

» Die Genetik der neuronalen NO-Synthase (NOS1) in der Ätiologie des Asthma bronchiale

H. Grasemann

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin,
Universitätsklinikum Essen

Zusammenfassung: Das reaktive Sauerstoffradikal Stickstoffmonoxid (NO) wird von Enzymen gebildet, die NO-Synthasen (NOS) genannt werden. NO ist in den Atemwegen an einer Vielzahl pathophysiologischer Prozessen beteiligt, wie z. B. bei Entzündungen der Atemwege, bei allergischen Krankheiten und dem Asthma bronchiale. Beim Asthma handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, die Umwelteinflüssen unterliegt, aber auch genetische Ursachen hat. In so genannten Kopplungsstudien, mit familiärer DNA, konnte eine genetische Verbindung der chromosomalen Region 12q mit allergischen Krankheiten, erhöhtem Serum IgE und der Entstehung von Asthma gezeigt werden. Das Gen, das für die neuronale NOS (NOS1) kodiert, ist ein attraktives Kandidaten-Gen für das Asthma; nicht nur weil es in der chromosomalen Region 12q24 lokalisiert ist, sondern auch weil experimentelle Studien an Tieren und Menschen lassen vermuten, dass NOS1 beim Asthma eine wichtige Rolle spielt. In einem Tiermodell für allergisches Asthma, zum Beispiel, konnte gezeigt werden, dass NOS1 es für die Entwicklung einer bronchialen Hyperreagibilität wichtig ist, da *nos1*-defiziente Mäuse eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Bronchoprovokation besaßen, als Wildtyp und *nos2*-defiziente Mäuse. Bei Menschen wurden in Fall-Kontroll Studien allelische Assoziationen zwischen polymorphen Markern im NOS1 Gen und der Asthmadignose beschrieben. Zudem besteht eine enge Korrelation zwischen den bei Asthmatikern erhöhten NO-Konzentrationen in den Atemwegen und der Größe einer intronischen (AAT)_n-Wiederholungssequenz im NOS1 Gen. Ziel dieser Übersichtsarbeit ist es, Studien, aus denen sich Hinweise auf eine Beteiligung der NOS1 an der Genetik des Asthma bronchiale ergeben, zusammenfassend darzustellen.

Genetics of the Neuronal NO-Synthase (NOS1) in the Aetiology of Asthma bronchiale: The free radical nitric oxide (NO) is endogenously produced by enzymes known as NO synthases. NO in the airways is involved in a number of pathophysiological processes, such as airway inflammation, allergic reactions, and asthma. Asthma is a multifactorial disease that is caused by environmental and genetic factors. Genome wide screening approaches in families revealed evidence for linkage between chromosomal region 12q and allergic diseases, increased serum IgE levels as well as the development of asthma. The gene encoding for neuronal NOS (NOS1) is an attractive candidate gene for asthma, not only because it is localized in chro-

mosomal region 12q24. Experimental studies in animals and humans suggest that NOS1 plays an important role in asthma. For instance, in a murine model of allergic asthma, NOS1 has been shown to be important for the development of bronchial hyperresponsiveness, since mice deficient for the *nos1* gene were less responsive to airway challenge than both wild-type mice and mice deficient for the *nos2* gene. Case-control studies in humans revealed allelic associations between polymorphic markers in the NOS1 gene and the diagnosis of asthma. Furthermore, increased concentrations of NO in the airways of asthmatics are closely related to the size of an intronic (AAT)_n-repeat polymorphism in the NOS1 gene. The purpose of this review is to summarize studies that provide evidence for an involvement of NOS1 in the genetics of asthma.

Einleitung

Das reaktive Sauerstoffradikal Stickstoffmonoxid (NO) ist ein endogen gebildeter Botenstoff, der in den Atemwegen in eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie die Regulation von Gefäßmuskeltonus und der vaskulären Permeabilität, die Neurotransmission, sowie die Modulation von Immunfunktion und Infektabwehr verwickelt ist [1–4]. NO wird von Enzymen produziert, die NO-Synthasen (NOS) genannt werden. Man unterscheidet drei verschiedene NOS-Isoformen, die jeweils von einem anderen Gen kodiert werden. Das Gen der neuronalen NOS, oder NOS1, liegt auf dem langen Arm von Chromosom 12 (12q24.2) [5], das der induzierbaren NOS, oder NOS2, auf Chromosom 17 (17qcen-q12) [6], und das der endothelialen NOS, oder NOS3, auf Chromosom 7 (7q35–36) [7]. Die NO-Synthasen katalysieren die chemische Oxidation der semiessenziellen Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und NO.

NO-Synthasen werden in der Lunge von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen exprimiert, unter anderem von Nerven-, Muskel-, und Atemwegsepithelzellen [2, 8]. Während die NO-Synthese der konstitutiven NOS1 und NOS3 überwiegend von der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration abhängt, wird die Aktivität der NOS2 auf transkriptioneller Ebene geregelt. IFN-γ wird am häufigsten mit einer gesteigerten Aktivität von NOS2 in Verbindung gebracht. Aber, wie unter anderem an Atemwegsepithelzellen gezeigt, können auch andere Zytokine wie TNF-α und IL-1β eine Transkription initiieren, die zu einer gesteigerten Enzymaktivität von NOS2 führt [8–10]. Andererseits wird die Transkription und Aktivität von NOS2, wahrscheinlich via NF-κB-Elemente im 5'-Ende des NOS2-Gens, durch Kortikosteroide herabgesetzt [11]. Obwohl die Aktivität

von NOS1 und NOS3 vermutlich überwiegend durch Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen reguliert wird, gibt es in letzter Zeit auch Hinweise auf eine induzierbare Aktivität dieser so genannten konstitutiven NOS. So konnte für NOS3 gezeigt werden, dass sich ihre Messenger-RNA-Spiegel bei mechanischen Reizen, wie Scherstress, verändern [12,13]. Ähnlich kann die Transkription von NOS1 durch zahlreiche physische Stimuli, wie Hypoxie, Hitze, elektrische Impulse und Entzündungsreize erhöht werden [14–18]. Darüber hinaus wird die Regulation der NOS1-Aktivität durch eine Vielzahl bekannter Transkripte beeinflusst. Diese verschiedenen Transkripte entspringen der ausgeprägten genetischen Vielfalt von NOS1, mit mindestens neun alternativen Promotoren, Deletions- und Insertionspolymorphismen von Exons und dem Gebrauch von Polyadenylierungssignalen, deren Existenz auf eine erhebliche Variabilität der NOS1 Messenger-RNA rückschließen lässt [19]. Interessanterweise wurde in Gliazellen der Ratte zudem eine Interaktion zwischen NOS1 und NOS2 beschrieben. In diesen Experimenten inhibierte NOS1 die Expression von NOS2 durch eine Suppression von NF- κ B [20]. In einer anderen Untersuchung an Geweben von Ratten wurde die Expression von NOS2 durch LPS und IFN- γ induziert, während die von NOS1 supprimiert wurde, was einen gegenläufigen Regulationsmechanismus dieser beiden Enzyme vermuten lässt [21].

Die biologische Halbwertszeit von NO ist gering, da es in biologischen Systemen schnell zu einer Vielzahl von Metaboliten reagiert, die in der epithelialen lining fluid und in der Ausatemluft gemessen werden können [22]. NO und NO-Metabolite haben in den Atemwegen zahlreiche, teils entgegengesetzte Wirkungen, die noch nicht vollständig verstanden werden. Zum Beispiel kann NO durch die Bildung von Nitrosothiolen (SNOs) bronchodilatatorisch wirken oder kann zu Molekülen wie Peroxynitrit ($OONO^-$) metabolisiert werden, das in den Atemwegen pro-inflammatorisch wirkt. Die Konzentrationen von NO sind in den Atemwegen von Asthmatikern erhöht [23–25], womöglich als Folge einer vermehrten Expression von NOS2 in Atemwegsepithelzellen von Asthmatikern [26]. Weil sich die NO-Konzentrationen bei Asthmatikern unter einer anti-inflammatorischen Therapie mit Kortikosteroiden oder Leukotrienantagonisten verringern [24,25,27], wird die NO-Messung als nicht-invasive Methode zur Erfassung und Kontrolle einer Atemwegsinflammation bei Asthmatikern von einigen Zentren durchgeführt und empfohlen, obwohl der genaue zelluläre und molekulare Ursprung des in den Atemwegen messbaren NO noch unklar ist.

Studien an Mäusen

Um die Rolle der verschiedenen NOS-Isoformen für die Inflammation und Hyperreagibilität der Atemwege beim Asthma zu untersuchen, wurden Studien an transgenen Mäusen durchgeführt, bei denen eine Deletion von unterschiedlichen NOS-Genen bestand. In einem Modell für allergisches Asthma konnte gezeigt werden, dass NOS2-defiziente Mäuse in den Atemwegen signifikant weniger Inflammation, inklusive Infiltration mit Eosinophilen, pulmonalem Ödem und Plasmaexsudation in das Lumen aufwiesen als Wildtyp-Mäuse [28]. In diesem Modell resultierte die verminderte NO-Produktion weder in einer veränderten Typ-2-vermittelten Antwort von spezifischem IgG1 oder IgE, noch konnte eine veränderte Produktion von IL-4 oder IL-5 durch T-Zellen der Lunge

beobachtet werden. Allerdings kam es zu einer Zunahme der IFN- γ -Produktion durch T-Zellen. Die zentrale Rolle von IFN- γ in diesem Modell zeigte sich auch darin, dass eine „normale“ allergische Inflammation und Pathologie der NOS2-defizienten Mäuse durch eine Behandlung mit Antikörpern gegen IFN- γ während der Allergisierung gegen Ovalbumin wieder hergestellt werden konnte. Allerdings wurde die Hyperreagibilität der Atemwege gegenüber Methacholin durch den Mangel an NOS2 nicht beeinträchtigt [28]. Diese interessanten Ergebnisse, die nahelegen, dass NOS2 bei der bronchialen Hyperreagibilität allergischer Atemwegserkrankungen, zumindest in der Maus, keine zentrale Bedeutung zukommt, konnte in einer anderen experimentellen Studie bestätigt werden, in der Mäuse benutzt wurden, die entweder für jeweils eines der drei NOS-Gene oder für NOS1 und NOS3 defizient waren [29]. Obwohl in dieser Studie die Aktivität der NOS2 in der Lunge der mit Ovalbumin sensibilisierten und allergisierten Wildtyp-Mäuse signifikant erhöht war und NOS2, wie erwartet, bei den gleich behandelten NOS2-defizienten Mäusen nicht nachweisbar war, unterschieden sich diese Tiere bezüglich ihrer Atemwegshyperreagibilität nicht. Allerdings zeigten in diesem Modell für allergisches Asthma sowohl die NOS1- als auch die NOS1 & 3-defizienten Tiere gegenüber dem Wildtyp eine signifikant verminderte Reagibilität der Atemwege gegenüber Methacholin (Abb. 1) [29]. Dies bestätigte die zuvor berichtete Beobachtung einer verringerten Sensitivität der Atemwege unbehandelter, nicht sensibilisierter Mäuse, die eine gezielte Deletion des NOS1-Gens aufwiesen [30].

Diese Daten von Experimenten mit Mäusen lassen eine nicht-inflammatorische Verbindung zwischen dem NOS1-Gen und der bronchialen Hyperreagibilität vermuten. Daher wurde in weiterführenden Studien die genetische Verbindung zwischen NOS1 und dem Asthma bronchiale näher untersucht. In einer Reihe von Studien an Menschen, die im nächsten Abschnitt diskutiert werden, konnte eine Verknüpfung des NOS1-Locus mit der Asthma-Diagnose und mit asthma-verwandten Phänotypen etabliert werden.

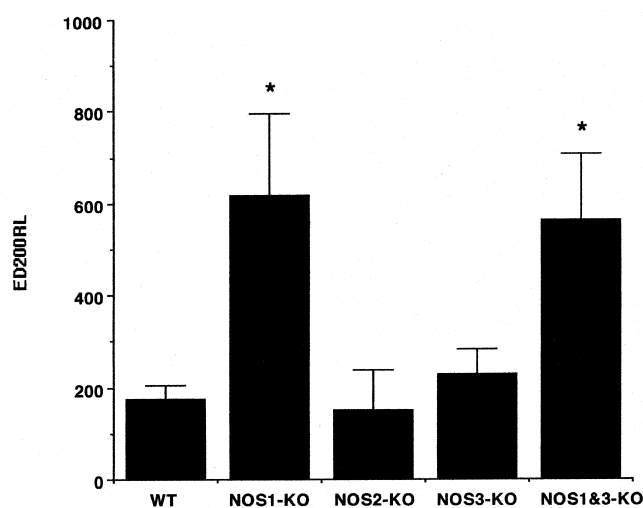


Abb. 1 Reagibilität der Atemwege auf Methacholin als ED₂₀₀RL bei anästhetisierten, OVA-sensibilisierten Wildtyp- (WT) sowie NOS1-, NOS2-, NOS3- und NOS1 & 3-defiziente (KO) Mäusen. Die Reagibilität der NOS1- sowie NOS1 & 3-defizienten Mäuse war, gegenüber den Wildtyp Mäusen, signifikant herabgesetzt (* = $p < 0,01$) [29].

Genom-weite Kopplungsstudien

Das Gen, das beim Menschen für NOS1 kodiert, liegt auf dem langen Arm von Chromosom 12. Diese Region ist von speziellem Interesse, da sie eine Reihe potenzieller Kandidatengene für das Asthma enthält, wie STAT-6, IFN- γ , das B-cell translocation-Gen 1 (BTG1), sowie die Gene für den Stammzellfaktor (SCF), die Leukotrien-A₄-Hydrolase (LTA₄H), den Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), die Phenylalanin-Hydroxylase (PAH), den Mast Cell Growth Factor (MGF), die β -Untereinheit des Nuclear Factor-Y (NFY β), und das NOS1-Gen, die alle in die chromosomale Region 12q13.12-q24.2 gemapped wurden. Mit Hilfe des genomweiten Screenings wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien in Familien durchgeführt, um chromosomale Regionen zu identifizieren, die an die Entstehung von Asthma gekoppelt sind. Unter den Loci im Genom, die in diesen Studien identifiziert wurden, fanden sich für die Region 12q13-q24.2 reproduzierbar Hinweise auf eine Kopplung mit der Asthma-Diagnose in verschiedenen voneinander unabhängigen Populationen, darunter in einer afrokaribischen Population [31], in Hispanics [32] und in verschiedenen kaukasischen Populationen [32–34]. Diese chromosomale Region scheint außerdem, wie in anderen Kopplungsstudien in einer afrokaribischen Population, bei den Amish, sowie in verschiedenen kaukasischen Populationen gezeigt werden konnte, mit einem erhöhten Serum-IgE [31,35,36] und dem Auftreten einer allergischen Rhinitis in Verbindung zu stehen [37].

Assoziationsstudien

Das NOS1-Gen des Menschen zeigt in der kodierenden Region sowie in den Initiierungsmustern der Transkription und dem Gebrauch der Exons einen hohen Grad an Übereinstimmung mit anderen Spezies, was dafür spricht, dass es lange während der Evolution konserviert wurde. Das NOS1-Gen ist einer der komplexesten bekannten Loci im menschlichen Genom und erstreckt sich über eine Region von mehr als 240 kb. Die Gene von NOS2 sowie von NOS3 sind mit 37 kb bzw. 21 kb erheblich kleiner. Das 1434 Aminosäuren zählende NOS1-Protein des Menschen wird von 28 Exons kodiert, wobei sich die „translation initiation site“ in Exon 2 und die „termination site“ in Exon 29 befinden [38]. Es gibt neun Varianten des Exon 1 in der 5'-flanking Region, die wahrscheinlich gewebe-spezifisch zur Initiierung der Transkription rekrutiert werden [19]. Das NOS1-Gen enthält eine Reihe von polymorphen Markern. Dinukleotid (CA)_n-Wiederholungssequenzen wurden in der 5'-flankierenden Region von Exon 1, dem 5'-Ende von Intron 2 und im 5'-Ende von Exon 29 gefunden. Ein Trinukleotid-(AAT)_n-Repeat befindet sich in Intron 20, und drei „common single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) wurden in Exon 18, Exon 22 und Exon 29 gefunden [38,39]. In den Studien, in denen eine genetische Assoziation zwischen NOS1 und Asthma untersucht wurden, fanden einige dieser Marker Verwendung.

Die erste Studie, die eine Assoziation zwischen Asthma und dem NOS1-Gen zeigen konnte, wurde in den USA durchgeführt [39]. In dieser Studie wurden insgesamt 410 weiße Asthma-Patienten und 228 nicht-asthmatische weiße Probanden auf SNPs in Exon 18, Exon 22, und Exon 29 des NOS1-Gens untersucht. Die Patienten dieser Studie hatten ein leicht-bis mittelgradiges Asthma und wiesen mindestens 8 Stunden

nach Inhalation eines β -Agonisten eine Einsekundenkapazität (FEV₁) zwischen 40 und 85% des Vorhersagewertes auf. Diese Asthma-Patienten wurden mit Freiwilligen verglichen, bei denen nach eigenen Angaben kein Asthma und keine Allergie bekannt war. Für den SNP in Exon 29 bestand zwischen Asthmatikern und Kontrollen ein signifikanter Unterschied in den Allelfrequenzen [39]. Die gleiche Arbeitsgruppe berichtete in einer anderen Studie auch über eine signifikante Assoziation eines (CA)_n-Repeat-Polymorphismus in Exon 29 des NOS1 mit Asthma [40]. In dieser Studie wurden 490 kaukasische Asthma-Patienten, die für eine Multizenter-Asthma-Therapie-Studie in den USA rekrutiert worden waren, mit zwei verschiedenen Kontrollpopulationen verglichen. Die eine bestand aus 350 College-Studenten aus Boston, Massachusetts, und Rekruten der US Army. Die zweite Gruppe wurde von 1131 normalen Individuen aus verschiedenen Orten der Vereinigten Staaten gebildet, die an der „Physicians Health Study“ teilgenommen hatten. Diese Kontrollen hatten auf einem Fragebogen angegeben, kein Asthma zu haben. Die Allelfrequenzen der beiden Kontrollpopulationen waren nahezu identisch, was darauf schließen lässt, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Substrukturen der Populationen gab. Zwischen den Asthmatikern und den Kontrollen bestanden aber erhebliche Unterschiede in den Allelfrequenzen. Das (CA)₁₈-Allel wurde bei den Asthmatikern signifikant (0,06 vs. 0,12, $p < 0,001$) seltener gefunden. Dieses Allel scheint demnach, mit einer Odds Ratio von 0,49 (95% CI 0,34–0,69), gegenüber Asthma protektiv zu sein (Tab.1). Obwohl die genomweiten Studien Hinweise auf eine Kopplung von Asthma und Serum-IgE mit der chromosomalen Region 12q14-q24 gefunden hatten, konnte in dieser Fall-Kontroll-Studie jedoch keine Assoziation des Markers im NOS1-Gen mit dem Serum-IgE gefunden werden, was darauf schließen lässt, dass ein anderes Gen dieser Region für ein erhöhtes Gesamt-IgE im Serum verantwortlich ist [40]. Das Ergebnis einer IgE-unabhängigen Assoziation zwischen dem NOS1-Gen und Asthma konnte auch in einer Studie an 300 Personen aus Großbritannien bestätigt werden, in der ein genetischer Marker in Intron 2 des NOS1-Gens untersucht wurde [41]. Die Unterschiede in den Allelfrequenzen lagen mit einer Odds Ratio von 2,08 (95% CI 1,20–3,57) in dem Bereich der amerikanischen Assoziationsstudie. Die britische Population wurde außerdem für Polymorphismen in den Genen von NOS2 und NOS3 typisiert, ohne dass aber eine Assoziation zwischen diesen Genen und einem Asthma bronchiale gefunden werden konnte [41].

Tab. 1 Frequenzen von Allel 18 einer (CA)_n-Wiederholungssequenz in Exon 29 des NOS1-Gens bei Asthmatikern und Kontrollen [39]

	n	Allel 18	p-Wert	Odds Ratio
Asthma	490	0,061		
Kontrollen I	350	0,119	<0,001	0,49 (0,30–0,80)
Kontrollen II	1131	0,101	<0,001	0,58 (0,43–0,78)

NO in den Atemwegen

Erhöhte Konzentrationen von NO in der Ausatemluft ($F_E\text{NO}$) gehören zu den phänotypischen Eigenschaften des Asthma bronchiale. In Abwesenheit asthmaprovozierender Ereignisse und von Asthmatherapie bleibt das $F_E\text{NO}$ im einzelnen Patienten über die Zeit relativ stabil. Die Verteilung des $F_E\text{NO}$ innerhalb einer Asthma-Population unterliegt allerdings einer hohen interindividuellen Variabilität. Die Messwerte überlappen mit denen der Normalpopulation, da ein Teil der Asthmatiker niedrige Konzentrationen aufweist, wie sie für normale Personen charakteristisch sind (Abb. 2) [23–25]. Obwohl die genaue molekulare Herkunft des NO in der Ausatemluft noch ungeklärt ist, gibt es Hinweise aus Tierversuchen, dass die neuronale NOS der Maus (*nos1*) erheblich zum NO in der Ausatemluft beisteuert [30,42]. Wegen der bekannten Assoziation zwischen der Größe von Trinukleotid-Wiederholungssequenzen und zahlreichen neuromuskulären Erkrankungen beim Menschen wurde in einer Studie an Asthmatikern das Verhältnis zwischen der Größe einer polymorphen Trinukleotid-Wiederholungssequenz im NOS1-Gen und $F_E\text{NO}$ untersucht [43]. In dieser Studie wurden 97 Patienten mit leichtgradigem Asthma für einen (AAT)_n-Repeat-Polymorphismus in Intron 20 von NOS1 genotypisiert. $F_E\text{NO}$ wurde zu einem Zeitpunkt gemessen, an dem die Patienten in den vergangenen 30 Tagen weder mit inhalativen noch systemischen Kortikosteroiden behandelt worden waren. Die Größe der AAT-Repeats variierte zwischen acht und 17 Wiederholungen. Die Allele unterlagen bezüglich ihrer Länge einem bimodalen Verteilungsmuster, wobei Allel 10 am unteren und die Allele 13 und 14 am oberen Teil des Spektrums besonders häufig waren (Abb. 3). Ein Vergleich der Patienten, bei denen mindestens ein Allel kleiner als 12 Wiederholungen war, mit denen, die zwei Allele mit mindestens 12 AAT-Repeats aufwiesen, zeigte erhebliche Unterschiede

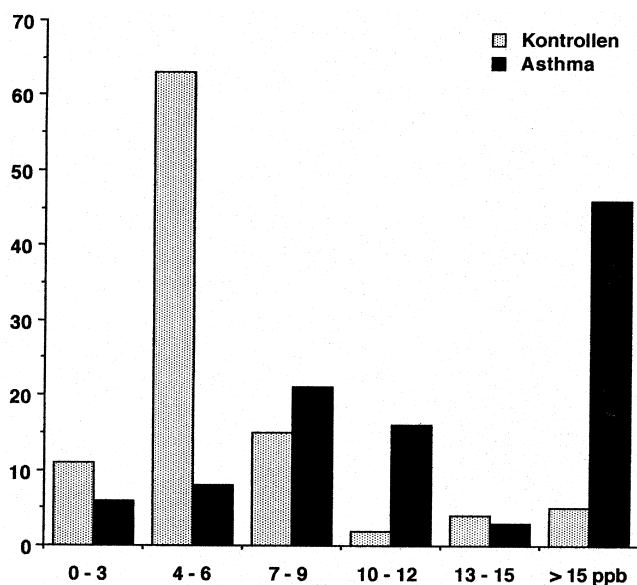


Abb. 2 Stickstoffmonoxid (NO) in Parts per Billion (ppb) in der gemischten Ausatemluft von Patienten mit Asthma (n = 43) und Kontroll-Personen (n = 90). Die NO-Konzentrationen der Kontrollen ($6,5 \pm 0,6$ ppb, Mittelwert \pm SEM) waren signifikant ($p < 0,001$) niedriger als die der Asthmatiker ($14,4 \pm 1,7$ ppb) [25].

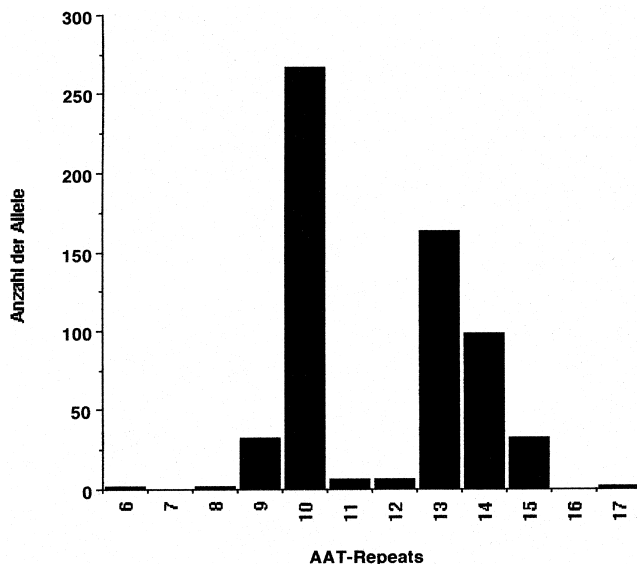


Abb. 3 Bimodale Verteilung der Allele einer (AAT)_n-Wiederholungssequenz in Intron 20 des NOS1-Gen bei 305 Kontroll-Personen [41].

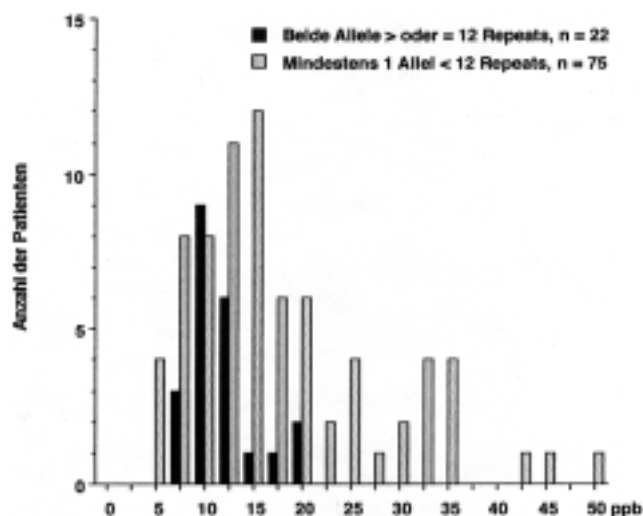


Abb. 4 Verteilung der NO-Konzentrationen in der Ausatemluft von 97 Patienten mit Asthma, in Abhängigkeit von der Größe einer (AAT)_n-Wiederholungssequenz in Intron 20 des NOS1-Gen. Patienten mit beiden Allelen ≥ 12 AAT-Repeats ($10,8 \pm 3,6$ ppb, Mittelwert \pm SEM) zeigten signifikant ($p < 0,0001$) niedrigere NO-Konzentrationen als Patienten mit mindestens einem Allel kleiner als 12 Repeats ($16,6 \pm 10,1$ ppb) [41].

de im $F_E\text{NO}$ zwischen diesen Gruppen. Das mittlere $F_E\text{NO}$ ($p < 0,0001$) sowie die Variabilität um den jeweiligen Mittelwert waren in der Gruppe mit langen Wiederholungen signifikant niedriger ($p < 0,00001$) (Abb. 4). Da niedrige NO-Konzentrationen eigentlich als Charakteristikum von Nicht-Asthmatikern gelten, wurden daraufhin von derselben Arbeitsgruppe die Allelfrequenzen des AAT-Repeats im NOS1-Gen von 305 weißen Kontrollpersonen und 495 Asthmatikern verglichen. Die Allele, die bei Asthmatikern mit einem niedrigen $F_E\text{NO}$ assoziiert waren, kamen bei Gesunden signifikant häufiger vor als bei Asthmatikern ($p < 0,01$) [43].

Diese Ergebnisse unterstützen die Hinweise aus anderen Untersuchungen, dass neurale Mechanismen generell, und NO im Besonderen, zu der Pathophysiologie und den Symptomen des Asthma bronchiale beisteuern. Es ist vorstellbar, dass Patienten mit zwei langen AAT-Repeats im NOS1-Gen über Funktionsstörungen von NANC-Nerven verfügen, die zu niedrigen und weniger variablen NO-Konzentrationen in den Atemwegen führen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für Trinukleotid-Wiederholungssequenzen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese einiger neurodegenerativer Erkrankungen gezeigt werden konnte. Zu diesen Erkrankungen gehören die myotone Dystrophie, der Morbus Huntington, die spinocerebellare Ataxie und das fragile X-Syndrom [44,45]. Bei der spinocerebellaren Ataxie zum Beispiel, entscheidet ein Unterschied von nur einer intronischen Trinukleotid-Wiederholung über die neuronale Dysfunktion bei einer Gesamtlänge in der Größenordnung von 20 Repeats [46].

Die komplexe Interaktion zwischen Inflammation und neuraler Kontrolle der Atemwege mittels inflammatorischer Mediatoren, die die Neurotransmission beeinflussen, und umgekehrt einer Modulation der inflammatorischen Antwort durch Neurotransmitter in den Atemwegen, ist bekannt. Neben den klassischen adrenergen und cholinergen Nervensystemen gibt es in der Lunge ein nicht-adrenerges, nicht-cholinerges (NANC-)System, in dem NO ein wichtiger Neurotransmitter ist, der beim Menschen beispielsweise die induzierbare bronchodilatatorische Antwort steuert [47]. Eine Komponente der neurogenen Regulation beim Asthma stellt möglicherweise das NO der NOS1 dar, das zusammen mit dem NO der anderen NO-Synthasen in unterschiedlichem Ausmaß in die Inflammation der Atemwege verwickelt sein könnte. Genetische Varianten in anderen Genen, die zu dieser komplexen Interaktion beisteuern und entweder noch nicht gefunden oder noch nicht ausreichend untersucht wurden, so wie ein biallelischer Polymorphismus im Gen der NOS2 [48] oder die E298D-Mutation in Exon 7 des NOS3-Gen, könnten einen wichtigen Einfluss auf diese neuro-inflammatorische Interaktion beim Asthma ausüben. Weitere Hinweise auf eine immunregulatorische Rolle der NOS1 in den Atemwegen kommen aus einer Studie mit Mukoviszidose-Patienten, in denen die Länge des oben erwähnten intronischen AAT-Repeats im NOS1-Gen neben dem F_eNO auch mit der Kolonisierung der Atemwege durch *Pseudomonas aeruginosa* und *Aspergillus fumigatus* korrelierte [49].

Literatur

- ¹ Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002–2012
- ² Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993; 48: 1034–1043
- ³ Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997; 100: 2146–2152
- ⁴ Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417–2423
- ⁵ Xu W, Gorman P, Sheer D, Bates G, Kishimoto J, Lizhi L, Emson P. Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1) to chromosome 12q24.2-24.31 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 64: 62–63
- ⁶ Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffmann EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 6765–6772
- ⁷ Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478–17488
- ⁸ Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard G, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10089–10093
- ⁹ Robbins RA, Barnes PJ, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Geller DA, Polak JM. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 209–218
- ¹⁰ Gutierrez HH, Pitt BR, Schwarz M, Watkins SC, Lowenstein C, Caniggia L, Chumley P, Freeman BA. Pulmonary alveolar epithelial inducible NO synthase gene expression: regulation by inflammatory mediators. *Am J Physiol* 1995; 268: L501–508
- ¹¹ Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269: 4705–4708
- ¹² Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992; 90: 2092–2096
- ¹³ Awolesi MA, Widmann MD, Sessa WC, Sumpio BE. Cyclic strain increases endothelial nitric oxide synthase activity. *Surgery* 1994; 116: 439–444
- ¹⁴ Sharma HS, Westman J, Alm P, Sjoquist PO, Cervos-Navarro I, Nyberg F. Involvement of nitric oxide in the pathophysiology of acute heat stress in the rat. Influence of a new antioxidant compound H-290/51. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 813: 581–590
- ¹⁵ Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL. Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1250–1255
- ¹⁶ Shaul PW, North AJ, Brannon TS, Ujii K, Wells LB, Nisen PA, Lowenstein CJ, Snyder SH, Star RA. Prolonged in vivo hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and type III gene expression in adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 167–174
- ¹⁷ Prabhakar NR, Rao S, Premkumar D, Pieramici SF, Kumar GK, Kalaria RK. Regulation of neuronal nitric oxide synthase gene expression by hypoxia. Role of nitric oxide in respiratory adaptation to low pO₂. *Adv Exp Med Biol* 1996; 410: 345–348
- ¹⁸ Calza L, Giardino L, Pozza M, Micera A, Aloe L. Time-course changes of nerve growth factor, corticotropin-releasing hormone, and nitric oxide synthase isoforms and their possible role in the development of inflammatory response in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3368–3373
- ¹⁹ Wang Y, Newton DC, Robb GB, Kau CL, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN, Marsden PA. RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12150–12155
- ²⁰ Togashi H, Sasaki M, Frohman E, Taira E, Ratan RR, Dawson TM, Dawson VL. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2676–2680
- ²¹ Bandyopadhyay A, Chakder S, Rattan S. Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon-gamma and VIP. *Am J Physiol* 1997; 272: C1790–1797
- ²² Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 538–551

- ²³ Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994; 343: 146–147
- ²⁴ Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133–135
- ²⁵ Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 800–803
- ²⁶ Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993; 342: 1510–1513
- ²⁷ Bisgaard H, Loland L, Oj JA. NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene receptor antagonist montelukast. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1227–1231
- ²⁸ Xiong Y, Karupiah G, Hogan SP, Foster PS, Ramsay AJ. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J Immunol* 1999; 162: 445–452
- ²⁹ De Sanctis GT, MacLean JA, Hamada K, Mehta S, Scott J, Jiao A, Yandava CN, Kobzic L, Wolyniec WW, Fabian A, Venugopal CS, Grasemann H, Huang PL, Drazen JM. Contribution of nitric oxide synthases 1, 2 and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. *J Exp Med* 1999; 189: 1621–1630
- ³⁰ De Sanctis GT, Mehta S, Kobzic L, Yandava C, Jiao A, Huang PL, Drazen JM. Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. *Am J Physiol* 1997; 273: L883–L888
- ³¹ Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, Freidhoff LR, Breazeale DR, Schou C, Naidu RP, Levett PN, Renault B, Kucherlapati R, Iozzino S, Ehrlich E, Beaty TH, Marsh DG. Linkage of asthma and serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics* 1996; 37: 41–50
- ³² The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nature Genet* 1997; 15: 389–392
- ³³ Thomas NS, Wilkinson J, Holgate ST. The candidate gene approach to the genetics of asthma and allergy. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: S144–S151
- ³⁴ Ober C, Cox NJ, Abney M, Di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, Gidley H, Kurtz B, Lee J, Nance M, Pettersson A, Prescott J, Richardson A, Schlenker E, Summerhill E, Willadsen S, Parry R. and The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. Genomewide search for asthma susceptibility loci in a founder population. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1393–1398
- ³⁵ Nickel R, Wahn U, Hizawa N, Maestri N, Duffy DL, Barnes KC, Beyer K, Forster J, Bergmann R, Zepp F, Wahn V, Marsh DG. Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German multicenter allergy study. *Genomics* 1997; 46: 159–162
- ³⁶ Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I, Boussaha M, Bousquet J, Charpin D, Degioanni A, Gormand F, Grimfeld A, Hochez J, Hyne G, Lockhart A, Luillier-Lacombe M, Matran R, Meunier F, Neukirch F, Pacheco Y, Parent V, Paty E, Pin I, Pison C, Scheinmann P, Thobie N, Vervloet D, Kauffmann F. Genome screen for asthma and related phenotypes in the french EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1812–1818
- ³⁷ Barnes KC, Freidhoff LR, Nickel R, Chiu YF, Juo SH, Hizawa N, Naidu RP, Ehrlich E, Duffy DL, Schou C, Levett PN, Marsh DG, Beaty TH. Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 485–491
- ³⁸ Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem* 1994; 269: 33082–33090
- ³⁹ Grasemann H, Yandava CN, Drazen JM. Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29 Suppl 4: 39–41
- ⁴⁰ Grasemann H, Yandava CN, Storm van's Gravesande K, Deykin A, Pillari A, Ma J, Sonna LA, Lilly C, Stampfer MJ, Israel E, Silverman EK, Drazen JM. A neuronal NO synthase (NOS1) gene polymorphism is associated with asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 391–394
- ⁴¹ Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao XQ, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh Y, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Moro-oka S, Inoko H, Ho LP, Shirakawa T, Hopkin JM. Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 361–363
- ⁴² Steudel W, Kirmse M, Weimann J, Ullrich R, Hromi J, Zapol WM. Exhaled nitric oxide production by nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1262–1267
- ⁴³ Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A, Silverman EK, Yandava CN, Israel E, Wand M, Drazen JM. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2043–2047
- ⁴⁴ Timchenko LT, Caskey CT. Trinucleotide repeat disorders in humans: discussions of mechanisms and medical issues *FASEB. J* 1996; 10: 1589–1597
- ⁴⁵ Martin JB. Molecular pathobiology of neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 1999; 340: 1970–1980
- ⁴⁶ Pearson CE, Sinden RR. Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 321–330
- ⁴⁷ Belvisi MG, Ward JK, Mitchell JA, Barnes PJ. Nitric oxide as a neurotransmitter in human airways. *Arch Int Pharmacodyn* 1995; 329: 97–110
- ⁴⁸ Grasemann H, Deykin A, Pillari A, Israel E, Yandava CN, Drazen JM. Association of a polymorphism in the promoter region of the inducible NO synthase (NOS2) gene with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: A646
- ⁴⁹ Grasemann H, Knauer N, Büscher R, Hübner K, Drazen JM, Ratjen F. Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2172–2176

Dr. med. H. Grasemann

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstr. 55
45147 Essen

E-mail: hartmutg@hotmail.com