/minmg]	a[pmol/minmg]	a[pmol/minmg]
0	1,1	n.m.	n.m.	0,6
24	1,81	n.d.	n.d.	n.d.
48	2,19	n.d.	n.d.	n.d.
72	3,17	n.d.	n.d.	n.d.
96	5,12	1,21	0,5	1,3

Tab.8: CYP2E1-Aktivitätswerte der Proben mit (+40mM E) und ohne=Kontrolle (-40mM E) 40mM Ethanolgabe in Abhängigkeit von der Einwirkzeit im CLX-Assay. Nicht meßbare (n.m.) Beträge und aus verfahrenstechnischen Gründen nicht durchgeführte (n.d.) Messungen wurden gekennzeichnet. Proben-ID s. 3.1.1

### 3.3 Normale humane Bronchialepithelzellen in Gentoxizitätsuntersuchungen

#### 3.3.1 Der Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung

Der Anteil der nicht membrangeschädigten, also vitalen Zellen wurde prozentual den einzelnen Testkonzentrationen nach 24h Inkubation gegenübergestellt. Die Zytotoxizität stieg mit zunehmender Testkonzentration an. Diese Kontrolle wurde durchgeführt, um eine Überlagerung von Zytotoxizitätseffekten auf die Gentoxizitätsuntersuchungen auszuschließen. Exemplarisch wurde in Abb.19 die längste Einwirkzeit des KSG dargestellt, weil hier die potentiell höchstmögliche zytotoxische Schädigung zu erwarten war.

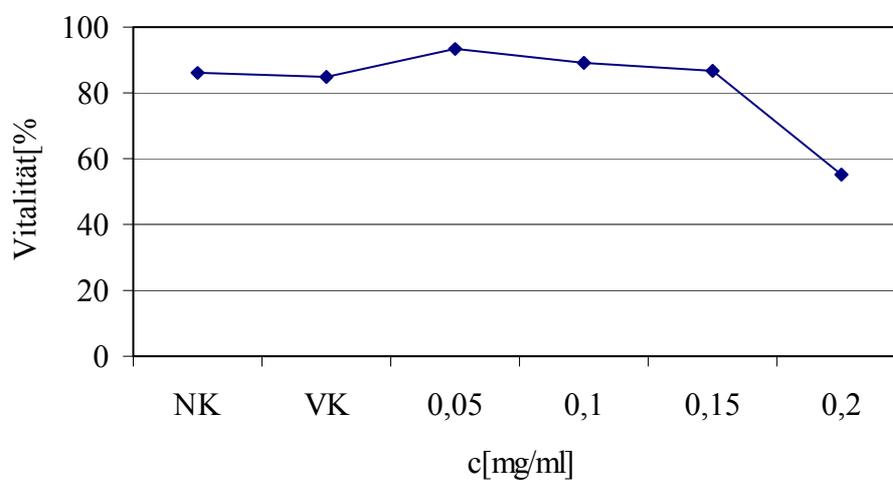


Abb.18: Die Vitalitätswerte nach 24h Inkubation der NHBEZ sind der Negativkontrolle (NK), der Vehikelkontrolle (VK) und den Testkonzentrationen des KSG zugeordnet. Vital sind jene Zellen, die keine Membranschädigung davontrugen.

#### 3.3.2 Normale humane Bronchialepithelzellen im Cometassay

Im Cometassay, in den Abbildungen 19 und 20 sind Beispiele für die Visualisierung von Kometen dargestellt, konnte für NHBEZ eine Zunahme der Kometenschweiflänge in Abhängigkeit von der Testkonzentration und der Einwirkzeit des KSG festgestellt werden. Dieser Sachverhalt wurde je Versuchsansatz, mit Ausnahme für den 24h-Versuch, in zwei Diagrammen in den Abb. 21 bis 26 veranschaulicht. Zum einen wurde die Verteilung der Anzahl der Kometenschweiflängen der Testkonzentration zugeordnet. Zum anderen wurden die Mittelwerte der Kometenschweiflängen mit der Standardabweichung den Testkonzentrationen des jeweiligen Versuchsansatzes beigefügt. Für den 24h-Versuch wurde nur diese Form der Darstellung gewählt. Die Zunahme der Kometenschweiflänge für die jeweilige Testkonzentration war im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant für jede Behandlungsdauer bereits ab der kleinsten Testkonzentration. Bei den Versuchen zur externen Meta-

bolisierung konnte für die Proben, die mit und ohne S9-Mix inkubiert wurden, innerhalb einer Testkonzentration kein signifikanter Unterschied gemessen werden.

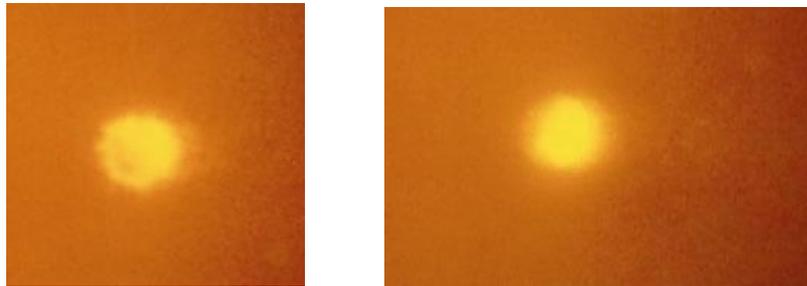


Abb.19: NHBEC im Cometassay nach 2h Behandlungszeit. Linkes Bild: ohne Zusatz des KSG: Negativkontrolle. Rechtes Bild: mit Zusatz des Lösungsvermittlers DMSO ohne Zusatz des KSG: Vehikelkontrolle. 40x

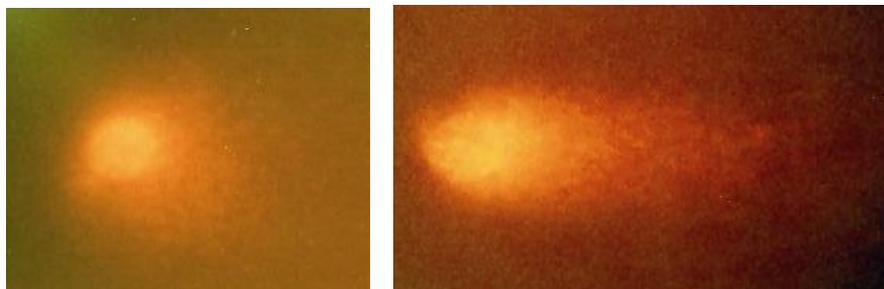


Abb.20: NHBEC im Cometassay nach 2h Behandlungszeit. Linkes Bild: mit Zusatz des KSG in einer Konzentration von 0,02 mgml<sup>-1</sup>.Rechtes Bild: mit Zusatz des KSG in einer Konzentration von 0,16 mgml<sup>-1</sup>. 40x

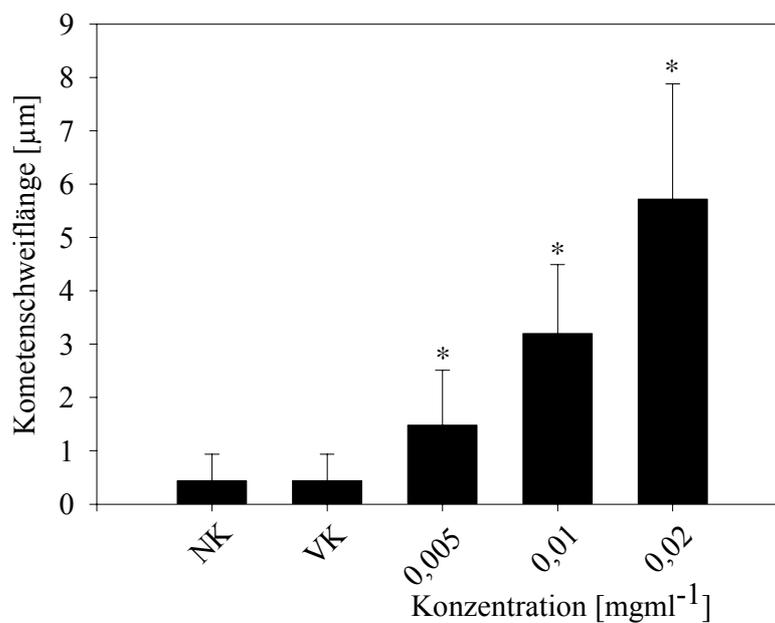


Abb.21: Korrelation zwischen mittlerer Kometenschweiflänge und Negativ- (NK) und Vehikel- (VK) Kontrolle und Testkonzentration des KSG nach 24h Behandlungsdauer bei NHBEC; \*:  $p \leq 0,05$ ; Student-t-Test; Mittelwert  $\pm$  SD

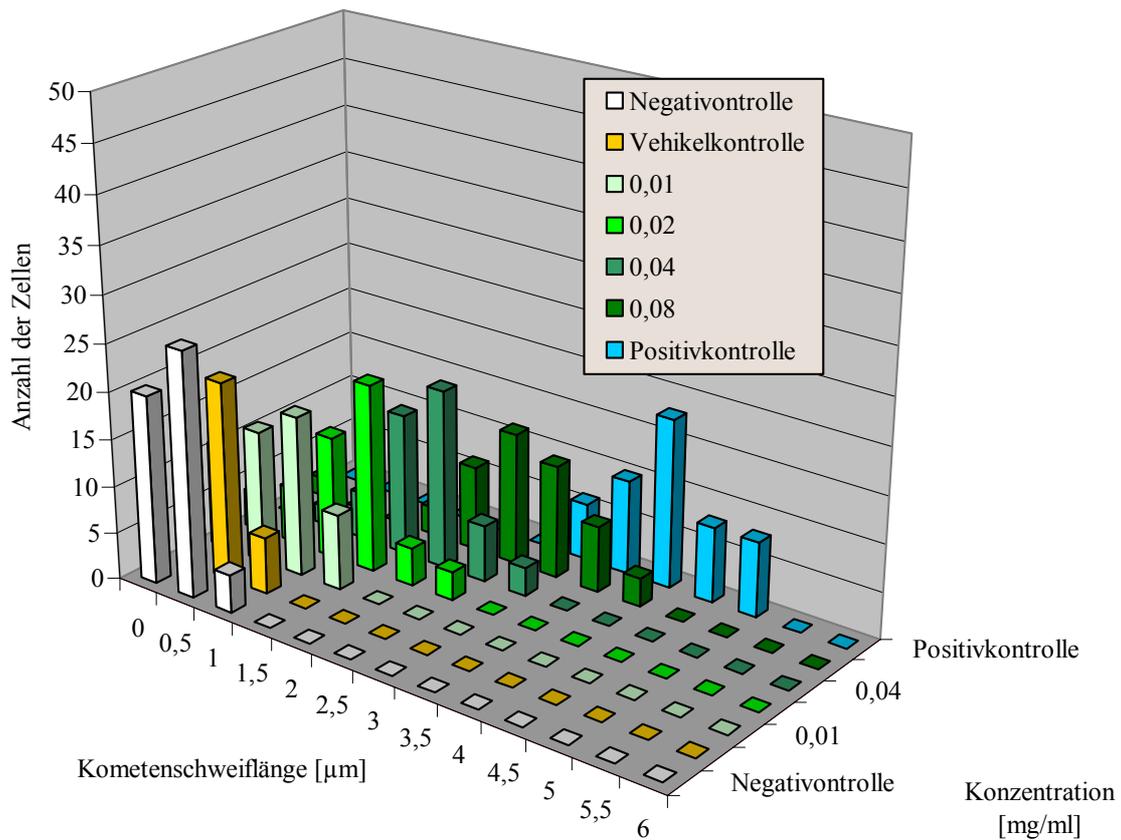


Abb.22: Verteilung der Kometenschweiflängen in Abhängigkeit von der Testkonzentration des KSG nach 1h Behandlungsdauer bei NHBEC, mitgeführt wurde eine Kontrolle für den Lösungsvermittler DMSO (Vehikelkontrolle) sowie eine Verfahrenskontrolle mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Positivkontrolle)

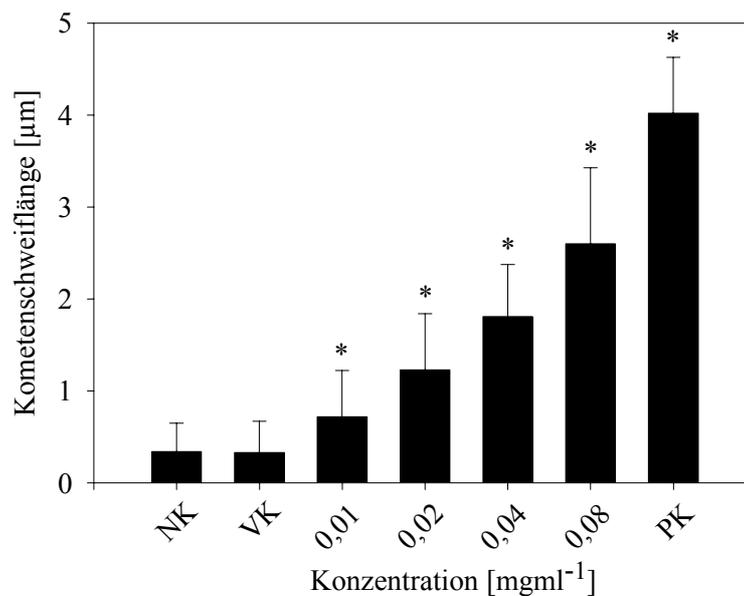


Abb.23: Korrelation zwischen mittlerer Kometenschweiflänge und Negativ- (NK), Vehikel- (VK), Positivkontrolle (PK) und Testkonzentration des KSG nach 1h Behandlungsdauer bei NHBEC; \*:  $p \leq 0,05$ ; Student-t-Test; Mittelwert  $\pm$  SD

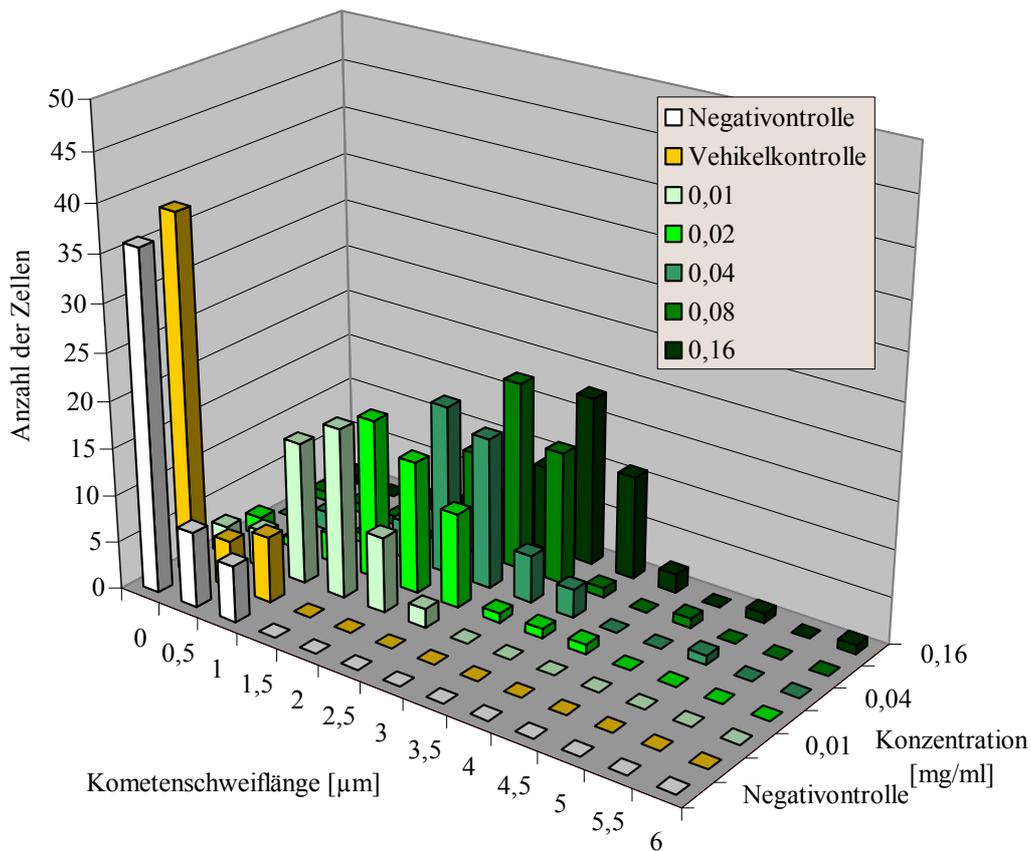


Abb.24: Verteilung der Kometenschweiflängen in Abhängigkeit von der Testkonzentration des KSG nach 2h Behandlungsdauer bei NHBEC, mitgeführt wurde eine Kontrolle für den Lösungsvermittler DMSO (Vehikelkontrolle)

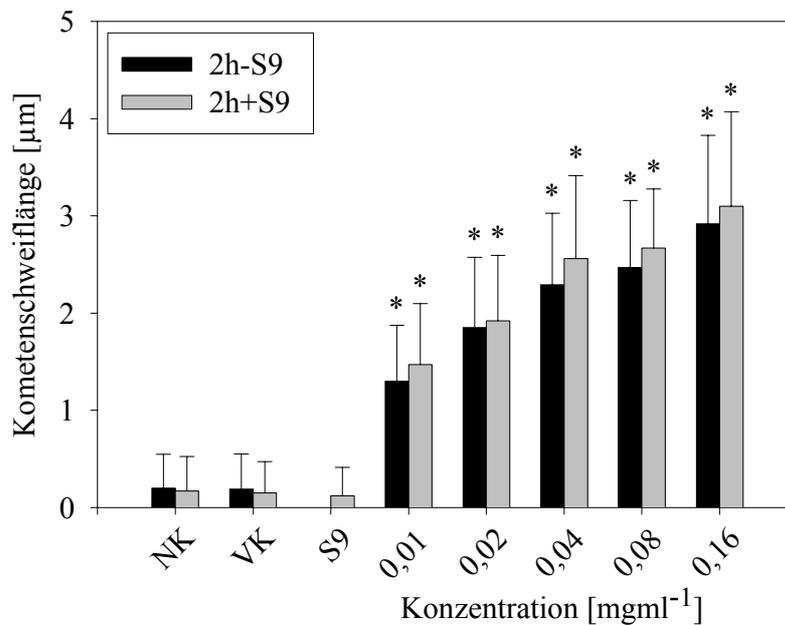


Abb.25: Korrelation zwischen mittlerer Kometenschweiflänge und Negativ- (NK), Vehikel- (VK), S9-Mix- (S9) Kontrolle und Testkonzentration des KSG ohne und mit Zusatz des S9-Mix nach 2h Behandlungsdauer bei NHBEC -Mittelwertvergleich-; \*:  $p \leq 0,05$ ; Student-t-Test; Mittelwert  $\pm$  SD

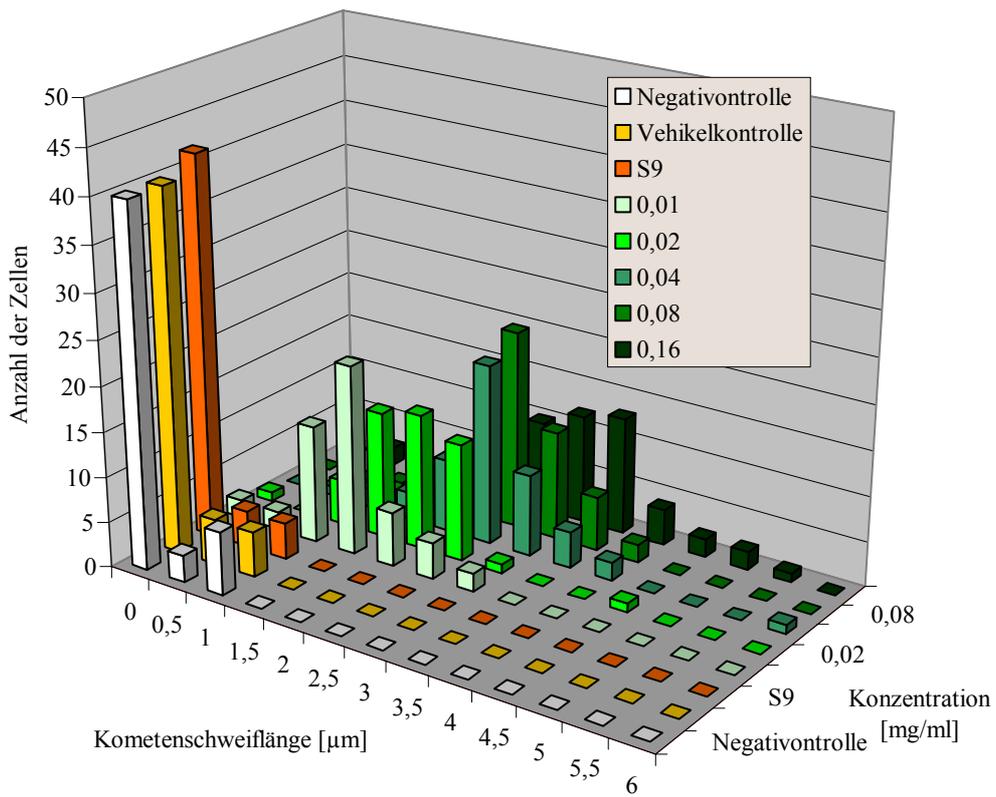


Abb.26: Verteilung der Kometenschweiflängen in Abhängigkeit von der Testkonzentration des KSG unter Zusatz des S9-Mixes nach 2h Behandlungsdauer bei NHBE, mitgeführt wurde eine Kontrolle für den Lösungsvermittler DMSO (Vehikelkontrolle) sowie eine Kontrolle für den S9-Mix (S9)

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen**

#### **4.1.1 Die Materialgewinnung**

Mit der Etablierung der Kultur NHBEC an unserem Institut ist es gelungen, ein in-vitro-Modell des humanen Bronchialepithels zu installieren. Es ist von Vorteil, daß Resektionsmaterial direkt im OP-Saal gewonnen werden konnte. Dadurch beschränkte sich die Ischämie und Kühlzeit lediglich auf den Transport in das Institut. Die Anwendung des Transportmediums L15 trägt wesentlich zum Schutz des Gewebes vor einer irreversiblen Schädigung bei. Lechner et al. standen nur postmortales Sektionsmaterial zur Verfügung [65,66]. Der Nachteil postmortaler Resektate besteht in der stattgefundenen anoxischen Belastung. Dabei wurde beispielsweise die Degradation von Membranphospholipiden beschrieben, was eine irreversible Zellschädigung begründet [28].

#### **4.1.2 Serumfreiheit als Selektionskriterium**

Durch die Schaffung spezifischer Kulturbedingungen, wie die Anwendung serumfreier Medien oder die Beschichtung der Kulturschalenoberfläche mit adhärenzoptimierenden Komponenten, ist die selektive Aussaat der NHBEC erzielbar. Nachdem anfänglich ein serumfreies Medium in Anlehnung an das LHC-9-Medium, das NHBECM selbst hergestellt wurde, gingen wir später zu einem kommerziell erhältlichen Medium, dem epith-o-ser® über. Laut Hersteller handelt es sich beim epith-o-ser® ebenfalls um ein Medium, das sich an der LHC-9-Rezeptur orientiert.

Vor allem die Kultivierung im serumfreien Milieu ist der entscheidende Proliferationsvorteil für die NHBEC. In einem dosisabhängigen Verhältnis reduziert die Zugabe von Human- oder Rinderserum die Auswachsrate von NHBEC. Robinson et al. quantifizierten die Kontamination durch andere Zellarten, v.a. Fibroblasten auf 10-20 % bei der Nutzung eines Kulturmediums auf DMEM-Basis unter Zusatz von 10 % humanem Serum [113]. Im Gegensatz dazu wachsen Bronchialkarzinomzelllinien unter serumfreien Bedingungen wenig oder gar nicht. Eher erhöht sich die Auswachsrate der Bronchialkarzinomzelllinien mit der Zunahme der Serumkonzentration im Medium [69].

Ein unerwünschter Nebeneffekt des Serumzusatzes ist die Förderung der Plattenepithelmeta-  
plasie bei NHBEC [67]. Als metaplasieauslösend wurden dabei Thrombozytenlysate beschrieben. Bei Zugabe eines kommerziell erhältlichen Thrombozytenwachstumsfaktors war eine Unterdrückung des Zellwachstums ohne Metaplasieinduktion nachweisbar. Im Gegen-

satz dazu war die Wachstumsrate bei humanen Fibroblasten erhöht und bei Bronchialkarzinomzelllinien nach Zugabe des Thrombozytenwachstumsfaktors unbeeinflusst. Es wird angenommen, daß die erhöhte Empfindlichkeit auf Metaplasieinduktoren mit der Karzinogenese vergesellschaftet sein könnte, da in vitro ein zunehmender Metaplasierungsgrad mit dem Karzinomrisiko korreliert [69].

TGF- $\beta$  im Serum ist für die Plattenepithelmetaplasie der NHBEC verantwortlich. NHBEC haben einen hochaffinen Rezeptor für TGF- $\beta$ . Folgende Prozeßgrößen der Plattenepithelmetaplasie wurden beeinflusst: Erhöhung der Membranvernetzungen, Erhöhung der extrazellulären Aktivität des Plasminogenaktivators, irreversible Hemmung der DNA-Synthese, Abnahme der Wachstumsrate, Vergrößerung der Zelloberfläche. Anti-TGF- $\beta$ -IgG verhindert sowohl die Inhibition der DNA-Synthese als auch die Plattenepithelmetaplasie, die durch TGF- $\beta$  oder Serum induziert wurde. Daher ist TGF- $\beta$  der hauptsächliche Metaplasiefaktor im Serum für NHBEC. TGF- $\beta$  hemmt die DNA-Synthese nicht von Bronchialkarzinomzelllinien, obwohl diese eine vergleichbare Anzahl an Rezeptoren mit entsprechender Affinität für diesen Faktor besitzen. Epinephrin antagonisiert die TGF- $\beta$ -vermittelte Inhibition der DNA-Synthese und auch die Plattenepithelmetaplasie in NHBEC. Epinephrin erhöht den cAMP-Level in NHBEC, TGF- $\beta$  beeinflusst den cAMP-Level nicht, weder in Anwesenheit noch beim Fehlen von Epinephrin. Epinephrin und TGF- $\beta$  scheinen, auf verschiedenen Wegen das Wachstum und die Differenzierung der NHBEC zu kontrollieren [79].

TGF- $\beta$  ist ein 25000 Dalton disulfidbrückenverbundenes Dimer, daß sowohl im physiologischen als auch im neoplastischen Gewebe vorkommt. Unter einem Prozent Serum erfolgt bereits die Wachstumsinhibition. TGF- $\beta$  könnte eine Rolle bei der Defektheilung von NHBE-Läsionen spielen. TGF- $\beta$  und Serum fördern das Tumorwachstum [78].

#### **4.1.3 Die Mediensupplementierung**

Ausschlaggebende für die Effizienz des Auswuchses der NHBEC ist die chemische Definiertheit des Mediums. Das kommerziell erhältliche MCDB153 entspricht in seinem Gehalt und den jeweiligen Konzentrationen an mineralischen Bestandteilen den Anforderungen des LHC-9-Mediums für ein optimales Grundmedium. So ist z.B. die Kalziumkonzentration des Mediums beibehalten worden. Eine 100 bis  $10^3$   $\mu$ M Kalziumkonzentration ist zwar für eine hohe Auswuchsdichte bestens geeignet, aber auf der anderen Seite darf eine 150  $\mu$ M Kalziumkonzentration nicht überschritten werden, da sonst indirekt, wahrscheinlich über einen bisher unbekanntem endogenen Faktor, eine Plattenepithelmetaplasie induziert wird [68].

Essentiell für eine gleichbleibend hohe Zellvermehrungsrate ist die Supplementierung mit entsprechenden Faktoren, wie Insulin, EGF, Hydrokortison, Phospho- und Ethanolamin. Für die Beschleunigung des Zellauswuchses ist die Zugabe von Rinderhypophysenextrakt, Epinephrin,  $T_3$  und Retinolsäure entscheidend [64]. Lechner und LaVeck entdeckten komplexe Interaktionen der Supplemente. So ist das Rinderhypophysenextrakt inaktiv wenn kein EGF vorhanden ist.  $T_3$  ist nicht wachstumsstimulierend, wenn nicht sowohl das Rinderhypophysenextrakt als auch EGF im Medium anwesend sind. Eine Erhöhung des cAMP-Gehaltes ist ebenfalls mit einer Wachstumsstimulation verbunden. Wobei durch die Zugabe des cAMP-Steigerers Epinephrin allein kein Wachstumseffekt zu verzeichnen ist. Auch hier stimuliert erst die Kombination mit EGF und Rinderhypophysenextrakt den Auswuchs [68].

Es wurde auch der Einfluß anderer Zellkultursupplemente und von luftgetragenen Fremdstoffen erforscht. So antagonisiert das Choleratoxin die inhibitorische Wirkung des Serums auf den Auswuchs von NHBEC.  $NiSO_4$  senkt den Auswuchs und fördert die Plattenepithelmetaplasie. Asbestfasern bewirken einen Abfall in der Auswuchsrate und konzentrationsabhängig eine Zytotoxizität, wobei die NHBEC 10-15-fach sensibler reagieren als die Fibroblasten des gleichen Spenders. Eine Phagozytose der Asbestfasern wurde beobachtet. Bereits eine einmalige Zugabe von Asbestfasern induzierte eine fokale Hyperplasie mit epidermaler Metaplasie und Zellatypien. Gastrin-Releasing-Faktor und Choriongonadotropin fördern das Wachstum von NHBEC. Außerdem konnte gezeigt werden, daß Tetradecanoylphorbolacetat, ein exogener metaplastischer Faktor, von Epinephrin antagonisiert wird [78].

Für die Inhibition der Proliferation und Organisation von humanen Bronchialepithelzellen in der Kultur konnte für Asbestfasern eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden [59]. Neben Asbestfasern behindern auch exogene Noxen wie Kondensate des Zigarettenrauches dosisabhängig die Entwicklung einer NHBEC-Kultur. Außerdem wurden Veränderungen in Richtung Plattenepithelmetaplasie beobachtet. NHBEC-Kulturen reagierten vergleichsweise sensitiver als analog behandelte Tumorzelllinien [83].

Saladino et al. untersuchten den Effekt von Peroxiden und Aldehyden auf das Wachstum und die Differenzierung von NHBEC. Die Einflüsse von Formaldehyd, Acetaldehyd, Benzoylperoxid und  $H_2O_2$  auf die Wachstumsrate, Induktion der Plattenepithelmetaplasie, DNA-Schädigung, Nukleinsäuresynthese und weitere Stoffwechselforgänge wurden untersucht. Kein Agens war mitogen. Eine Halbierung der Wachstumsrate von NHBEC konnte nach 6h-Exposition mit folgenden Konzentrationen der entsprechenden Agenzien demonstriert werden: 0,065 mM Benzoylperoxid, 0,21 mM Formaldehyd, 1,2 mM  $H_2O_2$ , 30 mM Acetaldehyd. Die Benzoylperoxidexpression begründet eine Halbierung der Zelldimension, wogegen die Acet-

aldehydexpression eine Zellgrößenverdreifachung verursacht. Alle Agentien verursachen eine Erhöhung der Formation von Membranvernetzungen, eine Unterdrückung der RNA-Synthese in größerem Umfang als die der DNA-Synthese. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Benzoylperoxid bedingen DNA-Einzelstrangbrüche, während Benzoylperoxid zusätzlich DNA-Protein-cross-links verursacht [116].

Siegfried und Nesnow kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie Lechner und LaVeck. Wenn kein EGF, Insulin und Hydrokortison dem Medium zugesetzt wurde, erfolgte kein Auswuchs. Wenn nur ein oder zwei dieser Komponenten fehlen, reduziert sich die Effizienz des Mediums um 50 bis 60 %. 0,1 %-iges Rinderhypothalamusextrakt verbesserte die Auswuchsrate [123].

Es konnten aber auch eine antagonistische Wirkungen der Mediensupplemente beispielsweise auf die Enzymexpression festgestellt werden. So stimuliert Hydrokortison die Phenol-sulfotransferaseexpression in Rinderbronchialepithelzellen in der Kultur. Retinolsäure hemmt diesen Prozeß [12].

In Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, daß nach Verringerung der Insulinkonzentration im Medium eine erhöhte xenobiotikavermittelte CYP2E1-Expression aber eine geringere Expressionen der Subfamilien CYP2B, CYP3A und CYP4A induziert wurden [144].

Für die Kultur von NHBEC in einem chemisch definierten Medium konnte in der Literatur übereinstimmend Diploidie ohne karyotypische Abnormitäten festgestellt werden [36,123].

#### **4.1.4 Die Adhärenzoptimierung**

Mit Fibronectin und Kollagen beschichtete Kulturschalen erhöhen die Auswuchsgeschwindigkeit im Vergleich zu reinen Plastikoberflächen. Das Gewebe heftet sich nach drei bis vier Tagen an der Beschichtung an und nach sieben bis zehn Tagen beginnt der Auswuchs [123].

Die beste Adhärenz bei Kulturschalenbeschichtungen zeigte Kollagen, gefolgt von Fibronectin, dann mit schlechterer Kulturentwicklung stehen am Ende Plastik und Laminin. Kollagen und Fibronectin sind physiologisch vorkommende Strukturproteine des bronchopulmonalen Interstitiums und der Basalmembranen, denen auch eine entscheidende Rolle bei der Reepithelialisierung entsprechender Gewebläsionen zugesprochen wird [100].

AII-Zellen können direkt an Fibronectin oder Laminin oder durch die Expression kollagenbindender Enzyme an eine entsprechende Matrix während der Primärkultur binden. Fibronectinhaltige Beschichtungen fördern die Anheftung und Ausbreitung von AII-Zellen bei Verlust von Differenzierung. Dabei ist eine spezifische Anheftungsdomäne des Fibronectinmoleküls bekannt. In der Primärzellkultur wurde beobachtet, daß AII-Zellen auf einer Kultur-

schalenplastikoberfläche eine biologisch aktive, fibronectinreiche, komplexe, extrazelluläre Matrix erzeugen. Fibronectin stimuliert deutlich die Zytokeratinexpression und hat damit Einfluß auf die Ausprägung eines Zytoskelettes in der Kultur. AII-Zellen exprimieren ebenfalls Kollagen [110].

Shoji et al. zeigten ebenfalls für NHBEC, daß diese eine Substanz synthetisieren und sie in Kultur sezernieren, die auf Lungenfibroblasten eine chemotaktische Wirkung ausübt. Diese Substanz wurde als Fibronectin indentifiziert. Der physiologische Sinn dieser Sekretion wird in der Steuerung der Interaktion der lumenauskleidenden Bronchialepithelzellen und der basalauskleidenden Fibroblastenfaktion gesehen [122].

Es ist anzunehmen, daß NHBEC mit ihrer Beschichtungsunterlage auch mechanisch wechselwirken können. In der Cokultur von NHBEC und Fibroblasten verstärken NHBEC den von Fibroblasten bekannten Kontraktionseffekt auf Kollagen-I-Gele [82]. Auch allein sind NHBEC in der Lage, Kollagen-I-Gele zu kontrahieren. Es wird vermutet, daß NHBEC im Rahmen von Reparaturvorgängen eine Remodellierungsfunktion der Bronchien besitzen [75].

#### **4.1.5 Der Vergleich der Kultivierungsmethoden**

Die reichhaltigen Erfahrungen zur Gewinnung spezifischer Zellpopulationen aus dem Kleintier, exemplarisch seien hier die Darstellung von Ratten-AII-Zellen oder Rattenhepatozyten aufgeführt, die an unserem Institut etabliert sind, führten konsequenterweise zu dem Versuch, durch einen enzymatischen Aufschluß der epithelialen Auskleidung des humanen Bronchialbaumes NHBEC zu selektieren. Die digestive Gewinnung differenzierter NHBEC war nicht erfolgreich. Der wesentliche Grund für dieses Ergebnis ist in den morphologischen Gegebenheiten des Bronchialbaumes zu sehen. Es ist zu berücksichtigen, daß sowohl die Methode nach Dobbs et al. als auch die Methode nach Robinson et al. auf die Gewinnung pulmonaler epithelialer Zellen ausgelegt war. Es handelte sich also um ein Zielgewebe, das morphologisch deutlich Unterschiede aufwies. Dobbs et al. und Robinson et al. gewannen enzymatisch eine pulmonale Zellpopulation, die sich flach auf einer Bindegewebsschicht ausstreckt [30,113]. Es mußten nur relativ oberflächlich interzelluläre Konnektionen aufgespalten werden. Im Gegensatz dazu finden wir im proximalen Bronchialbaum ein mehrreihiges, im Vergleich zur pulmonalen Peripherie sehr hohes Epithel, das enzymatisch schwer aufzuschließen ist. Es ist wahrscheinlich, daß eher eine Digestion der Zellen als der interzellulären Verbindungen stattfindet. Der Nachteil von Zellkulturen, die durch enzymatische Disaggregation gewonnen wurden, ist, daß im Gegensatz zu Explantkulturen nur Zellen zur Ver-

fügung stehen, die der Enzymdigestion widerstanden und sich auch noch anhefteten. Dieser unphysiologische Selektionsdruck entfällt im Explantmodell [28].

Verschiedene Autoren berichteten, daß in der Explantkultur von NHBEC der Auswuchs durch Basalzellen generiert wird. Dabei handelt es sich um Stammzellen mit hoher Reduplikationsrate und Pluripotenz im Bronchialepithel [150]. Siegfried et al. untersuchten die resezierten Stücke des NHBE und stellten fest, daß in der Explantkultur auf den Resektaten das differenzierte Bronchialepithel mit Ausnahme der Basalzellen im Verlaufe einiger Tage untergeht. Die Monolayer sind somit Teilungsprodukte der Basalzellen, vergleichbar der „Wundheilung“ [124]. Basalzellen sind die Progenitoren der NHBEC und in dieser Funktion möglicherweise Angriffspunkt für eine neoplastische Transformation [5]. Die Stammzellfunktion der Basalzellen in der Trachea und den Bronchien wird in den Bronchiolen den Clarazellen zugeschrieben [54,92].

#### **4.1.6 Die dargebotenen Charakteristika der kultivierten Zellen**

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen bewiesen den epithelialen Charakter der Kultur NHBEC durch den Nachweis von Mikrovilli, Tightjunctions und Desmosomen, da sich diese Charakteristika auch bei entsprechenden physiologischen bioptischen Materialien nachweisen lassen [28]. Eine Expression von Tightjunctions und Desmosomen ist an eine hohe Zelldichte gebunden. Ein Fehlen dieser Ausprägung ist durch die Subkonfluenz erklärbar [115].

Eine phänotypische Differenzierung der NHBEC zum Zilienbesatz konnte elektronenmikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Die wesentliche Ursache für das Fehlen eines Zilienbesatzes unter serumfreier Kultivierung scheint in den monophasischen Kulturbedingungen begründet. Verschiedene Arbeitsgruppen machten die Erfahrung, daß die getauchte, also monophasische Kultur der NHBEC mit einem Verlust ihres Zilienbesatzes einhergeht. Die sich entwickelnden Monolayer verlieren total und irreversibel interspezifisch ihren Zilienbesatz [2,45,53,70,85,136,147,149]. Die Ziliogenese wurde im Tierversuch in vivo bei Retransplantationsversuchen und in vitro in biphasischen Kammern, also bei der Kultivierung der Tracheobronchialzellen in einer Luft- Medium-Grenzschicht, bei Hamster- und Meerschwein-trachealepithelzellen beobachtet [141].

De Jong et al. kultivierten bioptisch gewonnenes humanes Bronchialepithel. In den getauchten Kulturen wurden lediglich zarte Mikrovilli exprimiert. Auch durch die Variation der Zelldichte war keine Zilienexpression induzierbar. Elektronenmikroskopisch waren nur rudimentäre Zilien zu sehen. In den monophasischen Kulturen waren Prozentriolen, Basalkörperchen

oder funktionsfähige Zilien nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu entwickelten die NHBEC unter biphasischen Bedingungen nach 21 Tagen eine physiologische ultrastrukturelle Zilienarchitektur. Nach 21 Tagen wurde die Kulturoberfläche an der Luft-Medium-Grenzschicht schleimig. Dies wurde dahingehend interpretiert, daß zehn Prozent der elektronenmikroskopisch nichtzilientragenden Zellen zu Becherzellen differenzierten. Durch biphasische Verhältnisse konnte der Zilienverlust in getauchten Kulturen überwunden werden. Es differenzierte sich ein mucoziläres Epithel. Die für die Ziliogenese wichtige Vitamin A-Supplementierung tritt zugunsten der biphasischen Kulturbedingungen in den Hintergrund. Auch ohne Vitamin A-Zusatz erfolgte eine mucoziläre Differenzierung bei der Kultivierung von NHBEC in einer Luft-Medium-Grenzschicht [146]. Auch die Beschichtung der Kulturschalen, also die Simulation einer Basalmembran, der getauchten Zellen, somit die Definierung des basalen Poles, bewirkte keine Zilienexprimierung. Möglicherweise fungiert unter biphasischen Bedingungen ein Substratgradient ebenfalls als Differenzierungsfaktor. Die Luftexposition scheint der wesentliche Faktor der hohen morphologischen Übereinstimmung des Modells mit der in-vivo-Situation zu sein. Ein wesentlicher Kritikpunkt des Modells ist aber die fetale in-vivo-Ziliogenese. Hier erfolgt die Ausprägung reifer Zilien in einem monophasischen flüssigen System. Es scheint doch ein bisher unbekannter biochemischer Zilieninduktionsfaktor zu existieren [24].

Gray et al. subkultivierten serumfrei kommerziell erhältliche NHBEC in einer Luft-Medium-Grenzschicht. Es wurde der Einfluß von EGF und Retinolsäure auf die Sekretionsleistung von NHBEC untersucht.  $25\text{ngml}^{-1}$  EGF, die fünffache von uns eingesetzte Konzentration, wirkt sich ungünstig auf das Wachstum, die Morphologie und die Muzinproduktion aus. Retinolsäure war für die mukoziliäre Differenzierung essentiell. Ohne Retinolsäure wurde das Epithel squamös metaplastisch und die Muzinsekretion verringerte sich drastisch. Im Gegensatz dazu ist die Lysozymproduktion im retinolsäurearmen Medium erhöht. In der zweiten bis dritten Passage stehen mukös und ziliär differenzierte NHBEC mit physiologischer Morphe zur Verfügung. Ab der dritten Passage nimmt der Differenzierungsgrad wieder ab [44].

Eine Ziliogenese ist möglicherweise durch den Serumeinsatz induzierbar. Dies geht natürlich auf Kosten der Reinheit der Kultur, da eine Fibroblastenkontamination zwangsläufig ist. Die Arbeitsgruppe Kitamura et al. nutzte Resektionsmaterial von Lungenpatienten. Es wurde peripheres Bronchialgewebe, bereits aus der bronchiolären Region kultiviert. Es wurde die Differenzierung in zilientragende und sekretorische Zellen als Abhängigkeit von Serumzusätzen im Kulturmedium postuliert. Optimal sei ein einprozentiger FKS-Zusatz. Nach zehn bis 14 Tagen wurde ein Auswuchs um die Explantstücke beobachtet. Unter serumfreien Beding-

ungen verlief der Auswuchs spärlicher. Bei drei und fünf Prozent FKS war eine deutliche Fibroblastenkontamination zu verzeichnen. Auch bei einem Prozent FKS war eine Fibroblastenverunreinigung nachweisbar. Unter serumfreien Kulturbedingungen wurde der Fibroblastenauswuchs vollständig gehemmt. Es wurde für ein Prozent FKS ein Optimum im Verhältnis von reichhaltigem NHBEC-Auswuchs und tolerabler Fibroblastenkontamination gesehen. Nach 28 Tagen wurde ein Maximum in Bezug auf die Zellzahl bestimmt. Nach 28 Tagen wurde auch unter einem Prozent FKS fast immer ein Zilienbesatz festgestellt. Auch eine sekretorische Differenzierung wurde ermittelt. Ebenso waren Mikrovilli bei Zilien- und Sekretionszellen nachweisbar. Unter serumfreien Bedingungen wurde keine mukoziliäre Differenzierung beobachtet. Das Serumsupplement bewirkte keine Unterschiede bei der letztlichen Gesamtzellzahl. Nach dem Entfernen des Explantates wurde die Zellreplikation durch Serumzusatz nicht beeinflusst. Lechner zeigte, daß der Serumzusatz eine Plattenepithelmeta- plasie hervorruft. Unterschiede in der Medienzusammensetzung und in der Lokalisation der Explantate wurden für diese Diskrepanz verantwortlich gemacht [56].

Die Arbeitsgruppe um Stoner kultivierte Patientenresektate unter Nutzung hitzeinaktivierten Serums und Zusatz weiterer Hilfsstoffe. Eine Zilienaktivität konnte über sechs Monate beobachtet werden. Es wurde festgestellt, daß Zilienbewegungen von der Anwesenheit des Explantates abhängig waren: 24 Stunden nach Entfernung des Explantates versiegte die Zilienschlagaktivität. Häufig wurde lediglich eine Zilienschlagaktivität am Epithel des Ex- plantates aber nicht an den ausgewachsenen Zellen beobachtet. Die Zilienexpression im Auswuchs war ungleichmäßig. Die Ziliendichte in Explantatnähe war größer als in der Peripherie. Analog dazu waren die Zilienbewegungen von Zellen in Explantatnähe kräftiger als jene der mehr peripher gelegenen Zellen. Mit zunehmenden Alter der Kultur nahm die Zilienmotilität ab [127].

Falls ein ziliärer Phänotyp für experimentelle Fragestellungen notwendig ist, wie es bei der vorliegenden Arbeit nicht der Fall war, ergibt sich in der Übersicht der Veröffentlichungen zur Ziliogenese von NHBEC die Notwendigkeit zur Anwendung einer Methode, bei der eine Luft-Medium-Grenzschicht realisiert wurde, da die Ziliengenerierung durch den Serumeinsatz immer mit einer Fibroblastenkontamination erkaufte wird. Mittlerweile gibt es Systeme, die eine aerogene Applikation von Fremdstoffen an einer Luft-Medium-Grenzschicht realisieren [4].

Die Originarität der NHBEC mußte nachgewiesen werden. Uns stellte sich die Frage, ob es sich bei der Kultur unserer Zellpopulation tatsächlich um bronchoepitheliale Zellen handelte.

Wenn ja, war zu klären, ob großflächige Verunreinigungen mit anderen Zelltypen die Interpretation von experimentellen Daten in Bezug auf NHBEC erschweren oder nicht zulassen.

Die Literatur zeigt einige Möglichkeiten des Nachweises des epithelialen Charakters NHBEC auf.

Die Arbeitsgruppen um Stoner et al. und Siegfried et al. demonstrierten an NHBEC verschiedene epitheliale Charakteristika. NHBEC exprimieren Keratin, Intermediärfilamente, Desmosomen und A- und B-Blutgruppenantigene, die sich immunhistochemisch nachweisen ließen [123,127]. Dabei ist der immunhistochemische Nachweis des Zytokeratins zur Darstellung des epithelialen Charakters bronchialer Zellen sensitiver als konventionelle Anfärbungen wie die May-Grunwald-Giemsa-Färbung [32]. Vor allem der Zytokeratinnachweis eignet sich zu einer Abgrenzung von der Fibroblastenfraction [36].

So konnte gezeigt werden, daß bei bronchoskopisch gewonnenen kultivierten Resektaten des NHBEC die Zytokeratinexpression sich in der Kultur nicht hinsichtlich der Kulturbedingungen und der in-vivo-Situation unterschied. Für die Detektion der Zytokeratinexpression spricht auch, daß diese unabhängig von mono- oder biphasischen Kulturbedingungen ist [25]. Der epitheliale Marker CK18 ist in einfachen Epithelien nachweisbar, z.B. im respiratorischen aber nicht im Plattenepithel [112].

CK 8, CK 18 und CK 19 sind spezifische Komponenten des Zytoskelettes der Epithelien, wie auch des Bronchialepithels [29,50,102,131]. Diese epithelialen Marker können auch zum Nachweis von Neoplasmen epithelialen Ursprungs dienen, da diese häufig auch Zytokeratin exprimieren [129]. Bereits in der sechsten Schwangerschaftswoche ist die Zytokeratinexpression in der fetalen Lunge immunhistochemisch nachweisbar. Dabei werden sie an den Zellmembranen gefunden. Mit zunehmender Differenzierung des alveolären Epithels verändert sich die Zytokeratinexpression in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge. Beispielsweise entwickeln die Mesothelzellen ein ähnliches Zytokeratinmuster wie die Bronchialepithelzellen. Während der Lungenorganogenese gleicht sich das Zytokeratinspektrum allmählich dem Expressionsmuster der Erwachsenen an [14].

Für die jeweiligen epithelialen Typen gibt es spezifische Zytokeratinmuster. Für stratifizierte Plattenepithelien kann die Expression von CK1-6 und CK9-17 erwartet werden. Im Gegensatz dazu ist für Säulenepithelien wie das respiratorische Epithel die Expression von CK7, CK8 und CK18-20 typisch [84]. Nakajima et al. konnten CK19 in Bronchialepithelzellen immer detektieren [88]. Iyonaga et al. konnten auch in hyperplastischen AII-Zellen eine Expression von CK7, CK8 und CK19 finden [51]. Stosiek et al. demonstrierten für nasales respiratorisches Epithel, welches plattenepithelial metaplasiierte, einen Umschwung der Zyto-

keratinexpression auf immunhistochemischem und gelelektrophoretischem Wege. Bereits im zweiten Metaplasieschritt, dem stratifizierten Säulenepithel, wurden CK7, CK8, CK18 und CK19 rarefiziert. Es wurde weiter postuliert, daß die Plattenepithelmetaplasie im Grunde eine Metaplasie der Stammzellen, also Zellen, denen ein bimodales Entwicklungsprogramm inneohnt, darstellt. Bereits ein gradueller Verlust der respiratorischen Epitheldifferenzierung geht mit einem Verlust von CK7, CK8 und CK18 bei gleichzeitigem Erscheinen plattenepitheltypischer CK1, CK10 und CK13 einher. Die basalzelltypische CK19-Expression ist vom Metaplasieprozeß unbeeinflußt [128]. Barth et al. fanden für die Plattenepithelmetaplasie einen Verlust der CK7-Expression, was im physiologischen oder hyperplastischen respiratorischen Epithel nicht beobachtet wurde [6]. Schwerer et al. demonstrierten bei der Aufarbeitung sinonasaler Papillome im gesunden respiratorischen Säulenepithel eine unauffällige typische CK7-, CK8-, CK18- und CK19-Expression. Plattenepithelial metaplastisches tumorfreies Gewebe war für CK7, CK8, CK18 und CK19 negativ [120].

Neben der elektronenmikroskopischen Untersuchung der NHBEC wurde die Zytokeratinexpression der Zellen durch zwei weitere Verfahren, die immunhistologische Darstellung und den Nachweis im Westernblot gezeigt.

Die Immunhistologie wies nach, daß es sich bei unserer Kultur von NHBEC um einen Monolayer bronchoepithelialer Zellen handelte. Das konnte für die Zytokeratingesamtfraktion und für CK 8/18 demonstriert werden. Die Untersuchung mesenchymaler Verunreinigung unserer Kultur NHBEC durch die Gegenfärbung mit einem Marker, der ein charakteristisches Intermediärfilament mesenchymaler Zellen, das Vimentin detektiert, zeigte lediglich eine punktuelle Kontamination mit mesenchymalen Zellen. Diese minimale Kontamination ist <5% und hat keinen Einfluß auf die Interpretation von Daten, die NHBEC zur Grundlage haben.

Im Zuge der weiteren Charakterisierung der Kultur NHBEC mußte eine Besiedlung der Kulturschalen mit einer Zellart ausgeschlossen werden, die keinen bronchialepithelialen oder fibroblastösen Ursprung hat. Denkbar wären Zellpopulationen aus dem Stützsystem des Bronchus, also glatte Muskelzellen. Auch die Kultivierung und Anreicherung von Zellen der weißen Blutfraktion könnte erfolgen, da eine vollständige Ausblutung des Bronchialpräparates technisch nicht praktikabel erscheint. In der Literatur sind derartige Subkulturen in der Kultur von NHBEC bisher unter den gewählten Kulturbedingungen nicht beschrieben worden. Devalia et al. untersuchten diesen Sachverhalt. Die Gegenfärbung zum Ausschluß eines anderen zytologischen Ursprungs, z.B. gegen charakteristische Strukturen von Fibroblasten, Endothel-, Muskelzellen, Makrophagen und Lymphozyten blieb negativ [28]. Dies konnte auch für die Kultur NHBEC unseres Institutes demonstriert werden. Aus diesem Grunde

wurden von Frau Dr. Taege im Institut für Pathologie unserer Universität entsprechende spezifische Antigene dieser möglichen Kontamination der Kultur von NHBEC mit diesen etwaigen ungewollt proliferierenden Zellpopulationen auf immunhistochemischem Wege detektiert. Die Reaktionen waren negativ für Desmin (Antigen der glatten, Skelett- und Herzmuskelzellen), SMA (Antigen der glatten Muskelzellen), LCA (T-Zellen- und leukozytentypisches Antigen) und wiederholt Vimentin. Für CD68, einem Antigen der Monozyten und Makrophagen, wurden punktuelle Reaktionen detektiert. Es zeigte sich analog zur Detektion nach Fibroblasten ebenfalls ein <5%-ige Kontamination mit Monozyten/Makrophagen bei der immunhistochemischen Darstellung. Dabei ist bekannt, daß NHBEC den GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierender Faktor) sezernieren können [1]. Die Kultur NHBEC ist praktisch frei von glatten Muskelzellen, T-Zellen und Leukozyten. Es wurde ein weiterer Beleg für den bronchoepithelialen Charakter der Kultur durch eine positive immunhistochemische Reaktion auf CK7 gegeben.

In der Literatur gibt es keinen Hinweis auf die Expression neuraler und leukozytärer Antigene in NHBEC [36].

Die Expression von CK18 und CK19 in bronchialem Frischgewebe und in der Kultur der NHBEC haben wir im Westernblot analysiert. Für CK18 konnten wir im Frischgewebe kein Signal erzielen. In je einer Erst-, Zweit- und Drittexplantkultur von NHBEC ließ sich CK18-Protein nachweisen. Für die Zweitexplantkultur 6.2 war die Detektion nach CK18 negativ. Es scheint für CK18 ein interindividuelles Expressionsmuster zu geben.

Für CK19 war die Detektion sowohl im Frischgewebe als auch in der Erst-, Zweit- und Drittexplantkultur von NHBEC positiv. Für CK19 kann eine konstitutive Expression in NHBEC angenommen werden.

Allerdings mußte empirisch eine zunehmende Erschöpfung des Explantates bei zunehmender Verunreinigung mit Fibroblasten um den vierten Auswuchs festgestellt werden. Dabei handelt es sich um ein Phänomen, daß auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt wurde [112].

Nakamura et al. vermuteten, daß Bronchialepithelzellen eine peribronchiale Fibroblastenproliferation triggern können. Unter serumfreien Bedingungen war keine Fibroblastenproliferation zu verzeichnen. M.H. eines durch Rinderbronchialepithelzellen konditionierten Mediums war eine konzentrationsabhängige Stimulation humaner Fibroblasten möglich. Auch in der Cokultur von Bronchialepithelzellen und Fibroblasten wurde eine Fibroblastenproliferation gefördert. Der Gruppe gelang es leider nicht, eine bestimmte Substanz oder -gruppe für diese Fibroblastenstimulation zu benennen. Sie postulieren, daß bronchoepitheliale Zellen durch

ihre Fibroblastenmodulation eine aktive Rolle bei Krankheitsbildern wie der chronischen Bronchitis und der peribronchialen Fibrose spielen [90].

## **4.2 Die Auswertung der Cytochrom-P450-Expression der kultivierten Zellen**

Inhalativ aufgenommene Xenobiotika stehen in Verdacht, inflammatorische und kanzerogene Reaktionen zu verursachen. Kritische Schritte bei der Aktivierung prä- und kanzerogener Stoffe ist die CYP-vermittelte Metabolisierung innerhalb der Zielgewebe. Die Fähigkeit, verschiedener CYP-Isoformen, xenobiotische Kanzerogene zu metabolisieren, ist Gegenstand intensiver Forschung.

### **4.2.1 Die Entwicklung der Cytochrom-P450-Expression auf der Ebene der Proteine und mRNA**

Eingedenk der relativen Schwierigkeit und Aufwendigkeit der primären Kultur NHBEC wurde in der Vergangenheit von verschiedenen Arbeitsgruppen ein Ersatzmodell für des humane bronchopulmonale System gesucht, welches möglicherweise klinisch praktikabler wäre. Piipari et al. postulierten, daß m.H. bronchoskopisch gewonnener bronchoalveolärer Makrophagen eine Aussage zum bronchopneumokarzinogenen Risikoprofil zu drei prokarzinogenkatalysierenden CYP, nämlich CYP1A1, CYP1B1 und CYP3A, getroffen werden kann. Sie detektierten das Vorhandensein von PAH-Metaboliten in humanen bronchoalveolären Makrophagen bei aktiven Rauchern. Damit war eine Erhöhung von PAH-DNA-Addukten vergesellschaftet und eine Induktion der CYP3A-Subfamilie, während CYP1A1 und CYP1B1 unauffällig blieben [104].

Die Arbeitsgruppe um Raunio detektierte m.H. der RT/PCR verschiedene CYP-Isoformen im Lungengewebe, in bronchoalveolärer Makrophagen und in Lymphozyten des peripheren Blutes. Es ergaben sich interessante Verteilungsmuster. CYP1A2 war in keinem Gewebe detektierbar. CYP1A1 war nur im Pool der aktiven Raucher im Lungengewebe detektierbar. Im Gesamtlungengewebe waren CYP1A1, CYP2B6/7, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A5 und CYP4B1 konstitutiv detektierbar. In den bronchoalveolären Makrophagen waren CYP2B6/7, CYP2C, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A5 und CYP4B1 immer nachweisbar. CYP2B6, CYP2B7, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A5 und CYP4B1 konnten im Raucher-, Nicht- und Exraucherpool in allen untersuchten Kompartimenten, ausgenommen von CYP2F1 in Lymphozyten, allerdings bei unterschiedlichen Verteilungsmustern nachgewiesen werden. Es wurden bei der Expression von CYP2B6, CYP2B7, CYP2E1, CYP2F1 und CYP4B1 einige Gemeinsamkeiten zwischen peripherem Lungengewebe und bronchoalveolären Makrophagen festgestellt. CYP2E1mRNA war die einzige Isoform, die in allen drei Kompartimenten detektierbar war.

Vor allem klinisch bedeutsam ist das Resultat, daß das CYP-Verteilungsmuster in den Lymphozyten nicht mit der Situation in der Lunge korreliert und somit bislang keine Hoffnung besteht, einen einfach zu gewinnenden Marker für das pulmonale Risiko zu finden [48,111].

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte die A549 auf ihre CYPmRNA-Expression mit Hilfe der RT/PCR. CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6, CYP2C, CYP2E1, CYP3A5 und CYP3A7 waren und CYP1A2, CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2F1, CYP3A4 und CYP4B1 waren nicht nachweisbar. Induktionsversuche ergaben mit Tetrachlordibenzodioxin für CYP1A1 eine 56-fache und CYP1B1 2,5-fache mRNA-Erhöhung. Dies zeigt, daß A549 ein Modell für Induktionsversuche darstellt [49].

Mace et al. gewannen bronchiales und Lungengewebe von karzinomfreien Verstorbenen. Die CYPmRNA-Expression wurde m.H. der RT/PCR untersucht. In den bronchialen Proben waren immer CYP1A1, CYP2C8, CYP2C18, in 85% CYP2A6 und CYP2B6, in 50% CYP2E1, in 90% CYP3A5 nachweisbar. Nicht gefunden wurden CYP1A2, CYP2D6 und CYP3A4. In der anschließenden serumfreien Kultur wurden schwächere Signale als in der Nativprobe vorgefunden. Im peripheren Lungengewebe waren CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C18, CYP2E1, CYP3A4 und CYP3A5 nachweisbar. Nicht gefunden wurde CYP2D6. Im Vergleich zur mRNA-Expression wurden die Proteine im peripheren Lungengewebe für CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1, CYP3A4 und CYP3A5 untersucht, wobei nur die Suche nach CYP2A6 erfolglos war. Die Ergebnisse zeigen die heterogene Verteilung der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme im Bronchus und in der peripheren Lunge und bestätigen die Indizien für die Rolle der Lunge als Aktivator und Metabolisator für Prokarzinogene [76].

Immunhistochemische Färbung bestätigen die Ergebnisse von Mace in Bezug auf CYP3A. Das humane Lungengewebe war positiv für CYP3A5 in zilienträgenden, mucösen, Drüsen-, Säulen-, kuboiden, Alveolartyp I/II-, Alveolarmakrophagen- und Gefäßepithelzellen und positiv für CYP3A4 in Drüsen-, Säulen-, Alveolartyp II-zellen und Alveolarmakrophagen. CYP3A5 ist die dominante Isoform der CYP3A-Subfamilie in der humanen Lunge [3].

Botto et al. konnten Unterschiede in der CYP2E1-Expression im Bronchialkarzinom- und tumorfreien Gewebe desselben Patienten demonstrieren. In den Tumorzellen wurde auf Grund einer Hypomethylierung des CYP2E1-Genes eine Hypoexpression des CYP2E1-Genes festgestellt, die sich sowohl im reduzierten mRNA- und Proteinniveau, als auch in einer verminderten CYP2E1-Aktivität widerspiegelte, verglichen zum gesunden Gewebe des selben Patienten [15].

CYP2B7 und CYP 4B1 wurden mittels PCR in allen gesunden und in einem Großteil des neoplastischen humanen Lungengewebes gefunden. Es konnte kein Zusammenhang mit der Expression der CYP und der pathohistologischen Diagnose gefunden werden. Im Neoplasma wurden geringere mRNA-Level als im gesunden Gewebe gemessen. Expression der CYP und Rauchgewohnheiten der Patienten korrelierten nicht [19].

Eine medizinische Bedeutung des humanen CYP2F1 besteht in der Bioaktivierung des Tabakrauchinhaltsstoffes 3-Methylindol. Es wird ein Beitrag bei der Entstehung von Lungenödemen und -emphysemen vermutet [109]. Auch 4-Ipomeanol wird durch humanes CYP2F1 und CYP4B1 aktiviert. Das ist ein Lungentoxin, daß in von Schimmelpilzen befallenen Süßkartoffeln angereichert wird. Es bewirkt die Entstehung von Lungenödemen [20]. Humanes CYP2F1 bioaktiviert 7-Ethoxycumarin [137]. Es gibt Hinweise, daß CYP2F1 in die Toxifizierung des Lungengiftes Skatol einbezogen ist [73].

Styrol wird vor allem durch CYP2F1, CYP2E1, CYP2B6, CYP 4B1 metabolisiert. Die Rate des Styrolglykol, gemessen in Lungenmikrosomen, war bei Rauchern größer als bei Nichtrauchern [89].

Die Hypoexpression verschiedener physiologischer Marker und Prozesse nach der Kultivierung entsprechender Zellen ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Dabei handelt es sich nicht nur um fremdstoffmetabolisierende Enzyme. In der Kultur bronchopulmonaler Zellen ist beispielsweise der Verlust von amiloridsensitiven Na-Kanälen bekannt [61].

Willey et al. beobachteten eine Rarefizierung der CYP-Expression in der BEP2D-Zelllinie, die auf mangelnde Exposition gegenüber Induktoren oder den Verlust von Differenzierungen in der Kultur zurückzuführen war [142].

Mace et al. demonstrierten nach der Detektion verschiedener CYP-Isoformen in der anschließenden serumfreien Kultur schwächere Signale, als in den Nativproben vorgefunden wurden [76].

Siegfried et al. zeigten, daß im Vergleich zu Organkulturen Monolayer von NHBEC eine verminderte Benzo(a)pyrenmonooxygenaseaktivität haben. Es wurde sogar eine weitere Abnahme der Enzymaktivität im Verlauf der Kultur festgestellt. Es findet kein extensiver Metabolismus in NHBEC-Monolayern statt. Wenn der Induktionsreiz während der Kultur nicht aufrecht erhalten wird, werden die entsprechenden Enzyme nicht mehr exprimiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Metabolisationsleistung in Bezug auf das Rauchverhalten der Patienten festgestellt werden. Die Differenzen beim Umsatz des Benzo(a)pyren wurden interindividuellen Unterschieden angelastet [124].

Im Rahmen unserer Untersuchungen der CYP2E1-Proteinexpression können wir die veröffentlichten Ergebnisse der Literatur bestätigen. Das CYP2E1-Protein wurde konstitutiv in allen Frischproben des Bronchialepithels detektiert. Bei der positiven Probe 18L handelte es sich um eine Lungengewebspräparation, die in Absprache mit dem Operateur vom linken Oberlappenresektat genommen wurde. Für die kultivierten Proben 6 und 9 mußte bereits ab der ersten Explantationsgeneration 6.1 und 9.1 ein negatives Befund im Westernblot detektiert werden. Dieses Ergebnis setzte sich in der zweiten und dritten Explantgeneration, also in 6.2 und 6.3 und analog in 9.2 und 9.3 fort. Die punktuellen Überprüfungen von Erstexplantationen bei 7.1, 10.1, 17.1 und 18.1 zeigen auch hier einen negativen Befund für die CYP2E1-Proteinexpression. Es stellte sich in der induktionsfreien, durch Basalzellproliferation generierten Kultur dar, daß das CYP2E1-Protein nicht mehr exprimiert wurde. Ein Befund störte diese Interpretation. Für die dritte Explantgeneration 4.3 wurde im CYP2E1-Westernblot zweifach ein positives Signal detektiert. Leider existierten zum Versuchszeitraum keine weiteren Frisch- oder Kulturpräparate der Probe 4, so daß leider keine Referenzwerte gewonnen oder kausale Zusammenhänge für diese CYP2E1-Proteinexpression in der dritten Explantgeneration aufgezeigt werden konnten.

Für die CYP2E1mRNA-Expression detektierten wir ein positives Signal in der RT/PCR für alle frischen Proben. Die Probe 0, eine eingangs erwähnte Probe der Lingula, ist für CYP2E1mRNA negativ, ein im Gegensatz zur Literatur stehender Befund. Es konnte für je zwei Zweit- und je zwei Drittexplantkulturen, darunter auch 4.3, ein positives CYP2E1mRNA-Signal gemessen werden. Dabei ist die Probe 9.2 lediglich schwach positiv. In der Zusammenschau der zwei Proben, die zusammen einer RT/PCR- und Westernblotanalyse unterzogen wurden, zeigte sich ein widersprüchliches Bild. Während für 9.2 ein positives Signal der CYP2E1mRNA- bei negativer CYP2E1-Proteinexpression festgestellt wurde, detektierten wir für 4.3 ein positives Signal der mRNA- und der Proteinexpression. Unter Hinzunahme der RT/PCR-Ergebnisse scheint unter den gewählten Kulturbedingungen auch im Kulturverlauf eine CYP2E1mRNA-Expression fortzubestehen, der aber keine Translation in die Proteinform folgt. In Bezug auf den Befund für 4.3, bei dem ein positives Signal der mRNA- und der Proteinexpression auffiel, müssen wir von einer stattgefundenen Translation ausgehen, über deren Ursache nur spekuliert werden kann, da weder individuelle Besonderheiten noch wesentliche Auffälligkeiten während der Kultivierung festzustellen waren.

Für CYP2B7mRNA konnten wir sowohl für das Frischgewebe, für die Lingula und für die kultivierten Zellen eine konstitutive Expression verzeichnen, was sich mit den Literaturangaben deckt.

Für CYP4B1mRNA konnten wir weder für das NHBE, für die Lingula oder für die kultivierten Zellen eine Expression verzeichnen. Dieses Resultat steht im Gegensatz zu den Literaturangaben.

Für CYP2F1mRNA konnten wir lediglich für die Lingula, also einem Vertreter der pulmonalen Peripherie aber nicht für das Frischgewebe und auch nicht für die kultivierten Zellen eine Expression verzeichnen. Dieses Resultat ist mit den Literaturangaben ebenfalls nicht in Deckung zu bringen.

CYP2E1-Induktoren wie Ethanol können das CYP2E1 gegen Degradation stabilisieren. Die Rolle des CYP2E1 bei der alkoholtoxischen Leberschädigung ist bekannt [93]. Im Rahmen der Degradation finden Phosphorylierungen an einem Serinrest des Enzymes statt. CYP2E1-Induktoren können an diesen Serinrest binden und dadurch eine posttranslatorische Modifikation mit dem damit verbundenen Funktionsverlust inhibieren [73].

Auch die Applikationsform des Induktors ist für die Proteinexpression entscheidend. Der Versuch, durch eine Inhalation des Induktors eine lokale CYP2E1-Expression in der Lunge zu forcieren, vergleichbar dem Anstieg des Enzymes in der Leber, mißlang. Alkoholinhalationen führten bei Rattenlungen zwar zu einer absoluten Erhöhung des Enzymgehaltes aber erstaunlicherweise nicht zu einer vergleichbar hohen, relativen CYP2E1-Induktion wie in der Leber oder Niere [151].

In Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, daß nach Induktion mit Ethanol, Azeton und Pyrazin ein CYP2E1-Proteinanstieg auch ohne Erhöhung des mRNA-Levels erfolgen kann. CYP2B zeigte nur nach Azeton- und Pyrazin-, aber nicht nach Ethanolgabe einen Proteinanstieg, der auch von einem entsprechenden mRNA-Anstieg begleitet war [145].

#### **4.2.2 Der Einfluß des Cytochrom-P450E1-Induktors Ethanol auf die Kultur**

Eine in-vivo-Studie wurde in den USA durchgeführt, um die CYP2E1-Aktivität bei oraler Applikation von CLX bei kaukasischen und japanischen Probanden zu vergleichen. Bei Japanern war die Plasmakonzentration höher, die Clearance des 6-OH-CLX war verzögert, somit die Eliminierung verlangsamt. Begleitend erfolgte eine in-vitro-Studie mit Lebermikrosomenpräparaten aus diesen beiden Probandengruppen. Analog zeigte sich bei den Japanern ein niedrigerer CYP2E1-Gehalt und eine geringere Aktivität bei der Hydroxilierung des CLX. Diese Ergebnisse wurden zur Erklärung der geringeren Bronchialkarzinommorbidität der japanischen Bevölkerung herangezogen [55].

Auch für die Untersuchung der CYP2E1-Polymorphismen von RsaI (5'-Ende), DraI (Intron 6) und TaqI (Intron 7) läßt sich der hepatischen Umsatz von CLX nutzen. So wurde bei 93

Kaukasiern in vitro kein Unterschied in der CYP2E1-Aktivität zwischen den Mutanten und den Nichtmutanten festgestellt. Die interindividuellen Unterschiede wurden auf unterschiedliche Induktion des Enzyms durch entsprechende Umwelteinflüsse und andere, als die untersuchten genetische Einflüsse geschoben [17].

Diesen spezifischen CLX-Umsatz durch CYP2E1 nutzten wir zu Induktionsversuchen des NHBE. Die Daten zeigten CYP2E1-Aktivitäten im einstelligen pmol-Bereich bezogen auf die Masse des Gesamtproteins. Bei den Proben 22 und 23 waren in den Frischgeweben keine Aktivitäten detektierbar. Die Aktivitätsmessungen nach 24, 48 und 72h wurden aus verfahrenstechnischen Gründen für die Proben 22, 23 und 24 nicht durchgeführt. Es hatte sich gezeigt, daß die Probenvorbereitung bei Bronchialgewebe sehr viel schwieriger, zeitintensiver und damit erheblich aufwendiger war als bei den Proben, die Frau Dr. Bernauer üblicherweise untersuchte.

Für die Zielstellung, die CYP2E1-Aktivität im Bronchialgewebe verschiedener Patienten zu charakterisieren waren die Konditionen des CYP2E1-Assays jedoch vollkommen ausreichend. Es konnte gezeigt werden, daß die tägliche, im Rahmen des Medienwechsels durchgeführte Inkubation mit 40mM Ethanol eine Stabilisierung der CYP2E1-Expression im NHBE ermöglicht. Für die Proben 22 und 23 konnte bei anfänglicher Nichtdetektierbarkeit einer CYP2E1-Aktivität im Frischgewebe nach 96h Inkubation eine Aktivität festgestellt werden. Für die unbehandelte Kontrollprobe 24 konnte eine Aktivitätsverdopplung nach 96h im Vergleich zum Frischgewebe gemessen werden. Für Probe 21 stellte sich eine kontinuierliche Aktivitätszunahme nach Inkubation mit 40mM Ethanol an den täglichen Meßpunkten dar. Diese Probe 21 zeigte nach 96h Inkubation das von uns gemessene Aktivitätsmaximum des CLX-Umsatzes durch CYP2E1 von  $5,12 \text{ pmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , was eine Aktivitätsvervielfältigung im Vergleich zum Frischgewebe um den Faktor 4,6 bedeutet. Wie einleitend bereits erwähnt wurde existieren nur geringe Mengen CYP und entsprechende Aktivitäten in humanen Lungenproben. Diese Aussage bestätigte sich durch unsere Versuche. Wegen der sehr geringen CYP2E1-Aktivitäten möchten wir lediglich von einer Stabilisierung des CYP2E1 in dem kultivierten NHBE sprechen und nicht von einer Induktion.

#### **4.3 Bewertung normaler humaner Bronchialepithelzellen in Gentoxizitätsexperimenten**

Ein geringes bis mittleres allgemeintoxisches Potential der Stoffgemische ist aus den in-vivo-Untersuchungen zur Charakterisierung der toxischen Wirkungen des KSG aus Plasmaätzprozessen bekannt [8]. Wichtige Hinweise auf das gentoxische Potential der Stoffgemische konnten durch gentoxikologischen Untersuchungen belegt werden. Die konzentrationsab-

hängige Induktion verschiedener Genmutationen wurde im bakteriellen Ames-Test nachgewiesen [11]. Auch die signifikant erhöhten Raten an Chromosomenaberrationen und an Schwester-Chromatid-Austauschen bei Ratten unterstreichen die aberrationsauslösende Potenz nach subchronischer inhalativer Exposition von Versuchstieren mit verdünnten Emissionen aus den untersuchten Plasmaätzprozessen [7]. Die bisherige Datenlage beschränkte sich auf Ganztierversuche und bakterielle Systeme. Es fehlten bislang Aussagen zu den Effekten auf die DNA und der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Es stellte sich die Frage, ob die Kultur von NHBEC ein geeignetes, sensitives, in-vitro-Testsystem zur Untersuchung von gentoxischen Schäden, die durch Einwirkung von KSG bei exponierten Probanden entstehen könnten, wie es z.B. Wartungs- und Reinigungspersonal oder im Havariefall potentiell exponierte Personen sind, darstellt.

Im Ergebnis von Voruntersuchungen an unserem Institut wurden die Rahmenbedingungen für die gentoxikologischen Experimente festgelegt. An Hand von an humanen Lymphozyten und bronchopulmonalen Tumorzelllinien gewonnenen Erkenntnissen wurden die Testkonzentrationen und Behandlungszeiten fixiert [87]. Zwecks des Ausschlusses interferierender zytotoxischer Effekte wurden die Versuche von einem Vitalitätstest, der Trypanblaufärbung, begleitet. Dem Vitalitätstest Trypanblaufärbung wurde zu Ungunsten des Letalitätstest MTT-Test der Vorzug gegeben, da durch Voruntersuchungen in unserem Institut festgestellt wurde, daß eine Beeinträchtigung der Vitalität von Zellen durch die Trypanblaufärbung eher erfaßt wurde als durch den MTT-Test. Möglicherweise ist dies durch den unterschiedlichen Mechanismus der beiden Testsysteme erklärbar. Der Trypanblautest erfaßt unspezifische Membranschädigungen und der MTT-Test spezifische Enzymschädigungen [87].

Das KSG ruft schon in geringen Konzentrationen signifikante Schädigungen der DNA hervor, wie in den Gentoxizitätstests gezeigt werden konnte. Die Kontrolle des Lösungsvermittlers DMSO zeigte in keinem der Experimente einen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle der unbehandelten Zellen.

Um die Funktionalität der Methodik des Cometassay zu demonstrieren, wurde im 1h-Inkubationsversuch ein Versuchsansatz mitgeführt, bei dem die NHBEC einem bekannten Verursacher von DNA-Einzelstrangbrüchen, dem  $H_2O_2$ , ausgesetzt wurden. Um zu zeigen, daß mit dem von uns durchgeführten Cometassay DNA-Strangbrüche erfaßt wurden, wurde eine Positivkontrolle mit  $H_2O_2$  in einer 300  $\mu M$  Konzentration durchgeführt. Erwartungsgemäß löste das  $H_2O_2$  in der Kontrolluntersuchung DNA-Strangbrüche aus, die im Cometassay sichtbar waren. Die Richtigkeit unserer Methodik bestätigten uns die dabei ermittelten Werte, die mit Daten aus der Literatur korrelierten [125]. Schließlich mußte ausgeschlossen werden, daß

der von uns eingesetzte S9-Mix auf die NHBEC innerhalb einer 2h-Inkubation selbst keinen genotoxischen Einfluß hat. Der Kontrollansatz des S9-Mix zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle der unbehandelten Zellen. Diese S9-Mix-Kontrolle demonstrierte, daß die Verwendung des S9-Mix in der von uns ausgewählten Konzentration und über den Behandlungszeitraum von 2h keine DNA-Strangbrüche auslöst. Damit blieben wir unter der kritischen Inkubationszeit von 3h, ab welcher für den S9-Mix in der Literatur autogene Genotoxizität beschrieben wurde [77,132].

Diese Kontrolltests wiesen nach, daß die DNA-Schädigungen auf die Wirkungen der Testsubstanzen zurückzuführen sind und nicht durch methodische Artefakte ausgelöst wurden.

Für die NHBEC konnte eine konzentrationsabhängige Auslösung von DNA-Schäden durch das KSG nachgewiesen werden. Bei allen durchgeführten Versuchen konnte eine direkte Abhängigkeit der Kometenschweiflänge von der Konzentration festgestellt werden. Es besteht eine direkte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Eine direkte Korrelation besteht ebenfalls zwischen der Behandlungszeit und der gemessenen Kometenschweiflänge. Es ließ sich feststellen, daß sich mit zunehmender Testkonzentration und Behandlungsdauer die genotoxischen Effekte erhöhten. Einzelstrangbrüche als Ausdruck genotoxischer Schädigung der DNA nahmen signifikant zu. Bei der 24-stündigen Behandlungszeit der NHBEC konnte gezeigt werden, daß schon die Hälfte ( $0,005 \text{ mgml}^{-1}$ ) der sonst eingesetzten kleinsten Testkonzentration zu einer signifikanten Erhöhung der Schädigung der DNA führte.

Bei höheren Testkonzentrationen ab  $0,04 \text{ mgml}^{-1}$  wurde die DNA der Zellen derart zerstört, daß die fluoreszenzmikroskopische Erfassung der Kometenschweife nicht mehr möglich war. Die Verdopplung der Kometenschweiflängen nach 24h Behandlung im Vergleich zur zwei-stündigen Behandlung, ist ein Hinweis auf die Korrelation zwischen Behandlungsdauer und Ausmaß der genotoxischen Wirkung.

Es besteht kein signifikanter Unterschied in der genotoxischen Schädigung zwischen den Zellen die mit und ohne S9-Mix inkubiert wurden. Daher ist davon auszugehen, daß das genotoxische Potential des KSG auch ohne Metabolisierung sehr hoch ist. Daraus ist zu schließen, daß das KSG einer zusätzlichen enzymatischen Aktivierung nicht bedarf, sondern direkt genotoxisch wirkt. Dies war erwartungsgemäß, da sich schon in vorherigen Untersuchungen im bakteriellen Ames-Test zeigte, daß die Reversionsrate durch Zugabe von S9-Mix nicht beeinflußt wurde [10].

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der NHBEC weisen darauf hin, daß die Lunge als Haupteintrittspforte des KSG und anderer inhalativ aufgenommenen Schadstoffe in den Organismus besonderen genotoxischen Schädigungen ausgesetzt ist.

#### 4.4 **Schlußfolgerungen**

Durch den Einsatz des NHBECM, eines serumfreien Mediums auf LHC-9-Basis, und eine geeignete Beschichtung der Kulturschalen mit Fibronectin, Kollagen und BSA war es uns gelungen, eine Kultur von NHBEC zu generieren. Aus den positiven Reaktionen auf verschiedene Zytokeratinantikörper im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungen und Westerblotanalysen ist davon auszugehen, daß uns eine Kultur an NHBEC mit bronchoepitheliale Ursprung zur Verfügung steht. Dies wurde durch licht- und elektronenmikroskopische Auswertung unterstrichen. Da CK19, welches in unseren Frischgeweben und Kulturen konstitutiv nachweisbar war, ein basalzelltypisches Protein ist, unterstützen unsere Daten die These, daß die Kultur von NHBEC ein Produkt des Auswuchses aus Basalzellen darstellt. Der Vergleich der Morphe unserer Kultur NHBEC mit den morphologischen Daten aus der Literatur ist in vielen Punkten übereinstimmend. Der Unterschied des Zilienbesatzes von NHBEC wurde bei im Schrifttum beschriebenen Kulturen mit der Anwendung eines serumhaltigen Mediums oder biphasischer Kulturverhältnisse begründet. Sollte unsere Kultur von NHBEC in ziliophysiologische Untersuchungen angewendet werden oder bestünde aus anderen Gründen Bedarf an einem zilientragenden Phänotyp, so sollte die Kultur NHBEC in einer Luft-Medium-Grenzschicht erwogen werden. Die Nutrition der Bronchialfragmente mit einem serumhaltigen Medium, auch in kleinen Konzentrationen, führt zu deutlichen Fibroblastenkontaminationen. Diese würden die Interpretation gewonnener Daten beeinträchtigen oder unmöglich machen.

Für CYP2E1 konnte auf transkriptioneller und translatorischer Ebene eine konstitutive Expression im frischen NHBEC festgestellt werden, wobei in den explantierten Zellen die Proteindarstellung versiegt. Unsere Induktionsversuche mit 40 mM Ethanol demonstrierten einen leichten Anstieg der CYP2E1-Aktivität und somit eine Stabilisierung der Expression dieses Enzymes im frischen NHBEC. Wegen des Erfolges dieser Experimente entschlossen wir uns zur Fortsetzung dieses Versuchsansatzes durch Inkubation der NHBEC-Kulturen mit 4 mM Ethanol. Hierbei handelte es sich um ein- bis zwei Wochen alte Kulturen, die entsprechend kultiviert wurden. Densitometrische Aufarbeitungen der molekularbiologisch detektierten  $\beta$ -Aktin- und CYP2E1-mRNA zeigten für Probe 55.1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Zunahme um den Faktor 1,6 nach 2h, um 2,4 nach 4h, um 4,2 nach 6h, um 8,7 nach 12h und nach 24h eine Zunahme der CYP2E1-mRNA um den Faktor 20,3. Dieses Beispiel dokumentiert die Induzierbarkeit des CYP2E1 auf transkriptioneller Ebene. Im Rahmen der Westernblotanalytik konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Wurde die Kultur mit 4 mM Ethanol inkubiert, konnte CYP2E1-Protein in der Kultur stabilisiert werden.

Probe 28.1 zeigte bei der densitometrischen Aufarbeitung eine Veränderung um den Faktor 0,9 nach 24h, um 2,0 nach 48h, um 1,1 nach 72h und eine Zunahme des CYP2E1-Proteins um den Faktor 1,2 nach 96h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Wegen der geringgradigen Veränderungen sollte wieder von einer Stabilisierung der Expression des CYP2E1-Proteins gesprochen werden [115].

In Humanlebermikrosomen wird durch CYP2E1 die Umwandlung von N-Nitroso-n-propylamin, eines Nahrungsbestandteiles, in toxische und DNA-schädigende Metabolite katalysiert [133]. Wird CYP2E1 durch 1,2-trans-Dichlorethylen inhibiert, reduziert sich die Gentoxizität des Butadien bei Mäusen, resultierend aus der verminderten Butadienoxydation [52]. Die Zelllinie A549, eine von humanen AII abgeleitete transformierte Linie, exprimiert mRNA verschiedener CYP einschließlich CYP2E1. A549 reagiert außerdem auf Induktoren, wie Tetrachlordibenzo-p-dioxin, Dexametason und Phenobarbital. Diese Hinweise aus der Literatur ermutigen zu weiteren Untersuchungen zum Einfluß von anderen Induktoren und Inhibitoren auf unsere Kultur von NHBE. Die Expression von CYP2E1mRNA konnte in NHBE gezeigt werden. Es ist aber noch unklar, ob die interindividuellen Unterschiede in der CYP2E1-Expression des humanen Bronchialepithels Einfluß auf die Aktivität und somit auf das Risiko des Organismus haben, einen xenobiotisch induzierten Gewebedefekt zu erleiden. Wenn man sich vergegenwärtigt, daß die Lebensdauer, in der notgedrungen sicher phänotypische Veränderungen stattfinden, der NHBE begrenzt ist, so stellt die Kultur der NHBE ein bedeutendes in-vitro-Modell des humanen Bronchialepithelbaumes dar, welches hilft, das Verständnis für interindividuelle Unterschiede in der Basisaktivität, der Stabilität und Induzierbarkeit des CYP2E1 in vitro zu verbessern.

Im Gegensatz zu der schädigenden Wirkung der CYP2E1-vermittelten Substratoxydation gibt es Veröffentlichungen aus unserem Hause, die die protektive Wirkung des CYP2E1 beim Abbau des Dichlormethans dokumentieren. Hierbei wird die Bildung gentoxischer Intermediate verhindert [99]. Der Nachweis der Gültigkeit für des Bronchialsystem am Modell der NHBE wäre ein interessanter Versuchsansatz.

Im Tracheobronchialbaum der Ratte ist CYP2E1 auf verschiedenen Ebenen heterogen verteilt. Nach kurzzeitiger Ozonexposition der Tiere konnte eine deutlich erhöhte CYP2E1-Aktivität vor allem in den proximalen Abschnitten des Bronchialbaumes registriert werden. Das führt zu dem Schluß, das es eine differente Aktivitätsverteilung des CYP2E1 auf verschiedenen Ebenen des Tracheobronchialbaumes gibt [139]. Im Rahmen unserer Detektion von mRNA m.H. der RT/PCR konnten wir ein positives Signal für CYP2E1 in der Lingula, also im peripheren Pulmonalgewebe finden, während in der Kultur NHBE und im frischen Bronchial-

epithel kein detektierbares Signal auftrat. Dieser Befund einer möglicherweise heterogenen CYP2F1-Verteilung müßte für die RT/PCR wiederholt und m.H. der Westernblotanalytik weiter untersucht werden. CYP4B1 war in unserer Kultur nicht detektabel. Der Nachweis von CYP4B1mRNA ist nicht gelungen. Im Gegensatz dazu war CYP2B7mRNA konstitutiv nachweisbar. Es wäre von Interesse, ob die CYP2B7-Proteinexpression gleichsinnig zur CYP2E1-Proteinexpression, also im Sinne einer Niederregulation, in der Kultur reagiert oder ob es bei diesen Isoformen Unterschiede im Expressionsverhalten auf dieser Ebene gibt.

Humanes Tracheobronchialepithel exprimiert eine Vielzahl der CYP-Isoformen, wie CYP1A1, 1B1 und der 3A-Subfamilie, vor allem nach Tabakrauchexposition. Es ist wahrscheinlich, daß Faktoren, die die Aktivität und Verteilung der CYP im Tracheobronchialsystem bedingen, Einfluß auf das Risiko haben, xenobiotisch ausgelöste Erkrankungen des Atmungssystems zu entwickeln [111]. Zur weiteren Charakterisierung NHBEC wäre die Detektion weiterer CYP-Isoformen wünschenswert.

Die Untersuchungen im Cometassay ergaben für die NHBEC ein sensitives Modell zur Erfassung von DNA-Schädigungen, die durch die Inkubation mit einem KSG hervorgerufen wurden. Die Ergebnisse lassen v.a. im Vergleich mit den Resultaten des Verbundprojektes „Gesundheitliche Risiken durch Plasmaätzprozesse in der Halbleiterindustrie“ ein gesundheitliches Risiko für eine bronchoepitheliale genotoxische Schädigung an der Eintrittspforte Lunge bei inhalativer Inkorporation vermuten. Die Benutzung von Atemschutzgeräten bei Reinigungs- und Wartungsarbeiten oder Havariesituationen in den sensiblen Bereichen ist unbedingt zu empfehlen. Weitere Untersuchungen sollten klären, welche Komponenten dieses Gemisches für die erzeugten Effekte ausschlaggebend waren und ob die Kombination der kausalen Komponenten die Effekte der Einzelsubstanzen modulieren.

Der Einsatz des Modells der NHBEC zu weiteren Untersuchungen molekularbiologischer und biochemischer Charakteristika oder zur Wirkung von Xenobiotika auf das Targetorgan Bronchopulmonalsystem oder zu komplexen Fragestellungen der Umwelttoxikologie ist vorgesehen.

## 5 Zusammenfassung

Die metabolischen Potenzen des bronchopulmonalen Systems geraten neben dem Hauptstoffwechselorgan Leber zunehmend in das Blickfeld des Interesses. Bekanntermaßen ist das bronchopulmonale System von großer medizinischer, individualhygienischer und gesundheitspolitischer Bedeutung. Es bestand die Aufgabe, an unserem Institut für Umwelttoxikologie der Univ. ein Modell zu etablieren, das das wichtige epitheliale Kompartiment des humanen Bronchialbaumes simuliert. Eine Primärkultur von NHBEC sollte eingeführt werden. Der erste Ansatz einer digestiven, selektiven Gewinnung von NHBEC führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Erst die Versuche mit der Explantationskultur von NHBEC aus Fragmenten der Bronchialwand erfüllten die Anforderungen an qualitative und quantitative Eigenschaften einer reproduktiven Kultur bronchoepithelialen Ursprungs. Die nichtdigestive, selektive Explantationskultur von NHBEC gelang unter Einsatz eines serumfreien Mediums. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Kultur stellte sich das für NHBEC zytognomische „Pflastersteinrelief“ dar. Die elektronenmikroskopische Visualisierung subkonfluenter Monolayer zeigte Zytokeratinfilamente, die als Bestandteil epithelialer Zytoskelettarchitektur im Zytosol vorliegen, sowie für epitheliale Zellen typische Mikrovilli. Eine Zilienexpression war unter monophasischen, serumfreien Kulturbedingungen nicht zu erwarten und nicht vorhanden.

Die Zytokeratinexpression wurde neben der optischen Darstellung auf immunhistochemischem Wege und durch die Westernblotanalytik detektiert. Im immunhistochemischen Nachweis konnte eine flächenhafte positive Reaktion auf Zytokeratin und die CK8/18-Fraktion erzielt werden. Eine Gegenfärbung zum Nachweis von Vimentin, einem Marker für Zellen mesenchymalen Ursprungs, zeigte lediglich punktuelle Kontaminationen mesenchymaler Zellen, so dass wir von einer Reinheit  $\geq 95\%$  unserer Kultur NHBEC ausgehen konnten. Später durchgeführte Färbungen bestätigten unsere Resultate bezüglich der CK- und Vimentinexpression und ergänzten sie durch einen positiven Nachweis für CK7. Für CD68, einem Antigen der Monozyten und Makrophagen, wurden punktuelle Reaktionen detektiert. Es wurde der bronchoepitheliale Charakter unserer Kultur, die in hoher Reinheit  $\geq 95\%$  vorliegt, bestätigt.

Im Rahmen der Westernblotanalytik konnte für CK18 eine interindividuelle Streuung in der Merkmalsausprägung und für das basalzelltypische CK19 ein konstitutives Vorhandensein ermittelt werden, wobei hier unsere Daten die These stützen, daß es sich bei den ausgewachsenen Zellen um Teilungsprodukte der Basalzellen handelt.

Auf drei unabhängigen Wegen konnte der bronchoepitheliale Charakter unserer Kultur NHBEC demonstriert werden.

Die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme wurde für CYP2E1 auf den Ebenen der mRNA- und Proteinexpression sowie die Funktionalität des CYP2E1 im CLX-assay untersucht. CYP2E1mRNA wurde außer in der Lingula konstitutiv im Bronchialgewebe nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde CYP2E1-Protein im frischen Bronchialgewebe und einmal in der pulmonalen Peripherie immer nachgewiesen. In der Kultur war es im Verlauf, bis auf eine Ausnahme, bereits ab dem ersten Auswuchs nicht mehr detektierbar. Es ist davon auszugehen, daß in der Kultur NHBEC die translatorische Umsetzung des CYP2E1 in der Regel herunterreguliert wird. Im CLX-Assay konnte eine Stabilisierung der CYP2E1-Expression demonstriert werden.

Für die CYP2B7mRNA-Expression konnte im Frischgewebe und in der Kultur ein konstitutives Vorhandensein festgestellt werden. CYP2F1mRNA war lediglich peripher in der Lingula nachzuweisen. CYP4B1mRNA war weder im frischen Gewebe noch in der Kultur detektierbar.

Zur Klärung umwelttoxikologischer Fragestellungen wurden die kultivierten NHBEC mit einem KSG aus perhalogenierten Kohlenwasserstoffen inkubiert. Dabei konnte eine direkte Dosis-Wirkungs-Beziehung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit dem KSG bei den inkubierten NHBEC im Cometassay festgestellt werden.

Die gentoxikologischen Untersuchungen im Cometassay zeigten für die NHBEC, daß diese kultivierten Zellen ein sensitives Modell zur Erfassung von DNA-Schädigungen sein können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, Calderon M, Sapsford RJ, Davies RJ: The effect of conditioned medium from cultured human bronchial epithelial cells on eosinophil and neutrophil chemotaxis and adherence in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13(6) (1995) 728-37
2. Adler KB, Cheng PW, Kim KC: Characterization of guinea pig tracheal epithelial cells maintained in biphasic organotypic culture: cellular composition and biochemical analysis of released glycoconjugates. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2(2) (1990) 145-54
3. Anttila S, Hukkanen J, Hakkola J, Stjernvall T, Beaune P, Edwards RJ, Boobis AR, Pelkonen O, Raunio H: Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(3) (1997) 242-9
4. Aufderheide M, Mohr U: CULTEX-an alternative technique for cultivation and exposure of cells of the respiratory tract to airborne pollutants at the air/liquid interface. *Exp Toxicol Pathol* 52(3) (2000) 265-70
5. Baldwin F: Basal cells in human bronchial epithelium. *Anat Rec* 238(3) (1994) 360-7
6. Barth PJ, Koch S, Muller B, Unterstab F, von Wichert P, Moll R: Proliferation and number of Clara cell 10-kDa protein (CC10)-reactive epithelial cells and basal cells in normal, hyperplastic and metaplastic bronchial mucosa. *Virchows Arch* 437(6) (2000) 648-55
7. Bauer S, Werner N, Wolff I, Damme B, Oemus K, Hoffmann P: Toxicological investigations in the semiconductor industry: II. Studies on the subacute inhalation toxicity and genotoxicity of gaseous waste products from the aluminum plasma etching process. *Toxicol Ind Health* 8(6) (1992) 431-44
8. Bauer S, Wolff I, Werner N, Hoffman P: Health hazards in the semiconductor industry. A review. *Pol J Occup Med Environ Health* 5(4) (1992) 299-314
9. Bauer S, Wolff I, Werner N, Hoffmann P, Herzsuh R, Oemus K, Rath FW, Voigt R: Toxicological investigations in the semiconductor industry: I. Studies on the acute oral toxicity of a complex mixture of waste products from the aluminium plasma etching process. *Toxicol Ind Health* 8(3) (1992) 141-56
10. Bauer S, Wolff I, Werner N, Hoffmann P, Hillig R, Voigt R, Merten B, Oemus K, Rath FW: Toxicological investigations of waste products from the plasma etching process in the semiconductor industry. *Arch Toxicol Suppl* 14 (1991) 303-6
11. Bauer S, Wolff I, Werner N, Schmidt R, Blume R, Pelzing M: Toxicological investigations in the semiconductor industry: IV. Studies on the subchronic oral toxicity and genotoxicity of vacuum pump oils contaminated by waste products from aluminum plasma etching processes. *Toxicol Ind Health* 11(5) (1995) 523-41
12. Beckmann JD, Palmatier R, Kliewer B: Retinoic acid inhibits hydrocortisone-stimulated expression of phenol sulfotransferase in bovine bronchial epithelial cells. *J Cell Physiol* 166(2) (1996) 281-7
13. Bernauer U, Vieth B, Ellrich R, Heinrich-Hirsch B, Janig GR, Gundert-Remy U: CYP2E1 expression in bone marrow and its intra- and interspecies variability: approaches for a more reliable extrapolation from one species to another in the risk assessment of chemicals. *Arch Toxicol* 73(12) (2000) 618-24
14. Boning A, Muller KM: Cytokeratin expression in fetal lung-immunohistochemical studies. *Pneumologie* 45(8) (1991) 622-6
15. Botto F, Seree E, el Khyari S, Cau P, Henric A, De Meo M, Bergeron P, Barra Y: Hypomethylation and hypoexpression of human CYP2E1 gene in lung tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 205(2) (1994) 1086-92
16. Boyce ST, Ham RG: Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* 81(1 Suppl) (1983) 33-40
17. Carriere V, Berthou F, Baird S, Belloc C, Beaune P, de Waziers I: Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype. *Pharmacogenetics* 6(3) (1996) 203-11
18. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1987) 156-9
19. Czerwinski M, McLemore TL, Gelboin HV, Gonzalez FJ: Quantification of CYP2B7, CYP4B1, and CYPOR messenger RNAs in normal human lung and lung tumors. *Cancer Res* (1994) 54(4) 1085-91
20. Czerwinski M, McLemore TL, Philpot RM, Nhamburo PT, Korzekwa K, Gelboin HV, Gonzalez FJ: Metabolic activation of 4-ipomeanol by complementary DNA-expressed human cytochromes P-450: evidence for species-specific metabolism. *Cancer Res* (1991) 51(17) 4636-8
21. Czygan P, Greim H, Garro J, Hutterer F, Schaffner F, Popper H, Rosenthal P, Cooper DY: Microsomal metabolism of dimethylnitrosamine and the cytochrom P-450 dependency of its activation to a mutagen. *Cancer Res* 33 (1973) 2983-6
22. Dahl AR, Lewis JL: Respiratory tract uptake of inhalants and metabolism of xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33 (1993) 383-407
23. De Groot H, Sies H: Cytochrome P-450, reductive metabolism, and cell injury. *Drug Metab Rev* (2-4) (1989) 20275-84

24. de Jong PM, van Sterkenburg MA, Hesselning SC, Kempenaar JA, Mulder AA, Mommaas AM, Dijkman JH, Ponec M: Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10(3) (1994) 271-7
25. de Jong PM, van Sterkenburg MA, Kempenaar JA, Dijkman JH, Ponec M: Serial culturing of human bronchial epithelial cells derived from biopsies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A(5) (1993) 379-87
26. Dekant W, Vamvakas S: *Toxikologie für Chemiker und Biologen*. Spektrum, Heidelberg-Berlin-Oxford, 1994
27. Denison MS, Whitlock JP Jr: Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J Biol Chem* 270(31) (1995) 18175-8
28. Devalia JL, Sapsford RJ, Wells CW, Richman P, Davies RJ: Culture and comparison of human bronchial and nasal epithelial cells in vitro. *Respir Med* 84(4) (1990) 303-12
29. Dobashi N, Fujita J, Murota M, Ohtsuki Y, Bandoh S, Ueda Y, Dohmoto K, Hojo S, Nishioka M, Ishida T, Takahara J: Binding of recombinant human cytokeratin 19 to laminin: a possible role in interaction between intermediate filament derived from epithelial cells and extracellular matrixes. *Cell Struct Funct* 25(3) (2000) 171-5
30. Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC: An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* (1986)134(1)141-5
31. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL: The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339 (1995) 37-59
32. Finotto S, Rado V, Dal Vecchio A, Milani G, Fabbri LM, Maestrelli P: Identification of epithelial cells in bronchoalveolar lavage. *Hum Exp Toxicol* 12(1) (1993) 43-6
33. Forkert PG, Premdas PD, Bowers RJ: Epoxide formation from diallyl sulfone is associated with CYP2E1 inactivation in murine and human lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23(5) (2000) 687-95
34. Foth H: Role of the lung in accumulation and metabolism of xenobiotic compounds-implications for chemically induced toxicity. *Crit Rev Toxicol* 25(2) (1995) 165-205
35. Foth H, Geng WP, Krug N, Vetterlein F: Pulmonary uptake of bupivacaine in isolated perfused rat lung. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 351(1) (1995) 99-106
36. Franklin WA, Folkvord JM, Varella-Garcia M, Kennedy T, Proudfoot S, Cook R, Dempsey EC, Helm K, Bunn PA, Miller YE: Expansion of bronchial epithelial cell populations by in vitro culture of explants from dysplastic and histologically normal sites. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(3) (1996) 297-304
37. Garfinkel D: Studies on pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 77 (1958) 835-42
38. Gatehouse DG, Delow GF: The development of a "Microtitre" fluctuation test for the detection of indirect mutagens, and its use in the evaluation of mixed enzyme induction of the liver. *Mutat Res* 60(3) (1979) 239-52
39. George JAS, Harkema JR, Hyde DM, Plopper CG: Cell populations and structure/function relationship of cells in the airway. In: Gardner DE, Crapo JD, McClellan RO (Eds): *Toxicology of the lung*. Raven Press, New York, 1993, S. 81-110
40. Gerde P, Muggenburg BA, Scott GG, Lewis JL, Pyon KH, Dahl AR: Local metabolism in lung airways increases the uncertainty of pyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Carcinogenesis* 19(3) (1998) 493-500
41. Geyer G: *Histologie und mikroskopische Anatomie*. 16. Aufl. Georg Thieme, Leipzig, 1982
42. Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP: Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 25(1) (1995) 25-65
43. Gonzalez FJ, Crespi CL, Czerwinski M, Gelboin HV: Analysis of human cytochrome P450 catalytic activities and expression. *Tohoku J Exp Med* 168(2) (1992) 67-72
44. Gray TE, Guzman K, Davis CW, Abdullah LH, Nettesheim P: Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14(1) (1996) 104-12
45. Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH: Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 268(3 Pt 1) (1995) L347-60
46. Hakkola J, Pelkonen O, Pasanen M, Raunio H: Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human fetoplacental unit: role in intrauterine toxicity. *Crit Rev Toxicol* 28(1) (1998) 35-72
47. Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G: A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res* 390 (1997) 179-88
48. Hukkanen J, Hakkola J, Anttila S, Piipari R, Karjalainen A, Pelkonen O, Raunio H: Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Mol Carcinog* 20(2) (1997) 224-30
49. Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Valanne S, Sarpo S, Hakkola J, Pelkonen O, Raunio H: Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22(3) (2000) 360-6

50. Inage M, Nakamura H, Kato S, Saito H, Abe S, Hino T, Tomoike H: Levels of cytokeratin 19 fragments in bronchoalveolar lavage fluid correlate to the intensity of neutrophil and eosinophil-alveolitis in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 94(2) (2000) 155-60
51. Iyonaga K, Miyajima M, Suga M, Saita N, Ando M: Alterations in cytokeratin expression by the alveolar lining epithelial cells in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 182(2) (1997) 217-24
52. Jackson TE, Lilly PD, Recio L, Schlosser PM, Medinsky MA: Inhibition of cytochrome P450 2E1 decreases, but does not eliminate, genotoxicity mediated by 1,3-butadiene. *Toxicol Sci* 55(2) (2000) 266-73
53. Jorissen M, Van der Schueren B, Van den Berghe H, Cassiman JJ: Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Eur Respir J* 4(2) (1991) 210-7
54. Khoor A, Gray ME, Singh G, Stahlman MT: Ontogeny of Clara cell-specific protein and its mRNA: their association with neuroepithelial bodies in human fetal lung and in bronchopulmonary dysplasia. *J Histochem Cytochem* 44(12) (1996) 1429-38
55. Kim RB, Yamazaki H, Chiba K, O'Shea D, Mimura M, Guengerich FP, Ishizaki T, Shimada T, Wilkinson GR: In vivo and in vitro characterization of CYP2E1 activity in Japanese and Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 279(1) (1996) 4-11
56. Kitamura H, Shibagaki T, Inayama Y, Ito T, Kanisawa M: Growth and differentiation of human distal airway epithelial cells in culture. Effects of small amounts of serum in defined medium. *Lab Invest* 63(3) (1990) 420-8
57. Kivisto KT, Linder A, Friedel G, Beaune P, Belloc C, Kroemer HK, Fritz P: Immunohistochemical localization of cytochrome P450 2E1 in human pulmonary carcinoma and normal bronchial tissue. *Virchows Arch* 426(3) (1995) 243-7
58. Klingenberg M: Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75 (1958) 376-86
59. Kodama Y, Boreiko CJ, Maness SC, Hesterberg TW: Cytotoxic and cytogenetic effects of asbestos on human bronchial epithelial cells in culture. *Carcinogenesis* 14(4) (1993) 691-7
60. Kukielka E, Cederbaum AI: DNA strand cleavage as a sensitive assay for the production of hydroxyl radicals by microsomes: role of cytochrome P4502E1 in the increased activity after ethanol treatment. *Biochem J* 302 (Pt 3) (1994) 773-9
61. Kunzelmann K, Kathofer S, Hipper A, Gruenert DC, Gregner R: Culture-dependent expression of Na<sup>+</sup> conductances in airway epithelial cells. *Pflügers Arch* 431(4) (1996) 578-86
62. Kurz H, Neumann HG, Wollenberg P, Forth W, Henschler D, Rummel W: Elimination von Pharmaka durch Stoffwechsel (Biotransformation). In: Forth W (Hrsg): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 1990, S. 44-56
63. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5
64. Lechner JF: Interdependent regulation of epithelial cell replication by nutrients, hormones, growth factors, and cell density. *Fed Proc* 43(1) (1984) 116-20
65. Lechner JF, Haugen A, Autrup H, McClendon IA, Trump BF, Harris CC: Clonal growth of epithelial cells from normal adult human bronchus. *Cancer Res* 41(6) (1981) 2294-304
66. Lechner JF, Haugen A, McClendon IA, Pettis EW: Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium. *In Vitro* 18(7) (1982) 633-42
67. Lechner JF, Haugen A, McClendon IA, Shamsuddin AM: Induction of squamous differentiation of normal human bronchial epithelial cells by small amounts of serum. *Differentiation* 25(3) (1984) 229-37
68. Lechner JF, LaVeck MA: A serumfree method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J Tissue Cult Methods* 9(2) (1985) 43-8
69. Lechner JF, McClendon IA, LaVeck MA, Shamsuddin AM, Harris CC: Differential control by platelet factors of squamous differentiation in normal and malignant human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 43(12 Pt 1) (1983) 5915-21
70. Lee TC, Wu R, Brody AR, Barrett JC, Nettesheim P: Growth and differentiation of hamster tracheal epithelial cells in culture. *Exp Lung Res* 6(1) (1984) 27-45
71. Leibovitz A: Preparation of medium L-15. *J Tissue Cult Methods* 3 (1977) 557-9
72. Lewis DF, Moereels H, Lake BG, Ioannides C, Parke DV: Molecular modeling of enzymes and receptors involved in carcinogenesis: QSARs and compact-3D. *Drug Metab Rev* 26(1-2) (1994) 261-85
73. Lewis DFV: *Cytochromes P450-Structure, Function and Mechanism*. Taylor&Francis Ltd., London, 1996
74. Lindl T, Bauer J: *Zell- und Gewebekultur*. 3. Aufl., Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York, 1994
75. Liu X, Umino T, Cano M, Ertl R, Veys T, Spurzem J, Romberger D, Rennard SI: Human bronchial epithelial cells can contract type I collagen gels. *Am J Physiol* 274(1 Pt 1) (1998) L58-65
76. Mace K, Bowman ED, Vautravers P, Shields PG, Harris CC, Pfeifer AM: Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur J Cancer* 34(6) (1998) 914-20

77. Madle S, Obe G: Methods for analysis of the mutagenicity of indirect mutagens/ carcinogens in eukaryotic cells. *Hum Genet* 56 (1980) 7-20
78. Masui T, Lechner JF, Yoakum GH, Willey JC, Harris CC: Growth and differentiation of normal and transformed human bronchial epithelial cells. *J Cell Physiol Suppl* 4 (1986) 73-81
79. Masui T, Wakefield LM, Lechner JF, LaVeck MA, Sporn MB, Harris CC: Type beta transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(8) (1986) 2438-42
80. McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): An European review. *Mutat Res* 288 (1993) 47-63
81. McManus ME, Boobis AR, Pacifici GM, Frempong RY, Brodie MJ, Kahn GC, Whyte C, Davies DS: Xenobiotic metabolism in the human lung. *Life Sci* 26(6) (1980) 481-7
82. Mio T, Liu XD, Adachi Y, Striz I, Skold CM, Romberger DJ, Spurzem JR, Illig MG, Ertl R, Rennard SI: Human bronchial epithelial cells modulate collagen gel contraction by fibroblasts. *Am J Physiol* 274(1 Pt 1) (1998) L119-26
83. Miyashita M, Willey JC, Sasajima K, Lechner JF, LaVoie EJ, Hoffmann D, Smith M, Trump BF, Harris CC: Differential effects of cigarette smoke condensate and its fractions on cultured normal and malignant human bronchial epithelial cells. *Exp Pathol* 38(1) (1990) 19-29
84. Moll R: Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors. *Veroff Pathol* 142 (1993) 1-197
85. Moller PC, Partridge LR, Cox R, Pellegrini V, Ritchie DG: An in vitro system for the study of tracheal epithelial cells. *Tissue Cell* 19(6) (1987) 783-91
86. Mollerup S, Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Haugen A: Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res* 59(14) (1999) 3317-20
87. Muller P, Stock TW, Bauer S, Wolff I: Genotoxicological characterisation of complex mixtures I. Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. *Mutat Res*, accepted and in press
88. Nakajima M, Kawanami O, Jin E, Ghazizadeh M, Honda M, Asano G, Horiba K, Ferrans VJ: Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathol Int* 48(12) (1998) 944-53
89. Nakajima T, Elovaara E, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Raunio H, Pelkonen O, Vainio H, Aoyama T: Styrene metabolism by cDNA-expressed human hepatic and pulmonary cytochromes P450. *Chem Res Toxicol* 7(6) (1994) 891-6
90. Nakamura Y, Tate L, Ertl RF, Kawamoto M, Mio T, Adachi Y, Romberger DJ, Koizumi S, Gossman G, Robbins RA, et al: Bronchial epithelial cells regulate fibroblast proliferation. *Am J Physiol* 269(3 Pt 1) (1995) 377-87
91. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert D: P 450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6 (1996) 1-42
92. Nettesheim P, Jetten AM, Inayama Y, Brody AR, George MA, Gilmore LB, Gray T, Hook GE: Pathways of differentiation of airway epithelial cells. *Environ Health Perspect* 85 (1990) 317-29
93. Niemela O, Parkkila S, Pasanen M, Iimur Y, Bradford B, Thurman RG: Early alcoholic liver injury: formation of protein adducts with acetaldehyde and lipid peroxidation products, and expression of CYP2E1 and CYP3A. *Alcohol Clin Exp Res* 22(9) (1998) 2118-24
94. Novak RF, Woodcroft KJ: The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP 2E1): role in toxicology and regulation of expression. *Arch Pharm Res* 23(4) (2000) 267-82
95. Okey AB: Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther* 45(2) (1990) 241-98
96. Olive PL, Banath JP, Durand RE: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 122(1) (1990) 86-94
97. Omura T, Sato R: A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 237 (1962) 1375-6
98. Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1) (1984) 291-8
99. Pankow D, Jagielki S: Effect of methanol or modifications of the hepatic glutathione concentration on the metabolism of dichloromethane to carbon monoxide in rats. *Hum Exp Toxicol* 12(3) (1993) 227-31
100. Papadopoulos T, Ionescu L, Dammrich J, Toomes H, Muller-Hermelink HK: Type I and type IV collagen promote adherence and spreading of human type II pneumocytes in vitro. *Lab Invest* 62(5) (1990) 562-9
101. Parke DV, Ioannides C, Lewis DF: Computer modelling and other in vitro tests in the safety evaluation of chemicals. *Toxicology in vitro* 4 (1990) 680-5
102. Passlick B, Kubuschok B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K: Isolated tumor cells in bone marrow predict reduced survival in node-negative non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 68(6) (1999) 2053-8
103. Peter R, Bocker R, Beaune PH, Iwasaki M, Guengerich FP, Yang CS: Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem Res Toxicol* 3 (1990) 566-73
104. Piipari R, Savela K, Nurminen T, Hukkanen J, Raunio H, Hakkola J, Mantyla T, Beaune P, Edwards RJ, Boobis AR, Anttila S: Expression of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A, and polycyclic aromatic hydrocarbon-

- DNA adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers. *Int J Cancer* 86(5) (2000) 610-6
105. Plopper CG: Pulmonary bronchiolar epithelial cytotoxicity: microanatomical considerations. In: Gram TE (Ed): *Metabolic activation and toxicity of chemical agents to lung tissue and cells*. Pergamon Press, New York, Oxford, Seoul, Tokyo, 1993, S. 1-24
  106. Pool-Zobel BL, Leucht U: Induction of DNA damage by risk factors of colon cancer in human colon cells derived from biopsies. *Mutat Res* 375(2) (1997) 105-15
  107. Powley MW, Carlson GP: Cytochromes P450 involved with benzene metabolism in hepatic and pulmonary microsomes. *J Biochem Mol Toxicol* 14(6) (2000) 303-9
  108. Prough RA, Sipal Z, Jakobsson SW: Metabolism of benzo(a)pyrene by human lung microsomal fractions. *Life Sci* 21(11) (1977) 1629-35
  109. Ramakanth S, Thornton-Manning JR, Wang H, Maxwell H, Yost GS: Correlation between pulmonary cytochrome P450 transcripts and the organ-selective pneumotoxicity of 3-methylindole. *Toxicol Lett* 71(1) (1994) 77-85
  110. Rannels DE, Rannels SR: Influence of the extracellular matrix on type 2 cell differentiation. *Chest* 96(1) (1989) 165-73
  111. Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Pelkonen O, Anttila S, Piipari R, Boobis A, Edwards RJ: Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue. *Exp Toxicol Pathol* 51(4-5) (1999) 412-7
  112. Reddel RR, Hsu IC, Mass MJ, Hukku B, Gerwin BI, Salghetti SE, Somers AN, Galati AJ, Gunning WT III, Harris CC, et al: A human bronchial epithelial cell strain with unusual in vitro growth potential which undergoes neoplastic transformation after SV40 T antigen gene transfection. *Int J Cancer* 48(5) (1991) 764-73
  113. Robinson PC, Voelker DR, Mason RJ: Isolation and culture of human alveolar type II epithelial cells. Characterization of their phospholipid secretion. *Am Rev Respir Dis* 130(6) (1984) 1156-60
  114. Ross GM, McMillan TJ, Wilcox P, Collins AR: The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutat Res* 337(1) (1995) 57-60
  115. Runge DM, Stock TW, Lehmann T, Taeye C, Bernauer U, Stolz DB, Hofmann S, Foth H: Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. *Arch Toxicol* 75(6) (2001) 335-45
  116. Saladino AJ, Willey JC, Lechner JF, Grafstrom RC, LaVeck M, Harris CC: Effects of formaldehyde, acetaldehyde, benzoyl peroxide, and hydrogen peroxide on cultured normal human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 45(6) (1985) 2522-6
  117. Schmidt R, Scheufler H, Bauer S, Wolff L, Pelzing M, Herzsuh R: Toxicological investigations in the semiconductor industry: III: Studies on prenatal toxicity caused by waste products from aluminum plasma etching processes. *Toxicol Ind Health* 11(1) (1995) 49-61
  118. Schrader E, Hirsch-Ernst KI, Richter E, Foth H: Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357(3) (1998) 336-43
  119. Schulze J, Schrader E, Foth H, Kahl GF, Richter E: Effect of nicotine or cotinine on metabolism of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357(3) (1998) 344-50
  120. Schwerer MJ, Kraft K, Baczako K, Maier H: Coexpression of cytokeratins typical for columnar and squamous differentiation in sinonasal inverted papillomas. *Am J Clin Pathol* 115(5) (2001) 747-54
  121. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP: Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270(1) (1994) 414-23
  122. Shoji S, Rickard KA, Ertl RF, Robbins RA, Linder J, Rennard SI: Bronchial epithelial cells produce lung fibroblast chemotactic factor: fibronectin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1(1) (1989) 13-20
  123. Siegfried JM, Nesnow S: Cytotoxicity of chemical carcinogens towards human bronchial epithelial cells evaluated in a clonal assay. *Carcinogenesis* 5(10) (1984) 1317-22
  124. Siegfried JM, Rudo K, Bryant BJ, Ellis S, Mass MJ, Nesnow S: Metabolism of benzo(a)pyrene in monolayer cultures of human bronchial epithelial cells from a series of donors. *Cancer Res* 46(9) (1986) 4368-71
  125. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175 (1988) 184-91
  126. Statistisches Bundesamt: *Gesundheitsbericht für Deutschland*. Servicecenter Fachverlag GmbH, Reutlingen, 2001
  127. Stoner GD, Katoh Y, Foidart JM, Trump BF, Steinert PM, Harris CC: Cultured human bronchial epithelial cells: blood group antigens, keratin, collagens, and fibronectin. *In Vitro* 17(7) (1981) 577-87

128. Stosiek P, Kasper M, Moll R: Changes in cytokeratin expression accompany squamous metaplasia of the human respiratory epithelium. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421(2) (1992) 133-41
129. Suo Z, Holm R, Nesland JM: Squamous cell carcinomas. An immunohistochemical study of cytokeratins and involucrin in primary and metastatic tumours. *Histopathology* 23(1) (1993) 45-54
130. Surrallés J, Natarajan AT: Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat Res* 392 (1997) 165-74
131. Szturmowicz M, Sakowicz A, Wiatr E, Zych J, Zaleska J, Rudzinski P, Rowinska-Zakrzewska E: Evaluation of the value of determining levels of cytokeratin-19 fragments for diagnosis of lung cancer. *Pneumonol Alergol Pol* 63(11-12) (1995) 609-14
132. Tafazoli M, Kirsch-Volders M: In vitro mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropene, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes. *Mutat Res* 371 (1996) 185-202
133. Teiber JF, Hollenberg PF: Identification of the human liver microsomal cytochrome P450s involved in the metabolism of N-nitrosodi-n-propylamine. *Carcinogenesis* 21(8) (2000) 1559-66
134. Thornton-Manning JR, Ruangyuttikarn W, Gonzalez FJ, Yost GS: Metabolic activation of the pneumotoxin, 3-methylindole, by vaccinia-expressed cytochrome P450s. *Biochem Biophys Res Commun* 181(1) (1991) 100-7
135. Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ: Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* 27(25) (1988) 9006-13
136. Van Scott MR, Lee NP, Yankaskas JR, Boucher RC: Effect of hormones on growth and function of cultured canine tracheal epithelial cells. *Am J Physiol* 255(2 Pt 1) (1988) 237-45
137. Wang H, Lanza DL, Yost GS: Cloning and expression of CYP2F3, a cytochrome P450 that bioactivates the selective pneumotoxins 3-methylindole and naphthalene. *Arch Biochem Biophys* 349(2) (1998) 329-40
138. Wang SL, Lee H, Chen KW, Tsai KJ, Chen CY, Lin P: Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer* 26(1) (1999) 27-34
139. Watt KC, Plopper CG, Weir AJ, Tarkington B, Buckpitt AR: Cytochrome P450 2E1 in rat tracheobronchial airways: response to ozone exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 149(2) (1998) 195-202
140. Wheeler CW, Guenther TM: Spectroscopic quantitation of cytochrome P-450 in human lung microsomes. *J Biochem Toxicol* 5(4) (1990) 269-72
141. Whitcutt MJ, Adler KB, Wu R: A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 24(5) (1988) 420-8
142. Willey JC, Coy E, Brolly C, Utell MJ, Frampton MW, Hammersley J, Thilly WG, Olson D, Cairns K: Xenobiotic metabolism enzyme gene expression in human bronchial epithelial and alveolar macrophage cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14(3) (1996) 262-71
143. Willey JC, Coy EL, Frampton MW, Torres A, Apostolakis MJ, Hoehn G, Schuermann WH, Thilly WG, Olson DE, Hammersley JR, Crespi CL, Utell MJ: Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH Oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17(1) (1997) 114-24
144. Woodcroft KJ, Novak RF: Insulin differentially affects xenobiotic-enhanced, cytochrome P-450 (CYP)2E1, CYP2B, CYP3A, and CYP4A expression in primary cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 289(2) (1999) 1121-7
145. Woodcroft KJ, Novak RF: Xenobiotic-enhanced expression of cytochromes P450 2E1 and 2B in primary cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 26(4) (1998) 372-8
146. Wu R, Martin WR, Robinson CB, St George JA, Plopper CG, Kurland G, Last JA, Cross CE, McDonald RJ, Boucher R: Expression of mucin synthesis and secretion in human tracheobronchial epithelial cells grown in culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3(5) (1990) 467-78
147. Wu R, Nolan E, Turner C: Expression of tracheal differentiated functions in serum-free hormone-supplemented medium. *J Cell Physiol* 125(2) (1985) 167-81
148. Yendle JE, Tinwell H, Elliott BM, Ashby J: The genetic toxicity of time: importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. *Mutat Res* 375(2) (1997) 125-36
149. Zeitlin PL, Loughlin GM, Guggino WB: Ion transport in cultured fetal and adult rabbit tracheal epithelia. *Am J Physiol* 254(5 Pt 1) (1988) 691-8
150. Zepeda ML, Chinoy MR, Wilson JM: Characterization of stem cells in human airway capable of reconstituting a fully differentiated bronchial epithelium. *Somat Cell Mol Genet* 21(1) (1995) 61-73
151. Zerilli A, Lucas D, Amet Y, Beauge F, Volant A, Floch HH, Berthou F, Menez JF: Cytochrome P-450 2E1 in rat liver, kidney and lung microsomes after chronic administration of ethanol either orally or by inhalation. *Alcohol Alcohol* 30(3) (1995) 357-65

## 7 Thesen

1. Das bronchopulmonale System des Menschen ist dauerhaft wegen seiner respiratorischen Funktion inhalativ aufgenommenen Fremdstoffen ausgesetzt. Die Möglichkeit besteht, daß die Leber aspirierte Xenobiotika metabolisiert und diese hämatogen die Lunge erneut erreichen, um dort mit entsprechenden Zielstrukturen zu interagieren. Auf der anderen Seite ist anzunehmen, dafür sprechen auch die chemischen Eigenschaften vieler potentieller Pro- und Kanzerogene, daß das bronchopulmonale System selbst einen Beitrag zur Metabolisierung inhalativ aufgenommener Fremdstoffe leistet.
2. Die im Tierexperiment oder an permanenten Zelllinien gewonnenen Erkenntnisse lassen sich nur bedingt auf den Menschen übertragen. Daher wurde am Institut für Umwelttoxikologie der Univ. eine primäre Kultur NHBEC etabliert, um ein Modell zu installieren, daß die Sammlung und Interpretation von in-vitro-Daten an einem humanen System zuläßt.
3. Bei der Kultur NHBEC war die Anwendung serumfreier Kulturbedingungen für den selektiven Auswuchs von NHBEC wichtig. Serumfreie Medien bedingten die hohe Reinheit der Kultur NHBEC  $\geq 95\%$ . Eine Beschichtung der Kulturschalen mit einem Fibronectin-Kollagen-BSA-Gemisch förderte die Adhärenz der Zellen an der Kulturschalenoberfläche.
4. Die lichtmikroskopische Darstellung des kultivierten Zellauswuchses zeigte das für NHBEC typische „Pflastersteinrelief“ und belegte eine erfolgreiche Explantationskultur.
5. Die elektronenmikroskopische Visualisierung einzelner Zellen des Monolayers zeigte Zytokeratinfilamente, einen Bestandteil der Zytoskelettarchitektur epithelialer Zellen, und Mikrovilli, die ebenfalls von epithelialen Zellen exprimiert werden. Diese strukturellen Daten belegen den epithelialen Charakter unserer Kultur NHBEC.
6. Ein Zilienbesatz unter unseren monophasischen Kulturbedingungen war nicht zu erwarten und wurde nicht detektiert. Die Anwendung biphasischer Kulturbedingungen, also die Installation einer Luft-Medium-Grenzschicht, sollte erwogen werden, falls ein zilien-tragender Phänotyp für spezifische Untersuchungen erwünscht wäre. Der Einsatz eines serumhaltigen Mediums, daß eine Ziliogenese ebenfalls induziert, ist wegen der zu erwartenden starken Fibroblastenkontamination, und der damit beschränkten Interpretierbarkeit der Daten, nicht empfehlenswert.
7. Es war immunhistochemisch nachzuweisen, daß die Kultur NHBEC flächenhaft Zytokeratin, CK8/18 und CK7 im Zytosol exprimiert. Dies kann als weiterer Beleg für den bronchoepithelialen Charakter der Kultur gewertet werden.

8. Immunhistochemisch waren lediglich punktuelle Verunreinigungen mit Zellen detektierbar, die positiv auf Vimentin, einen Marker für filamentäre Strukturen mesenchymaler Zellen, und auf CD68, einem Antigen der Monozyten und Makrophagen, reagierten. Die Reaktionen waren negativ für Desmin, einem Antigen der glatten, Skelett- und Herzmuskelzellen, SMA, einem Antigen der glatten Muskelzellen und LCA, einem T-Zellen- und leukozytentypisches Antigen. Es ist daher davon auszugehen, daß die Kultur NHBEC eine Kultur hoher Originarität und einer Reinheit  $\geq 95\%$  ist. Diese hohe Reinheit der Kultur gewährleistet die Interpretierbarkeit der Daten für die NHBEC.
9. Die Westernblotanalytik zeigte für CK18 interindividuelle Schwankungen. Für CK19 konnte ein konstitutives Auftreten in der Kultur und im frischen NHBE detektiert werden. Dies ist ein weiterer Beleg für den bronchoepithelialen Charakter der Kultur NHBEC. Da CK19 ein typisches Zytokeratin der Basalzellen darstellt, ist dessen konstitutives Auftreten in der Kultur ein Hinweis darauf, daß es sich bei den explantierten Zellen um Teilungsprodukte der Basalzellen handeln könnte.
10. Für CYP2E1mRNA konnte sowohl im frischen NHBE, ausgenommen in der Lingula, als auch in der Kultur NHBEC ein konstitutives Auftreten festgestellt werden. In der Westernblotanalytik wurde im frischen bronchialen und einmal im pulmonalen Gewebe aber bis auf eine Ausnahme nicht in der Kultur der NHBEC CYP2E1-Protein detektiert. Dies spricht für ein häufig in kultivierten Zellen beobachtetes Phänomen, daß spezielle Proteinexpressionen, in unserem Falle das CYP2E1 in der Kultur NHBEC, niederreguliert werden.
11. Im CLX-Assay konnte bestätigt werden, daß durch Inkubation mit 40mM Ethanol, einem Induktor des CYP2E1, die CYP2E1-Expression am Kulturbeginn in Fragmenten des NHBE stabilisiert werden konnte.
12. In der RT/PCR konnte für die mRNA des CYP2B7, CYP2F1 und des CYP4B1 ein heterogenes Verteilungsmuster festgestellt werden. Die Detektion für CYP2B7 war immer positiv. Im Gegensatz dazu war CYP4B1 nie präsent. CYP2F1mRNA wurde lediglich in der Lingula beobachtet.
13. Die NHBEC sind ein sensitives Modell, um in Experimenten Einsatz zu finden, die umwelttoxikologische Fragestellungen betreffen. Im Cometassay konnte nach Inkubation eines KSG auf die NHBEC eine direkte Dosis-Wirkungs-Beziehung in Abhängigkeit zur Einwirkungszeit festgestellt werden.

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name: Stock  
Vornamen: Thomas Wilhelm Bernhard  
Geburtsdatum: 05.10.1967  
Geburtsort: Weißenfels/Saale  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch  
Staatsangehörigkeit: BRD

### Bildungsweg

1974-1984: mittlere Reife an der 9. Polytechnischen Oberschule Halle-Neustadt  
1984-1986: Abitur an der Erweiterten Oberschule Halle-Neustadt  
1986-1989: Wehrdienst als Kompaniesanitäter. Der Wehrdienst war mit einer Ausbildung zum Facharbeiter für Krankenpflege verbunden.  
1989-1995: Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1995-1996: Arzt im Praktikum in der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin der Martin-Luther-Universität  
1996-1997: Arzt im Praktikum in der Abteilung für Gefäßchirurgie der Chirurgischen Klinik des Sankt-Elisabeth-Krankenhauses Halle  
1997-1999: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Umwelttoxikologie der Martin-Luther-Universität  
1999-2001: Assistenzarzt in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität  
2001: Dissertationsbeendigung in einem Freisemester

Halle, 15.02.2002

Thomas Stock

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässiger Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, daß ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle, 15.02.2002

Thomas Stock

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, daß ich nur diesen Antrag auf Zulassung zum Promotionsverfahren eingereicht habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, 15.02.2002

Thomas Stock

## Veröffentlichungen

### Artikel

- Runge DM, Stock TW, Lehmann T, Taege C, Bernauer U, Stolz DB, Hofmann S, Foth H: Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. Arch Toxicol 75(6) (2001) 335-45

### Tagungsbeiträge

- Foth H, Schrader E, Rachidi A, Stock TW, Hirsch-Ernst KI, Kahl GF: Expression of cytochrome P-450 enzymes in human bronchial epithelium and primary culture of rat lung cells. Toxicology Letters Suppl. 1(1999) 36 (56)
- Foth H, Schrader E, Stock TW, Hirsch-Ernst KI: Short-term culture of rat alveolar type II (AII) cells - usefull model for metabolic investigations on chemically-induced carcinogenesis in the lung. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 358[1(2)] (1998) 559
- Lehmann T, Köhler C, Stehfest E, Stock TW, Foth H: Expression of MRP1 in human lung cells and effect of promoters of oxygen radicals. Toxicology Letters 123 Suppl. 1 (1999) 130 (481)
- Müller P, Stock TW, Bauer S, Wolff I: The alkaline comet assay: a useful tool to investigate DNA damage caused by complex mixtures. International Comet Assay Workshop 2001. Ulm
- Müller P, Stock TW, Wolff I, Bauer S, Foth H: Assessment of DNA damage in various mammalian cells using the alkaline comet assay. 30<sup>th</sup> Annual Meeting of EEMS-2000, Budapest, Hungary
- Müller P, Wolff I, Bauer S, Stock TW, Foth H: Assessment of DNA damage induced by complex mixtures of halogenated hydrocarbons using the alkaline comet assay. Toxicology Letters Suppl. 1 (2000) 136(36)
- Müller P, Wolff I, Bauer S, Stock TW, Foth H: Increased rates of micronuclei in cultured human lymphocytes following the treatment with a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 363(4) (2001) 583
- Runge DM, Stock TW, Beer Stolz D, Taege C, Runge D, Hofmann S, Silber RE, Holzhausen HJ, Foth H: Acute phase response and activation of hepatocyte growth factor receptor after ethanol and dichlormethan treatment of normal human bronchial epithelial cells in culture. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 361 (2000) 116

- Stock TW, Müller P, Lehmann T, Hofmann SH, Foth H, Silber RE: Activity, morphology and utility of primary normal human bronchial epithelial cells cultured from resection material. 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2001. Leipzig; <http://www.thieme.de/thoracic/abstracts2001/daten/fp12.html>
- Stock TW, Müller P, Wolff I, Bahn H, Foth H: Normal human bronchial epithelial cells as a tool to monitor genotoxic effects of complex mixtures. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359(3) (1999) 693
- Wolff I, Bauer S, Müller P, Stock TW, Pelzing M, Foth H: Toxicological characterization of complex mixtures from plasma etching processes. *Schriftenreihe der Deutschen Geologischen Gesellschaft* 9, S.155, *Umwelt 2000-Geowissenschaften für die Gesellschaft*, 22.-25.9.2000, Halle/S.
- Wolff I, Müller P, Stock TW, Bauer S, Foth H: Generation of DNA single-strand breaks by complex mixtures. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359(3) (1999) 666
- Wolff I, Müller P, Stock TW, Bauer S, Foth H: Genotoxic activity of complex mixtures from plasma etching in lymphocytes, bronchial cells and hepatocytes. *Toxicology Letters Suppl.* 1(1999) P100 (47)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Foth für die Bereitstellung des Themas und für die Gewährung der Möglichkeit am Institut für Umwelttoxikologie der Univ. im Rahmen des Landesprojektes „Stabilität und Expression von Cytochrom P-450 und P-Glykoproteinen in isolierten Lungen sowie Pneumozyten in Primärkultur – Konservierung zellulärer Funktionen für die Evaluierung der Wirkung von Umweltnoxen“, FKZ:2311A/0085H zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Pankow danke ich herzlich für seine Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Wolff und Herrn Dr. Bauer danke ich für die Betreuung und Diskussionsbereitschaft zu zellkulturellen und gentoxikologischen Fragestellungen.

Frau und Herrn Drs. Runge danke ich für die Zusammenarbeit bei der Westernblotanalytik.

Herrn Dipl.-Biochem. Lehmann danke ich für die Zusammenarbeit bei der RT/PCR.

Frau Dipl.-Biol. Müller gilt mein besonderer Dank für die sehr gute Zusammenarbeit, ständige Diskussionsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Rosemeier, Frau Grygier, Frau May, Frau Funk, Frau Henzel, Frau Lachmund, Frau Jäger und Frau Kleist danke ich für die freundliche Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor.

Den Leitern der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, den Herren Prof. Dr. Zerkowski und Prof. Dr. Silber sowie dem Sektionsleiter der Thoraxchirurgie, Herrn Prof. Dr. Neef gelten mein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit mit unserem Institut. Diesen Dank möchte ich auf die thoraxchirurgischen Operateure Herren Drs. Meyer und Hofmann und deren Assistenten ausweiten. Vor allem den Operationsschwestern und -pflegern bin ich für ihre Hilfsbereitschaft verbunden.

Ich danke dem Leiter des Institutes für Pathologie Herrn Prof. Dr. Rath für die Kooperation. Aus diesem Institut danke ich Herrn Prof. Dr. Holzhausen für die Zusammenarbeit bei der elektronenmikroskopischen Auswertung und Herrn Dr. Bahn für die Zusammenarbeit bei der immunhistochemischen Auswertung der Kultur NHBEC.

Der Leiterin des BgVV Frau Prof. Dr. Gundert-Remy und Frau Dr. Bernauer, Herrn Dr. Ellrich und Frau Dr. Heinrich-Hirsch danke ich für ihre hervorragende Unterstützung bei der Untersuchung der CYP2E1-Funktionalität und für die Durchführung des CLX-Assay.

Frau Regener danke ich für die organisatorische und Frau Helle und Herrn Auffahrt für die rechentechnische Unterstützung.