

Regulation des Chemokins CC-Ligand-2
im pulmonalen Entzündungsverlauf
durch alveolär rekrutierte Monozyten

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

vorgelegt von Sandra Wellmann
aus Marburg

Gießen 2009

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Sonderforschungsbereich 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“
Sprecher: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Gutachter: Prof. Dr. U. Lange

Tag der Disputation: 19.04.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1. Monozyten	1
1.2. Das CC-Chemokin CCL2	2
1.3. Der CC-Chemokinrezeptor CCR2.....	4
1.4. Immunantwort auf Lipopolysaccharid.....	4
1.5. Zielsetzung und experimenteller Ansatz.....	6
2. Material und Methoden	7
2.1. Versuchstiere.....	7
2.1.1. CCR2-defiziente und Wildtypmäuse.....	7
2.1.2. Generierung von chimären Mäusen mittels Knochenmarkstransplantation.....	7
2.2. Narkose.....	8
2.3. Intratracheale Instillation von E. coli Lipopolysaccharid.....	9
2.4. Applikation des CCR2-Antikörpers MC21 bei Wildtypmäusen.....	9
2.4.1. Intraperitoneale CCR2-Antikörper-Applikation.....	9
2.4.2. Intratracheale CCR2-Antikörper-Applikation.....	10
2.5. Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test.....	10
2.6. Bronchiallavage.....	10
2.7. Behandlungsprotokolle.....	11
2.8. Aufbereitung der Bronchiallavageflüssigkeit.....	12
2.8.1. Bestimmung der Zellzahl.....	12
2.8.2. Differenzierung und Quantifizierung der leukozytären Zellpopulationen.....	13
2.8.3. Bestimmung der Zytokinspiegel.....	13
2.9. Anfertigung von histologischen Lungenschnittpräparaten.....	14
2.10. Blutentnahme bei der Maus.....	14
2.11. Durchflusszytometrie.....	15
2.11.1. Prinzip der Durchflusszytometrie.....	15
2.11.2. Separation muriner peripherer Blutmonozyten.....	16
2.12. In-vitro-Versuche.....	17
2.13. Statistik.....	18

3. Ergebnisse	19
3.1. Alveolärer Entzündungsverlauf nach intratrachealer LPS-Instillation bei Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen.....	19
3.1.1. Zytologische Befunde in der Bronchiallavage.....	19
3.1.2. Histologische Befunde.....	21
3.1.3. Zytokinprofil in der Bronchiallavage.....	23
3.2. Einfluss von neutralisierenden CCR2-Antikörpern auf den alveolären Entzündungsverlauf nach LPS-Gabe bei Wildtypmäusen.....	25
3.2.1. Effekte einer systemischen CCR2-Antikörper-Gabe.....	25
3.2.2. Effekte einer intratrachealen CCR2-Antikörper-Gabe.....	27
3.3. Alveolärer Entzündungsverlauf nach intratrachealer LPS-Instillation bei chimären Wildtyp- und chimären CCR2-defizienten Mäusen.....	28
3.4. In-vitro-Untersuchungen.....	30
4. Diskussion	32
4.1. Übertragbarkeit der Befunde auf andere Spezies.....	37
4.2. Klinische Relevanz.....	38
5. Zusammenfassung	40
6. Abstract	42
7. Literaturverzeichnis	43
Anhang	
Hergestellte Lösungen.....	59
Materialien, Versuchstiere und Bezugsquellen.....	60
Geräte und Herstellernachweis.....	63
Eidesstattliche Erklärung	64
Danksagung	65
Lebenslauf	66

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
Ca	Kalzium
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CCR2-/-	CC-Chemokinrezeptor-2-defizient
CD	<i>cluster of differentiation</i> , auch <i>cluster determinant</i>
CINC	<i>cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
d	Tage
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>constant fragment</i> eines Antikörpers
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	<i>forward scatter</i>
G	Gauge
g	Gramm
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
Gy	Gray
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSA	humanes Serumalbumin

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	intraperitoneal
IT	intratracheal
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LBP	<i>lipopolysaccharide-binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MCAF	<i>monocyte chemotactic and activating factor</i> (entspricht CCL2)
Mg	Magnesium
min	Minuten
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PB-Mo	peripherer Blutmonozyt
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
pg	Pikogramm
rCCL2	CCL2, rekombinant
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	<i>standard deviation</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Pulmonale Entzündungsvorgänge sind an vielen Lungenerkrankungen beteiligt, zum Beispiel an der chronisch-obstruktiven Bronchitis, der exogen-allergischen Alveolitis, der Sarkoidose, der Lungenfibrose, der Pneumonie und dem ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome). Unter epidemiologischen Gesichtspunkten ist die Pneumonie als Volkskrankheit von besonderer Relevanz. In den Industrieländern stellt sie die Haupttodesursache unter den Infektionserkrankungen dar [84]. Hohe klinische Bedeutung besitzt auch das ARDS. Dabei handelt es sich um ein akutes Lungenversagen auf dem Boden einer schweren Schädigung der alveolo-kapillären Barriere. Obschon die Überlebensrate des ARDS in den letzten Jahren etwas verbessert werden konnte, geht es nach wie vor mit einer hohen Mortalität einher [9].

Vor diesem klinischen Hintergrund gilt der Pathophysiologie pulmonaler Entzündungsvorgänge nach wie vor großes Interesse, insbesondere angesichts der Tatsache, dass bislang keine pharmakologischen Behandlungsansätze für das ARDS in der Klinik zu Verfügung stehen. Der typische inflammatorische Ablauf bei Pneumonie und ARDS ist geprägt durch alveoläre Zytokinfreisetzungen, die eine frühe Neutrophilen- und eine nachfolgende Monozytenrekutierung in das alveoläre Kompartiment induzieren [82, 105, 116]. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass das lokale Zytokinprofil [77] im Alveolarraum [105] den Wechsel von der frühen Neutrophilen- zur späteren Monozytenrekutierung im Entzündungsverlauf steuert. Über die Regulation von Dauer und Ausmaß des entzündlich bedingten Monozyteneinstroms in die Alveolen ist demgegenüber bisher wenig bekannt. In der vorliegenden Studie wurde deshalb dieser Aspekt untersucht.

1.1. Monozyten

Monozyten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, von wo aus sie ins Blut gelangen [89]. Sie stellen eine Fraktion des mononukleären Phagozytensystems dar und sind zentrale Komponenten der angeborenen Immunantwort [21]. Als Progenitorzellen von Gewebsmakrophagen wandern sie sowohl konstitutiv als auch drastisch verstärkt bei pulmonaler Inflammation in den Alveolarraum, wo sie sich zu Alveolarmakrophagen differenzieren und den residenten Alveolarmakrophagenpool austauschen [62] bzw. erweitern [82]. Auch vor dieser terminalen Differenzierung sind diese Zellen als Monozyten in der Zirkulation und als Exsudatmakrophagen nach Rekrutierung ins Gewebe

im Entzündungsgeschehen aktiv [44, 110]. Sie sind zur Phagozytose und zur Antigenpräsentation fähig [88]. Als Reaktion auf verschiedene Stimuli können Monozyten lysosomale Enzyme [119], Superoxidanionen [111, 119] und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α [59, 76] und Interleukin-1 β [96] sezernieren. Exsudatmakrophagen besitzen nach ihrer Migration in den Alveolarraum eine höhere Kapazität zur TNF- α -Freisetzung auf LPS-Stimulation als zirkulierende Blutmonozyten [59].

Bei verschiedenen Entzündungskrankheiten der Lunge spielen Monozyten eine aktive Rolle: Beim idiopathischen Pneumoniesyndrom nach Knochenmarkstransplantation wird angenommen, dass ein primär durch oxidativen Stress initiiertes Lungengewebschaden durch die alveoläre Monozytenakkumulation verstärkt wird [10]. Die experimentell durch Endotoxin ausgelöste Alveolitis, bei der zunächst neutrophile Granulozyten rekrutiert werden, wird durch die nachfolgende Rekrutierung von mononukleären Phagozyten verstärkt [65, 66]. An ARDS-Patienten wurde gezeigt, dass die Ausprägung der respiratorischen Insuffizienz mit dem Ausmaß der Monozytenakkumulation im Alveolarraum und der alveolären Freisetzung des monozytenrekrutierenden Chemokins CCL2 korreliert [82]. Neben ihrer proinflammatorischen Rolle besitzen mononukleäre Phagozyten jedoch auch antiinflammatorische und reparative Funktionen [108, 113, 28], die sie in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Differenzierung in einen M1 oder M2 Phänotyp entfalten können [28, 29].

1.2. Das CC-Chemokin CCL2

Neben der Freisetzung von Progenitoren aus dem Knochenmark ist die gerichtete Migration von Leukozyten aus der Blutbahn zum Entzündungsort im Gewebe von vitaler Bedeutung bei der Infektabwehr [100, 110]. Hochspezialisierte Zytokine, Chemokine genannt, und ihre heptahelikalen Rezeptoren auf zirkulierenden Blutzellen sind daran zentral beteiligt [112]. Neben ihrer chemotaktischen Aktivität können Chemokine auch aktivierend oder funktionsmodulierend auf Immunzellen Einfluss nehmen. Ein konserviertes strukturelles Merkmal der Chemokine ist ihr Aminoterminus. Man unterscheidet anhand der Anzahl und Position der Cysteinreste am Aminoterminus vier Chemokinfamilien, genannt C-, CX₃C-, CXC und CC-Chemokine [79, 112].

Ein Prototyp der CC-Chemokine ist CCL2 [4, 57, 79]. Produziert wird es von Makrophagen [12, 13], Endothelzellen [81], vaskulären glatten Muskelzellen [43], Typ-II-Alveolarepithelzellen [47, 73, 83, 94], Fibroblasten [107, 118], Keratinozyten [69], peritonealen

Mesothelzellen [77] und neutrophilen Granulozyten [14] als Reaktion auf proinflammatorische Stimuli wie IL-1 β , TNF- α , Endotoxin oder IFN- γ . Unter bestimmten Bedingungen wird CCL2 auch von peripheren Blutmonozyten synthetisiert [20, 97]. Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten [1, 4, 5, 52, 58, 72, 80, 102, 119], aber auch auf Makrophagen [24], T-Lymphozyten [16] und basophile Granulozyten [3], ist aber auch an der Freisetzung von mononukleären Phagozyten aus dem Knochenmark beteiligt [100]. Die Rolle des Chemokins CCL2 bei der Monozytenwanderung ins Gewebe ist gut dokumentiert [1, 78]. Verschiedene transgene Mausmodelle haben einen kausalen Zusammenhang zwischen der Gen-Überexpression von CCL2 und der Monozytenrekrutierung in verschiedene Organe wie die Langerhans-Inseln im Pankreas [33], das Gehirn [24], die Haut [69] und die Lunge [35] gezeigt. CCL2 ist in der Lage, unter dynamischen Flussbedingungen *in vitro* eine feste Adhäsion von Monozyten an das Gefäßendothel herbeizuführen [27]. In mononukleären Zellen verstärkt das Chemokin die Expression von β_2 -Integrinen [42, 106], wichtigen Adhäsionsmolekülen für die Transmigration von Monozyten über die endo- und epitheliale Barriere [53, 83]. Zudem kann CCL2 in Monozyten die Sekretion von Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9 induzieren; dabei handelt es sich um ein matrixdegradierendes Enzym, welches die Überwindung der Basalmembran im Rahmen der leukozytären Extravasation erleichtert [76]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass CCL2 in Monozyten einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration initiiert und einen oxidativen Burst vermittelt [80]. Es aktiviert Monozyten, die daraufhin die in Kapitel 1.1. genannten lysosomalen Enzyme [119] und Superoxidanionen [111, 119] freisetzen. Aufgrund dieser Fähigkeiten wird CCL2 zu den proinflammatorischen Zytokinen [26] gezählt.

Bei verschiedenen Entzündungskrankheiten spielt CCL2 für die inflammatorische Monozytenakkumulation eine Rolle, z. B. bei Arteriosklerose [31, 34, 54, 70], bei Glomerulonephritis [18, 25], rheumatoider Arthritis [46] und Multipler Sklerose [41, 45]. Auch im Spektrum der entzündlichen Lungenerkrankungen besitzt CCL2 eine wichtige Rolle [79]. Erhöhte CCL2-Konzentrationen wurden in der Bronchiallavageflüssigkeit von Patienten mit Sarkoidose, idiopathischer Lungenfibrose [15], Hypersensitivitätspneumonitis [95] und ARDS [30, 82] gefunden.

In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass CCL2 über einen zellulären Mechanismus abgebaut werden kann. Dabei bindet CCL2, nach alter Nomenklatur MCAF (monocyte chemotactic and activating factor) genannt [2, 121], an seinen spezifischen Rezeptor, der Liganden-Rezeptor-Komplex wird internalisiert, CCL2 zum Teil intrazellulär zersetzt und in Fragmenten wieder freigegeben [110].

1.3. Der CC-Chemokinrezeptor CCR2

Das Chemokin CCL2 ist ein hochaffiner Ligand eines heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptors namens CCR2 [4, 11, 17, 79, 112, 114]. Es gibt viele Hinweise dafür, dass das CCL2-Signal bei Mäusen ausschließlich über CCR2-Bindung in die Zielzelle geleitet wird [11]. CCR2 wird bei der Maus wie beim Menschen von zirkulierenden Monozyten exprimiert [56]. Daneben zeigen Alveolarmakrophagen, Alveolarepithelzellen [63], Fibroblasten [68] und T-Zellsubpopulationen [56] eine CCR2-Expression.

Die monozytäre Expressionsdichte von CCR2 unterliegt einer Regulation durch verschiedene Faktoren: Dazu gehören CCL2 selbst [56, 110], LPS, IL-1 und TNF- α [92]. Außerdem geht die Transmigration von Monozyten *in vitro* mit einer Minderung der CCR2-Expressionsdichte einher [57]. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die Differenzierung von Monozyten in Alveolarmakrophagen die CCR2-Expression reduziert [63]. Im Unterschied zur Maus existiert CCR2 beim Menschen in zwei Isoformen, CCR2A und CCR2B, die beide mit dem Agonisten CCL2 interagieren [17, 114].

1.4. Immunantwort auf Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharide (LPS) sind hochpotente Toxine der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, die als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) vom angeborenen Immunsystem erkannt werden [89]. An der LPS-Erkennung durch Wirtszellen ist das Oberflächenmolekül CD14 [22, 93, 103] zusammen mit weiteren Proteinen beteiligt. Die Bindung von LPS an CD14 kann durch das lösliche Akute-Phase-Protein LBP (Lipopolysaccharide-binding protein) erleichtert und auch beschleunigt werden [37, 98, 115]. Neben CD14 gehören der Toll-like-Rezeptor (TLR) 4 [39, 49, 91, 117], der als zentraler Mustererkennungsrezeptor fungiert und die Signalübertragung ins Zellinnere vermittelt [113], und sein assoziiertes Molekül MD-2 [91, 117] zum LPS-Rezeptorkomplex. In einer früheren Publikation wurde demonstriert, dass humane Monozyten und Neutrophile die Rezeptoren CD14 und TLR4 tragen und *in vitro* auf LPS reagieren [85]. Die zelluläre Antwort auf LPS besteht in der Aktivierung [93] von Signalkaskaden wie NF κ -B und MAP-Kinasen [113, 117], die zur Induktion von (B-)Zellproliferation [71] und Zytokinsynthese [96, 113] führen.

Hinsichtlich der Zytokinfreisetzung wurde gezeigt, dass LPS *in vitro* eine Sekretion von Tumornekrosefaktor (TNF) aus Alveolarmakrophagen [8, 59] und Monozyten [96, 59] auslöst. Tumornekrosefaktor wird als endogener Mediator von LPS-Effekten angesehen [7]. Auch eine CCL2-Freisetzung wird durch LPS induziert [96] wie auch in Kapitel 1.2. beschrieben. Außerdem setzen mit LPS stimulierte Alveolarepithelzellen in Kultur MIP-2 (Macrophage inflammatory protein 2) frei [40]. Dabei handelt es sich um ein CXC-Chemokin [5], das aufgrund seiner chemotaktischen und aktivierenden Wirkung auf Neutrophile [23, 32, 36, 90] als wichtiger Mediator bei pulmonalen Entzündungsprozessen gilt [23, 32, 90]. Die Ausprägung LPS-induzierter Entzündungsantworten *in vivo* hängt von der einwirkenden LPS-Dosis ab [104]. In tierexperimentellen Versuchen wurde gezeigt, dass eine intratracheal verabreichte Dosis von 10 ng LPS bei Mäusen mit einem Gewicht von 18–21 g eine Neutrophilie in den Alveolen auslöst [61]. Bei 200–250 g schweren Ratten wurde eine intratracheale Instillation von 100 µg LPS benötigt, um eine alveoläre Entzündungsreaktion mit einem frühen Neutrophilen-, einem folgenden Monozyten- und einem späten Lymphozyteninfiltrat zu induzieren [105].

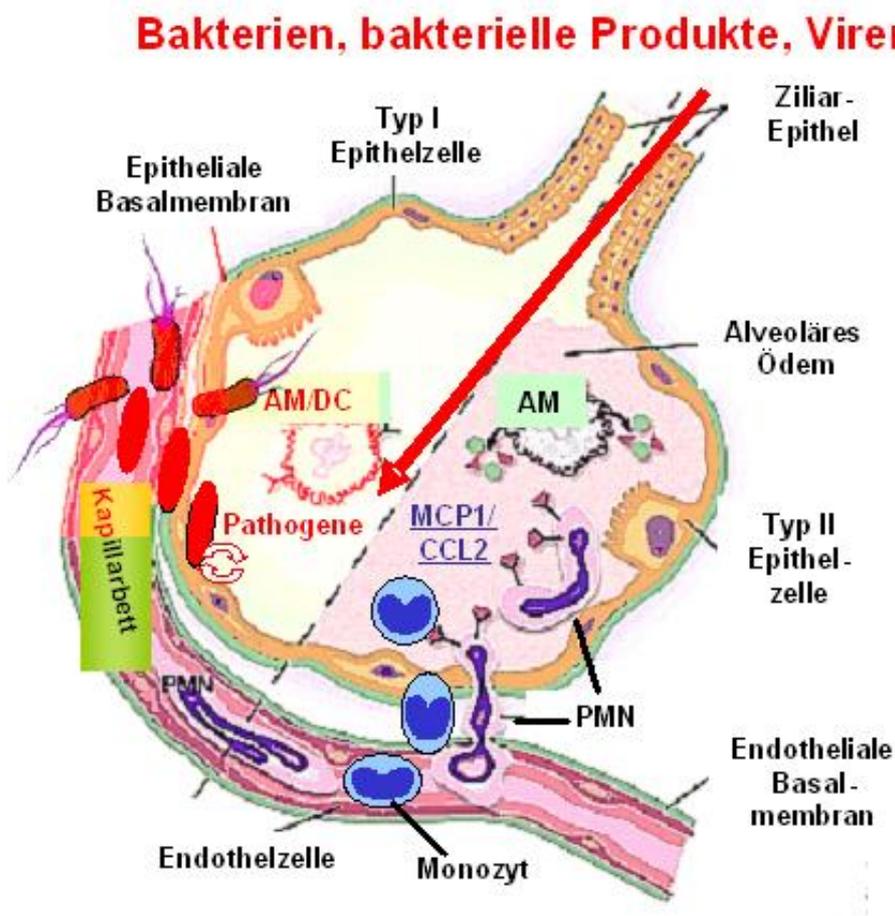


Abb. 1: Entzündungsvorgänge in der Alveole nach Pathogenexposition

1.5. Zielsetzung und experimenteller Ansatz

In der aktuellen Studie wurde folgende Hypothese geprüft: CCR2-tragende Monozyten regulieren ihre entzündungsbedingte Rekrutierung in den Alveolarraum im Sinne eines negativen Feedback, indem sie mit steigender Akkumulation die CCL2-Konzentration im Alveolarraum durch Konsumption dieses Chemokins erniedrigen und damit den chemotaktischen Gradienten unterbrechen. Experimentell wurden hierzu parallel zur alveolären Monozytenrekrutierungskinetik nach intratrachealer LPS-Gabe die alveolären CCL2-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage bestimmt. Genutzt wurde das bereits etablierte tierexperimentelle Versuchssystem der akuten LPS-induzierten pulmonalen Inflammation [59–61, 63, 65, 66, 105].

Um die Rolle des Rezeptors CCR2 in diesem Kontext zu spezifizieren [65, 66], wurden Wildtyp- und CCR2-defiziente Mäuse sowie durch Knochenmarkstransplantation generierte chimäre Wildtyp- und chimäre CCR2-defiziente Mäuse [66] dem beschriebenen Behandlungsregime unterworfen und miteinander verglichen. Zusätzlich wurde der neutralisierende CCR2-Antikörper MC21 [56] einerseits systemisch (intraperitoneal), andererseits lokal (intratracheal) eingesetzt, um die Funktion des Rezeptors CCR2 in verschiedenen Kompartimenten zu blockieren und die an gendeletierten Mäusen erhobenen Befunde im Wildtyphintergrund zu überprüfen.

Schließlich wurden – ergänzend zu den tierexperimentellen Versuchen – In-vitro-Experimente mit Monozyten von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen durchgeführt, um festzustellen, ob murine periphere Blutmonozyten in Kultur CCL2-Protein reduzieren können, und ob diese Konsumption durch CCR2 vermittelt wird.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

2.1.1. CCR2-defiziente und Wildtypmäuse

CCR2-defiziente Mäuse wurden von Prof. William A. Kuziel (University of Texas, USA) durch gezielte CCR2-Gendeletion generiert [50] und im Rahmen einer internationalen Kooperation zur Verfügung gestellt. Das deletierte CCR2-Gen dieser Mäuse der Zuchtlinie C57BL/6x129/Ola wurde über 6 Generationen in den BALB/c-Hintergrund eingezüchtet. Die Zuchtpaare und ihre Nachkommen wurden unter spezifischen, keimfreien Bedingungen (specific pathogen free, SPF) vermehrt und gehalten. Die Nachkommen wurden für die Versuche eingesetzt.

Außerdem wurde mit gleichgeschlechtlichen Wildtypmäusen der Zuchtlinie BALB/c gearbeitet. Alle Mäuse hatten direkten Zugriff auf Wasser und Futter. Im Alter von 8–12 Wochen wurden sie bei einem Gewicht von 18–21 g den Versuchen unterzogen. Der Gesundheitszustand aller Versuchstiere wurde regelmäßig überprüft. Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

2.1.2. Generierung von chimären Mäusen mittels Knochenmarkstransplantation

Für die Generierung von chimären Wildtypmäusen wurde Knochenmark von CCR2-defizienten Spendermäusen in gleichgeschlechtliche Wildtypempfängermäuse transplantiert. Umgekehrt wurde Knochenmark von Wildtypspendermäusen in gleichgeschlechtliche CCR2-defiziente Empfängermäuse transplantiert, um chimäre CCR2-defiziente Mäuse zu erzeugen. Die Transplantationen wurden wie folgt durchgeführt:

Zur Isolation von Knochenmarkszellen wurden die Spendermäuse mit einer Überdosis Isofluran per inhalationem getötet, dann mit 70%iger Ethanollösung gründlich desinfiziert. Anschließend wurde das Fell vom Körper gelöst. Die Hinterbeine wurden unter sterilen Bedingungen freipräpariert und am Hüftkopf exartikuliert. Vorsichtig wurden Femur und Tibia von ihrer Muskulatur befreit und unter Durchtrennung des Ligamentum patellae voneinander gelöst. Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurden beide Enden des Knochenschafts von Femur und Tibia mit einem sterilen Einmalskalpell abgetrennt.

Die so eröffnete Knochenmarkshöhle wurde mit Mausmedium (RPMI 1640 mit GlutaMax und 10 % Mausserum) in 300 µl Aliquots über eine Omnifix-100-Spritze (30 G Kanüle) gespült. Die gewonnenen Suspensionen wurden über 70 und 40 µm Nylonsiebe filtriert, um sie von Zellaggregaten zu befreien. Die filtrierten Zellen wurden anschließend in Leibovitz L15 Medium gewaschen.

Vor Transplantation der Knochenmarkszellen erhielten die Empfängermause eine myeloablativ Ganzkörperbestrahlung von insgesamt 12 Gy, fraktioniert in 2 Sitzungen (zu 8 Gy, dann 4 Gy) im Abstand von 3 h aus einem Cobalt-60-Strahler. In Narkose wurden ihnen dann jeweils 1×10^7 unfraktionierte Spenderzellen als Suspension in 150 µl Leibovitz L15 Medium mit einer Omnican-30-Spritze (29 G Kanüle) unter sterilen Bedingungen in die laterale Schwanzvene injiziert. Die transplantierten Mäuse wurden dann unter spezifischen keimfreien Bedingungen mindestens 3–4 Wochen bis zum Beginn der Versuche gehalten. Die beschriebene Methode der Knochenmarkstransplantation bewirkt einen fast vollständigen Austausch der jeweiligen Monopoese mit „Engraftment-Effizienzen“ von etwa 96 %, wobei residente Alveolarmakrophagen während des Beobachtungszeitraums nach Transplantation nicht ersetzt werden, wie vorherige Untersuchungen ergaben [109].

2.2. Narkose

Sämtliche Eingriffe an der lebendigen Maus wurde in Narkose vorgenommen. Dabei wurde Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun®) zur Sedierung und Muskelrelaxation und Ketamin als Narkotikum und Analgetikum eingesetzt. Vorbereitend wurden 200 µl Xylazinhydrochlorid 2 % mit 300 µl NaCl 0,9 % gemischt. Von dieser Lösung wurden 150 µl entnommen und mit weiteren 750 µl NaCl 0,9 % verdünnt. Die entstandene Gebrauchslösung wurde den Mäusen in einer Menge von je 50 µl intramuskulär verabreicht. Die Ketaminhydrochloridlösung Ketavet® (100 ng/ml) wurde mit NaCl 0,9 % im Verhältnis 1:3 angesetzt. Davon wurden den Mäusen zunächst jeweils 60 µl appliziert, weitere 20–30 µl wurden bei Bedarf zusätzlich nachgegeben. Die Augen der Mäuse wurden mit Bepanthen®-Augensalbe versorgt, um ein intraoperatives Austrocknen zu verhindern.

2.3. Intratracheale Instillation von E.coli Lipopolysaccharid

Wildtyp- und CCR2-defiziente Mäuse sowie chimäre Wildtyp- und chimäre CCR2-defiziente Mäuse wurden wie beschrieben narkotisiert. Dann wurden die Tiere in Rückenlage fixiert. Das Operationsfeld über der Trachea wurde mit einem Einmalrasierer von Fell befreit und desinfiziert. Über der Trachea wurde ein etwa 5 mm langer senkrechter Hautschnitt angelegt. Dann wurde die Trachea vorsichtig freipräpariert und 3–4 Trachealspannen unterhalb des Kehlkopfs mit der Spitze einer 23 G Kanüle punktiert. Ein steriler 26 G Abbocath-Verweilkatheter wurde eingebracht. Über diesen Katheter wurde E. coli Lipopolysaccharid (LPS, in der Dosis 0,1 µg, 1 µg, 10 µg, bzw. 20 µg pro Maus) in jeweils 70 µl PBS mit 0,1 % HSA langsam in 10 µl Aliquots bei gleichzeitiger Beobachtung der In- und Expiration unter stereomikroskopischer Kontrolle in die Lunge instilliert. Bei den Chimärenmäusen wurde LPS lediglich in einer Dosis von 20 µg pro Maus appliziert. Nach erfolgreicher Instillation wurde der Venenverweilkatheter aus der Trachea entfernt und das Operationsgebiet mit zwei bis drei Einzelkopfnähten (Vicryl 6.0) wieder verschlossen. Nach Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgebracht, wo sie freien Zugang zu Futter und Wasser hatten.

2.4. Applikation des CCR2-Antikörpers MC21 bei Wildtypmäusen

2.4.1. Intraperitoneale CCR2-Antikörper-Applikation

In dieser Versuchsreihe wurden Wildtypmäuse 6 h vor der intratrachealen Applikation von 20 µg LPS mit dem CCR2-Antikörper MC21 (CCR2 mAb, Klon MC21, Isotyp IgG2b von der Ratte, antimurin) systemisch vorbehandelt. Dazu wurden sie wie oben beschrieben narkotisiert, dann in Rückenlage fixiert. Das Bauchfell dieser Tiere wurde mit Hilfe eines Einmalrasierers entfernt, die Haut wurde desinfiziert. Die Bauchhaut und das Peritoneum wurden mit einer Hand etwas angehoben, mit der anderen Hand wurden 250–500 µg CCR2-Antikörper in einer Omnican-30-Spritze unter Schonung der Leber steril in die Bauchhöhle injiziert. Die so behandelten Mäuse wurden danach wie beschrieben wieder in ihren Käfigen gehalten.

2.4.2. Intratracheale CCR2-Antikörper-Applikation

In der nächsten Versuchsserie wurden Wildtypmäuse für eine intratracheale Instillation vorbereitet wie beschrieben. Intratracheal appliziert wurden dann nacheinander der CCR2-Antikörper MC21 (100 µg pro Maus) und LPS (20 µg pro Maus) auf gleiche Weise wie zuvor für LPS allein geschildert. Um Auswirkungen zu erfassen, die nicht auf die CCR2-blockierende Eigenschaft des Antikörpers zurückgehen, erhielten weitere Wildtypmäuse neben 20 µg LPS einen Kontrollantikörper. Der Kontrollantikörper wurde in gleicher Weise Menge und in gleicher Menge wie der CCR2-Antikörper MC21 verabreicht.

2.5. Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test

Um Effekte einer Endotoxinkontamination des Antikörpers und der verwendeten Lösungen auszuschließen, wurden sie einem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test unterzogen. Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) bezeichnet einen wässrigen Extrakt von Blutzellen des Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus*. Modifiziertes LAL enthält ein farbloses, künstliches Peptidsubstrat. Eine Interaktion mit Endotoxin führt zu einer proteolytischen Spaltung dieses Peptidsubstrats bei der p-Nitroanilin freigesetzt wird, welches gelb ist und bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch erfasst werden kann.

Zur Quantifizierung des Endotoxingehalt der Proben wurde die chromogene Endpunktmethode angewandt, bei der die freigegebene Menge an p-Nitroanilin nach einer festgelegten Inkubationszeit bestimmt wird. In einer Standardkurve wurde die gemessene optische Dichte der Proben gegen bekannte Standard-Endotoxin-Konzentrationen aufgetragen. So konnten die Endotoxinkonzentrationen der Proben bestimmt werden. Die untere Nachweisgrenze des verwendeten LAL-Tests (Coatest®, Chromogenix) lag bei ≤ 10 pg/ml.

2.6. Bronchiallavage

Die Bronchiallavage der Mäuse wurde in verschiedenen Zeitintervallen nach intratrachealer LPS-Gabe durchgeführt (siehe unter 2.7. Behandlungsprotokolle).

Für den Vorgang wurden die Mäuse der verschiedenen Behandlungsgruppen zunächst einer letalen Dosis Isofluran ausgesetzt, dann in Rückenlage fixiert. Die Vicrylnähte über der Trachea wurden wieder entfernt und die Trachea erneut freigelegt, diesmal über eine Länge von 10 mm. Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurde die Trachea ein bis zwei

Trachealspangen kaudal der vorangegangenen Punktion quer inzidiert. Eine auf 15 mm gekürzte 21 G Kanüle mit abgeschliffener Spitze wurde als Trachealkanüle eingebracht. Mit einem Vicrylfaden (4.0) wurden Kanüle und Trachea aneinander fixiert. Über die Trachealkanüle wurde eine sterile und gekühlte PBS/EDTA-Lösung (1 mM EDTA, pH-Wert 7,2) in Mengen von zunächst 200 µl dann 300 µl mit einer Omnifix-100-Spritze langsam in die Lunge instilliert, dann vorsichtig wieder aspiriert. Die auf diese Weise gewonnene Lavageflüssigkeit (insgesamt 6 ml pro Maus) wurde in jeweils zwei gekennzeichnete 10 ml Probenröhrchen auf Eis überführt, wobei ein Röhrchen mit den ersten 1,5 ml Lavageflüssigkeit und ein zweites Röhrchen mit weiteren 4,5 ml Lavageflüssigkeit befüllt wurde.

2.7. Behandlungsprotokolle

Tabelle 1: Behandlungsprotokoll der Versuchstiere von unterschiedlicher genetischer CCR2-Expression, die für den Alveolarraum (A), sowie die Zirkulation (Z) angegeben ist.

Versuchstiergruppe	CCR2-Expression	Intratracheal applizierte LPS-Dosis in µg	Zeitpunkt der BAL nach LPS-Gabe in h	Anzahl der Tiere pro LPS-Dosis & Zeitpunkt nach BAL
Wildtypmäuse	A: CCR2-positiv Z: CCR2-positiv	0,1; 1; 10; 20	0; 12; 24; 48; 72; 96; 120; 168	n = 9
CCR2-defiziente Mäuse	A: CCR2-negativ Z: CCR2-negativ	0,1; 1; 10; 20	0; 12; 24; 48; 72; 96; 120; 168	n = 5
Chimäre Wildtypmäuse	A: CCR2-positiv Z: CCR2-negativ	20	0; 24; 48; 72	n = 5
Chimäre CCR2-defiziente Mäuse	A: CCR2-negativ Z: CCR2-positiv	20	0; 24; 48; 72	n = 5

Da die CCR2-defizienten Mäuse selbst vermehrt wurden, standen sie nur begrenzt für die Experimente zur Verfügung. Darum wurde die Zahl der CCR2-defizienten Mäuse pro Versuch mit n = 5 geringer gewählt.

Tabelle 2: Behandlungsprotokoll der Wildtypmäuse, die eine CCR2-Funktionsblockade erfuhren. Monoklonale CCR2-Antikörper (CCR2 mAb) wurden systemisch (intraperitoneal) bzw. lokal (intratracheal) appliziert. Zum Vergleich wurde ein Kontrollantikörper verabreicht.

Versuchstiergruppe	1. Behandlung: intraperitoneal	2. Behandlung: intratracheal (im Abstand von 6 h zur 1. Behandlung)	Zeitpunkt der BAL nach 2. Behandlung in h	Anzahl der Tiere pro Zeitpunkt nach BAL
Wildtypmäuse	250-500 µg CCR2 mAb	20 µg LPS	0, 24, 48, 72	n = 6
Wildtypmäuse		100 µg CCR2 mAb und 20 µg LPS	0, 24, 48, 72	n = 5
Wildtypmäuse		100 µg Kontroll- antikörper und 20 µg LPS	0, 24, 48, 72	n = 5

2.8. Aufbereitung der Bronchiallavageflüssigkeit

2.8.1. Bestimmung der Zellzahl

Die Probenröhrchen mit der Lavageflüssigkeit wurden 10 min bei 4 °C und 1400 rpm auf Eis zentrifugiert. Vom Überstand über dem Zellpellet im 1,5 ml Röhrchen wurden zweimal 500 µl abgenommen und bei -80 °C für eine spätere Zytokinbestimmung mittels ELISA archiviert. Der Überstand in dem 4,5 ml Röhrchen wurde vorsichtig dekantiert. Die Pellets in beiden Röhrchen wurden vorsichtig gelöst und in 1 ml Mausmedium suspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. In 4 großen Eckquadraten wurden die Zellen ausgezählt, um dann die Zellzahl pro Großquadrat zu mitteln. Folgende Formel wurde zur Berechnung der Gesamtzellzahl in der Bronchiallavageflüssigkeit genutzt: Zellzahl eines Großquadrats x Verdünnungsfaktor (Volumen der Suspension in ml) x Korrekturfaktor (10^4).

2.8.2. Differenzierung und Quantifizierung der leukozytären Zellpopulationen

Um die einzelnen leukozytären Zellpopulationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit zu identifizieren und zu quantifizieren, wurden von jeder Bronchiallavage zwei Zytozentrifugenpräparate hergestellt. Jeweils 1×10^5 BAL-Zellen wurden in 100 μ l PBS mit Hilfe einer Zytocentrifuge (5 min bei 500 rpm) auf Objektträger gebracht. Diese konnten zunächst trocknen, dann wurden sie einer Pappenheim-Färbung unterzogen (zehnminütige Färbung in May-Grünwald [Eosin-Methylenblau]-Lösung und fünfminütige Färbung in Giemsa [Azur-Eosin-Methylenblau]-Lösung). Die erneut getrockneten Objektträger wurden dann unter dem Mikroskop zunächst bei 100facher, dann bei 400facher Vergrößerung begutachtet. Die verschiedenen Zellpopulationen wurden anhand von übergeordneten morphologischen Kriterien wie Zellgröße und Form des Zellkerns differenziert und mittels Multiplikation mit der Gesamtzellzahl quantifiziert.

2.8.3. Bestimmung der Zytokinspiegel

Die archivierten zellfreien Überstände der bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (2.8.1) wurden nun aufgetaut und auf die Zytokine TNF- α , MIP-2 und CCL2 und CCL12 untersucht. Dafür wurden im Handel erhältliche ELISA-Kits (Quantikine® M, R&D Systems) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Für den Maus-MIP-2-Immunoassay wurden die Vertiefungen der entsprechend beschichteten Mikrotiterplatten zunächst mit je 50 μ l Assay Diluent RD1W, einem Caseinpuffer, zur Absättigung unspezifischer Bindungen befüllt. Dann wurden 50 μ l der zu untersuchenden Probe, bzw. jeweils seriell 1:2 verdünntes rekombinantes Protein (Standard), bzw. unverdünntes rekombinantes Protein (Positivkontrolle) hinzugefügt. Danach wurden die Mikrotiterplatten 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, sodass das Protein MIP-2 an der Antikörperbeschichtung der Mikrotiterplatte binden konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten Waschkvorgänge mit Hilfe eines ELISA-Washers und Waschpuffer, um nichtgebundenes MIP-2-Protein zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden je 100 μ l Maus-MIP-2-Konjugat, einer Lösung von MIP-2-Antikörpern markiert mit dem Enzym HRP (horse radish peroxidase), in die Vertiefungen der Platte gegeben. Nach weiteren 2 h Inkubation wurden erneute Waschkvorgänge durchgeführt, mit denen nichtgebundener, überschüssiger Antikörper weggespült werden konnte. Für die anschließende Indikatorreaktion wurden 100 μ l Substratlösung mit gleichen Teilen

Farbreagens A (Wasserstoffperoxid) und Farbreagens B (Chromogen Tetramethylbenzidin) zur enzymatischen Umsetzung zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht wurde die Reaktion mittels Salzsäure unterbrochen. Innerhalb von 30 min wurde die optische Dichte der Reaktionsansätze mit einem ELISA-Plattenphotometer gemessen. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm. Die Wellenlängenkorrektur wurde auf 540 nm eingestellt. Anhand erstellter Standardkurven konnte aus den photometrischen Daten die MIP-2-Konzentration der Proben ermittelt werden. Nach dem gleichen Prinzip wurde in Immunoassays für die Zytokine TNF- α , CCL2 und CCL12 verfahren. Das jeweilige Protein wurde pro Versuchsansatz in Doppelbestimmung quantifiziert. Die untere Nachweisgrenze der ELISA-Kits (Quantikine® M) lag für MIP-2 bei < 1,5 pg/ml, für TNF- α bei < 5,1 pg/ml, sowie für CCL2 bei < 2 pg/ml und für CCL12 bei 1,07–2,10 pg/ml.

2.9. Anfertigung von histologischen Lungenschnittpräparaten

Jeweils drei Wildtyp- und CCR2-defiziente Mäuse wurden 48 h nach Behandlung mit 20 μ g LPS vor bzw. nach Durchführung der Bronchiallavage geopfert. Zügig aber vorsichtig wurde ihnen der Thorax mit einer feinen Schere geöffnet, so dass Herz und Lunge zusammen entnommen werden konnten. Danach erfolgte eine chemische Fixierung der Lunge. Hierfür wurde kalte PBS-gepufferte 4,5%ige Formaldehydlösung (pH 7,2) über die Trachea mit einem konstanten Druck von 20 cmH₂O instilliert. Bis zum nächsten Tag wurden die so präparierten Lungen bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Von den so behandelten Lungen wurden 5 μ m Mikroschnitte angefertigt. Diese wurden nach einer HE-Färbung bei 40facher Vergrößerung betrachtet und in Hinblick auf zelluläre Infiltrate ausgewertet. Gleiches geschah mit jeweils drei unbehandelten Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen.

2.10. Blutentnahme bei der Maus

Unbehandelte Wildtyp- und CCR2-defiziente Mäuse wurden mit einer Überdosis Isofluran getötet und in Rückenlage fixiert. Mit einer Mikropräparierschere wurde das Peritoneum freigelegt, dann die Bauchhöhle eröffnet. Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurde die Vena cava inferior aufgesucht und mit einer 23 G Kanüle punktiert. Pro Maus konnten etwa 0,8–1 ml Blut in eine Omnifix-100-Spritze (1 ml) aspiriert, dann in EDTA-Röhrchen

überführt werden. Dem antikoagulierten Blut wurde für eine Erythrozytenlyse 10 ml Ammoniumchloridlösung zugesetzt (Einwirkzeit 5 min bei Raumtemperatur). Im Rahmen der weiteren Aufbereitung wurde das Blut 9 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand über dem Zellpellet wurde verworfen, das Pellet selbst in 10 ml PBS resuspendiert. Dieser Arbeitsschritt wurde noch ein Mal wiederholt, wobei das Zellpellet schließlich in 500 µl PBS mit 10% FCS gelöst, die Suspension auf Eis inkubiert wurde.

2.11. Durchflusszytometrie

2.11.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Innerhalb der leukozytären Zellsuspension, die aus dem peripheren Blut von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen gewonnen wurde, sollte die Monozytenfraktion identifiziert und isoliert werden. Genutzt wurde dafür die Methode der Durchflusszytometrie. Im Durchflusszytometer bewirkt ein bestimmter Luftdruck, dass die zu untersuchende Zellsuspension in eine dünne Kapillare strömt, als sogenannter Probestrom. Dieser Probestrom wird durch eine größere Flüssigkeitssäule geleitet, die Hüllstrom genannt wird, und eine höhere Fließgeschwindigkeit aufweist als der Probestrom. Auf diese Weise wird eine Flussdynamik mit laminaren Strömungen aufgebaut. Damit wird im Rahmen einer hydrodynamischen Fokussierung erreicht, dass sich die Zellen der Probe perlschnurartig hintereinander aufreihen und längs ausrichten. In der Messkammer passiert jede Zelle einzeln einen Laserstrahl aus einer Lichtquelle. Dabei erzeugt die Zelle ein charakteristisches Streulicht in Vorwärts- (Forwardscatter, FSC) und Seitwärtsrichtung (Sidewardscatter, SSC). Anhand dieser Parameter können Aussagen über die Art der Zelle getroffen werden. Zur Klassifikation der Zelle kann darüber hinaus eine durchflusszytometrische Fluoreszenzfarbennmessung hinzugezogen werden. Einige Zellpopulationen weisen eine endogene Autofluoreszenz auf. Eine exogene Fluoreszenz kann durch Fluorochrom-Antikörpermarkierung zellspezifischer Antigenstrukturen herbeigeführt werden. Die Fluoreszenzlichtemissionen werden durch Filter auf verschiedenen Detektoren aufgetrennt. Differenziert wird der Fluoreszenz-1-Kanal (FL-1) für die Grünfluoreszenz bei 535 nm von dem Fluoreszenz-2-Kanal (FL-2) für die Rotfluoreszenz bei 575 nm. Als Detektoren fungieren Photomultiplier, die eingehende Lichtsignale verstärken und in elektronische Signale umwandeln. Die Quantifizierung und Analyse der Daten wird anhand von speziellen Softwareprogrammen durchgeführt. Zur Separation einer bestimmten Zellpopulation aus dem

Blut benötigt man ein Durchflusszytometer mit Zellsortiermodul. Beim Vorgang der Separation wird nach hydrodynamischer Fokussierung der Zellen und Passage des Laserkreuzungspunkts (laser intercept) die Flüssigkeit um die Zelle durch einen piezoelektrischen Wandler in Schwingungen versetzt. Infolgedessen geht die Flüssigkeit an einer bestimmten Stelle, Tropfenabrisspunkt (stream breakoff) genannt, in Tropfen über. Als Tropfenverzögerung (droplet delay) bezeichnet man die Zeit, die eine Zelle in der Flüssigkeit braucht, um vom Laserkreuzungspunkt zum Tropfenabrisspunkt zu gelangen. Sie ist abhängig von der Fließgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit und der eingestellten Schwingungsfrequenz des piezoelektrischen Wandlers. Erreicht nun die zu sortierende Zelle den Tropfenabrisspunkt, wird sie geladen, in einem elektrischen Feld zwischen zwei Deflexionsplatten abgelenkt und auf diese Weise separiert.

2.11.2. Separation muriner peripherer Blutmonozyten

Um eine exogene Fluoreszenz der Monozyten aus Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen herzustellen, wurde ein spezifisches Merkmal monozytärer Zellen genutzt: das Oberflächenantigen F4/80 [5, 38, 51]. Die vorbereiteten Leukozyten aus dem venösen Blut wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde mit 10 µl Fc-Block versehen, um einer unspezifischen Antikörperbindung an Fc-Rezeptoren vorzubeugen. Anschließend wurden jeweils 5–10 µl Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierte F4/80-Antikörper in die Vertiefungen gegeben. Die Leukozyten wurden mit diesem Antikörper über 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die antikörpermarkierten Zellen zwei Mal über 9 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in PBS mit 10 % FCS resuspendiert, die Suspension einer durchflusszytometrischen Analyse zugeführt.

Dafür wurde ein FACSVantage SE Durchflusszytometer mit einem Argon-Ionen-Laser (Anregungswellenlänge 488 nm) und einem DiVA Modul eingesetzt. Die Tröpfchenverzögerung wurde zwischen 15,2 und 15,7 eingestellt. Die Justierung der Tröpfchenverzögerung erfolgte mit Hilfe fluoreszierender Partikel (Calibrite beads), die solange auf Probe sortiert wurden, bis eine Separationsreinheit von > 99 % erreicht war. Vor der Separation der Monozyten wurde der Probenschlauch mit 0,1%iger Natriumhypochloridlösung desinfiziert und mit steriler 0,9%iger Natriumchloridlösung nachgespült. Die FITC-markierten Blutmonozyten wurden nach den Kriterien Vorwärtsstreulicht (FSC) und Grünfluoreszenz bei 535 nm ± 30 sortiert. Die Reinheit der separierten Monozyten wurde durch eine „Post-

sort“-Analyse und durch eine differenzialzytologische Auswertung Pappenheim-gefärbter Zellausstrichpräparate bestimmt. Erreicht wurde eine Reinheit von > 95 %. Die Vitalität der Monozyten wird durch den Separationsvorgang nicht beeinträchtigt, wie in vorangegangenen Untersuchungen anhand einer Propidium-Jodid-Färbung und anschließender FACS-Analyse festgestellt wurde [64].

2.12. In-vitro-Versuche

Die separierten Blutmonozyten aus Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen wurden in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 5 % FCS kulturiert. Wildtypmonozyten (1×10^5 Zellen/ml) wurden in An- oder Abwesenheit von rekombinantem, murinem CCL2-Protein (500 pg/ml) in Polystyren-Kulturplatten bei 37 °C über 24 h in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. CCR2-defiziente Monozyten (1×10^5 Zellen/ml) wurden in gleicher Weise ausschließlich in Anwesenheit von rekombinantem, murinem CCL2-Protein (500 pg/ml) inkubiert. Darüber hinaus wurde der funktionsblockierende CCR2-Antikörper MC21 (5 µg/ml) zusammen mit der definierten CCL2-Dosis einer weiteren Wildtypmonozytenkultur zugesetzt. Die Inkubation erfolgte in Polystyren-Kulturplatten über 24 h wie beschrieben. In einem weiteren Ansatz wurde Ammoniumchlorid (NH₄Cl) verwendet, eine schwache Base, die intrazellulär neutralisierend auf das saure Milieu in Lysosomen wirkt und damit die lysosomale Zersetzung von aufgenommenen Proteinen verhindert [86]. Wildtypmonozyten wurden über 30 min mit 20 mM Ammoniumchlorid präinkubiert, dann wurden sie mit rekombinantem CCL2 (500 pg/ml) in Kultur gebracht und die Inkubation wie beschrieben über weitere 24 h fortgesetzt.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden alle Zellkulturüberstände abpipettiert und zentrifugiert (2 min bei 15 000 rpm). Von den so erhaltenen zellfreien Überständen wurden jeweils 500 µl abgenommen und zum Zweck einer späteren Bestimmung des CCL2-Gehalts bei –80 °C archiviert. Um mögliche Störeffekte zu erfassen wurde auch getestet, ob das Kulturmedium (RPMI-1640-Medium mit 5 % FCS) selbst CCL2 enthält. Außerdem wurden Proben des Kulturmediums 24 h nach der Zugabe von murinem, rekombinantem CCL2 untersucht, um eine Spontandegradation des rekombinanten CCL2 im Medium auszuschließen. Die Quantifizierung der CCL2-Konzentration erfolgte mittels ELISA wie in Kapitel 2.8.3. beschrieben.

2.13. Statistik

Die erhobenen Daten aus den beschriebenen Versuchen werden im folgenden Ergebnisteil in Form von Mittelwerten \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test evaluiert. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Alveolärer Entzündungsverlauf nach intratrachealer LPS-Instillation bei Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen

3.1.1. Zytologische Befunde in der Bronchiallavage

Bei Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen wurde die zelluläre Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) nach intratrachealem LPS-Stimulus untersucht. Hierzu wurde in beiden Versuchstiergruppen für jede applizierte LPS-Dosis die Anzahl der alveolär rekrutierten neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS-Gabe bestimmt (Abb. 2).

Zunächst wurden die bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten von unbehandelten Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen analysiert. In beiden Versuchstiergruppen waren Alveolar-makrophagen die dominierende Zellart, der Neutrophilenanteil lag bei 1–2 % der BALF-Zellen. Bereits eine intratracheal verabreichte LPS-Dosis von 0,1 µg bewirkte sowohl bei Wildtyp- als auch bei CCR2-defizienten Mäusen nach 12, 24, und 48 h einen Anstieg der alveolären Neutrophilenzahl. Bei Steigerung der LPS-Dosis (1 µg und 10 µg) verstärkte sich dieser Neutrophilenanstieg und erreichte bei Einsatz von 20 µg LPS sein Maximum. Im weiteren zeitlichen Verlauf fielen die Neutrophilenzahlen in der BALF wieder ab, basale Level wurden nach 5–7 Tagen erreicht. Hinsichtlich der alveolären Rekrutierungskinetik von Neutrophilen nach LPS-Gabe fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen (Abb. 2, linke Spalte).

Die parallel untersuchten Monozytenzahlen in der BALF stiegen nach LPS-Gabe ebenfalls an, jedoch wesentlich stärker bei Wildtyp- als bei CCR2-defizienten Mäusen. Der deutlichste Unterschied zwischen den alveolären Monozytenzahlen von Wildtyp- gegenüber CCR2-defizienten Mäusen fand sich bei Einsatz von 10 und 20 µg LPS. Diese LPS-Dosen bewirkten bei Wildtypmäusen eine ausgeprägte alveoläre Monozytenakkumulation mit einem Maximum nach 48–72 h. CCR2-defiziente Mäuse zeigten demgegenüber sowohl nach Gabe von 10 als auch 20 µg LPS signifikant weniger rekrutierte Monozyten in der Bronchiallavageflüssigkeit (Abb. 2, rechte Spalte). Diese Befunde demonstrieren, dass die LPS-induzierte Monozytenrekrutierung in das alveoläre Kompartiment überwiegend durch CCR2 vermittelt wird.

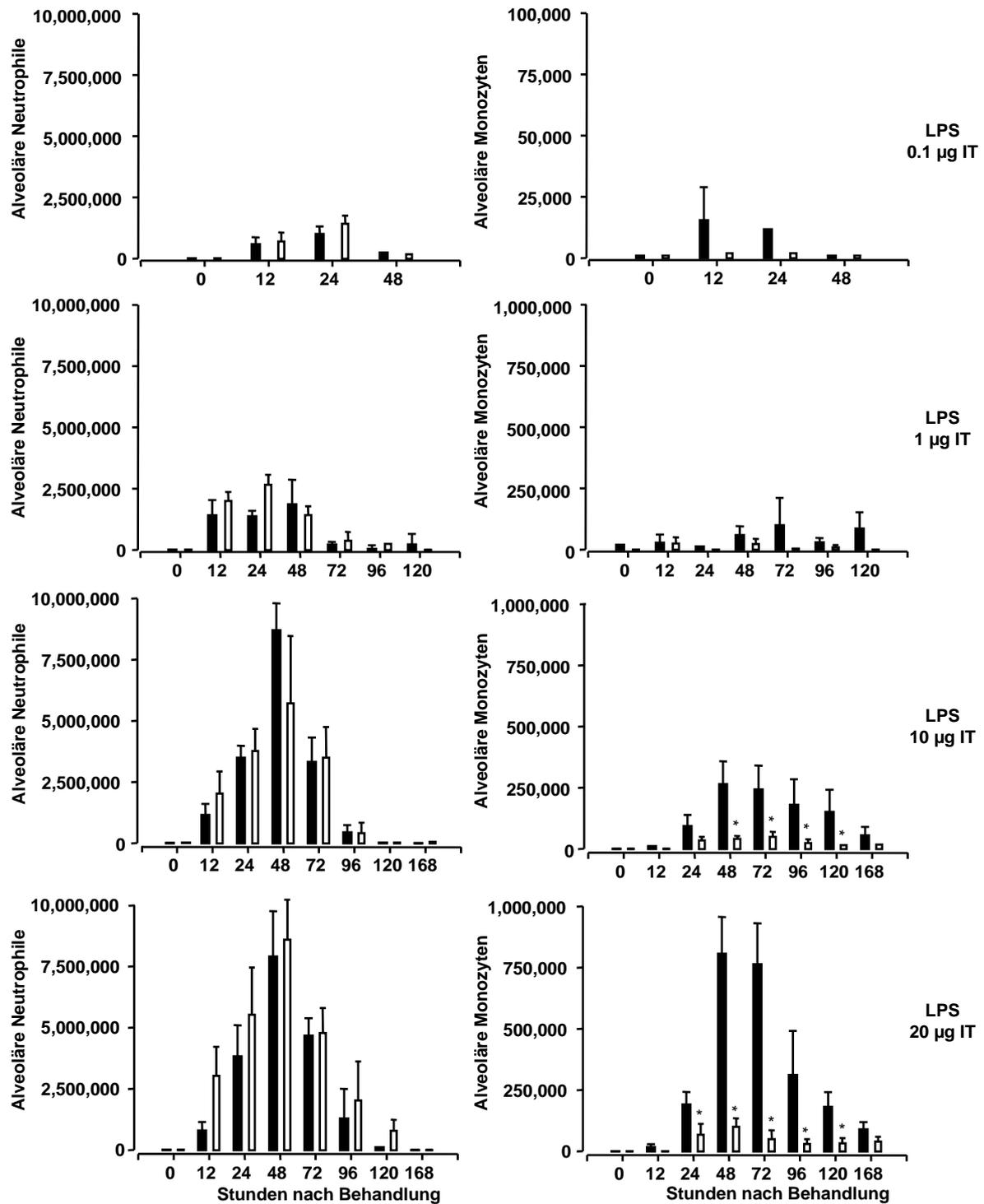


Abb. 2: Zeit- und dosisabhängige Effekte der intratrachealen (IT) LPS-Gabe auf die alveoläre Neutrophilen- und Monozytenrekrutierung bei Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen. Gruppen von Wildtyp- (ausgefüllte Balken) und CCR2-defizienten Mäusen (offene Balken) wurden über verschiedene Zeitintervalle mit steigenden LPS-Dosen behandelt. Anschließend wurden die Mäuse getötet und einer Bronchiallavage unterzogen. In den bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten wurde jeweils die absolute Zahl der Neutrophilen und Monozyten bestimmt wie in dem Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die Zellzahlen sind als Mittelwerte \pm SD ($n = 5-9$ Tiere je Behandlungsgruppe und Zeitpunkt) dargestellt. * $p < 0,01$ vs. Wildtypmäuse.

3.1.2. Histologische Befunde

Um die mittels Bronchiallavage (BAL) erhobenen Befunde zu überprüfen und festzustellen, ob alveoläre Zellen in den verschiedenen Versuchstiergruppen gleichermaßen mittels BAL ausgewaschen werden, wurden zusätzliche histologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden Lungensektionspräparate von jeweils 3 unbehandelten sowie von jeweils 3 LPS-behandelten Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen hergestellt und so präpariert, dass sie als Mikroschnitte von 5 µm Dicke vorlagen. Dabei wurde die Lungenentnahme und -präparation 48 h nach Behandlung mit 20 µg LPS vorgenommen. Die LPS-Dosis von 20 µg wurde gewählt, da sie die stärkste Leukozytenakkumulation in der BALF auslöste (Kapitel 3.1.1). Das Zeitintervall von 48 h wurde gewählt, da hier die bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten die meisten Entzündungszellen enthielten. Um zu prüfen, ob durch die Prozedur der Bronchiallavage alveolär rekrutierte Zellen bei Wildtyp und CCR2-defizienten Mäusen in gleichem Ausmaß ausgewaschen werden, wurden Wildtyp- und CCR2-defiziente Mäuse 48 h nach LPS-Gabe zusätzlich einer Bronchiallavage unterworfen, bevor ihre Lungen zur histologischen Aufarbeitung entnommen wurden. Die Lungenschnittpräparate der verschiedenen Versuchstiergruppen wurden nach einer Färbung mit Hämatoxylin-Eosin unter dem Hellfeldmikroskop (Leitz) bei 40facher Vergrößerung auf zelluläre Infiltrate untersucht und miteinander verglichen. In den Mikroschnitten unbehandelter Mäuse fand sich in beiden Versuchstiergruppen keine wesentliche Leukozytenakkumulation. Die Alveolen waren frei von Infiltraten, die Alveolarsepten stellten sich zart dar (Abb. 3 A und B). Die intratracheale Instillation von 20 µg LPS verursachte im Vergleich dazu sowohl bei Wildtyp- als auch bei CCR2-defizienten Mäusen im Zeitintervall von 48 h deutliche interstitielle und alveoläre Leukozyteninfiltrate mit begleitender Verdickung der Alveolarsepten (Abb. 3 C und D).

Die histologischen Lungenschnittpräparate der Mäuse, die 48 h nach LPS-Gabe einer Bronchiallavage unterzogen wurden, zeigten keine erkennbare selektive Monozytenretention, weder bei Wildtypmäusen (Abb. 3 E), noch bei CCR2-defizienten Mäusen (Abb. 3 F). Dies zeigt, dass sowohl bei Wildtyp- als auch bei CCR2-defizienten Mäusen nahezu alle alveolär rekrutierten Leukozyten durch die Bronchiallavage ausgewaschen wurden.

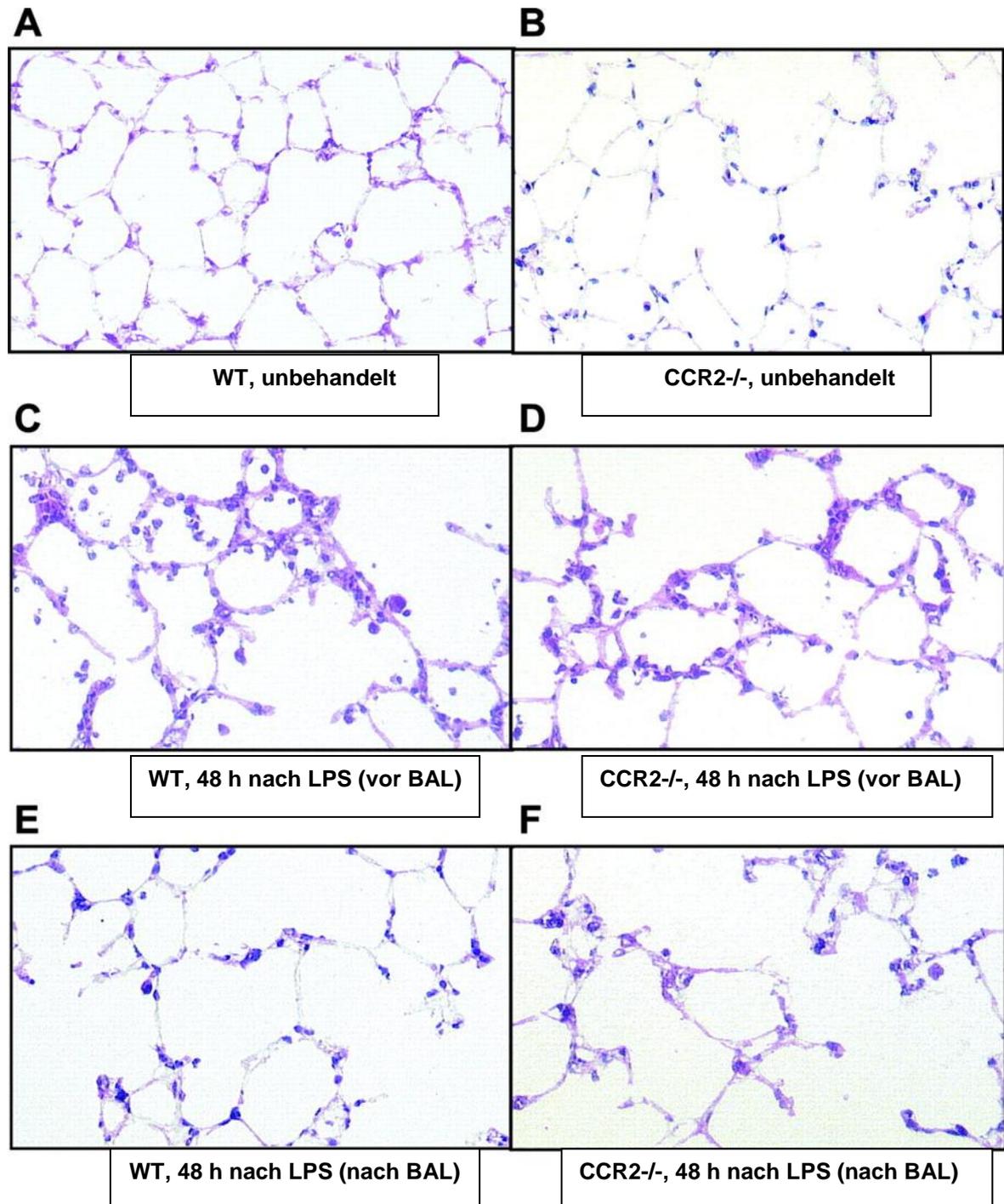


Abb. 3: Effekte der intratrachealen LPS-Applikation auf die Lungenhistologie bei Wildtyp (WT)- gegenüber CCR2-defizienten (CCR2^{-/-}) Mäusen. Gruppen von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen (n = 3 Tiere je Gruppe) blieben unbehandelt (A, B), erhielten 20 µg LPS intratracheal (48 h vor Lungenentnahme, C, D), oder wurden 48 h nach intratrachealer Gabe von 20 µg LPS zusätzlich einer Bronchiallavage (BAL) unterzogen (E, F), bevor ihre Lungen wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben für die histologische Untersuchung präpariert wurden. Repräsentative Histologien, 40fache Vergrößerung.

3.1.3. Zytokinprofil in der Bronchiallavage

Nach intratrachealer Behandlung mit steigenden LPS-Dosen über verschiedene Zeitintervalle wurden bronchoalveoläre Lavageflüssigkeiten von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen auf Zytokine untersucht. Dabei wurden in beiden Versuchstiergruppen die Konzentrationen der Zytokine TNF- α , MIP-2, CCL2 und CCL12 quantifiziert und verglichen. TNF- α und MIP-2 waren in den Bronchiallavageflüssigkeiten unbehandelter Wildtyp- und CCR2-defizienter Mäuse nur in geringer Konzentration nachweisbar. Mit zunehmender intratracheal applizierter LPS-Dosis stiegen die Konzentrationen beider Zytokine in den Bronchiallavageflüssigkeiten von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen gleichermaßen an. Im zeitlichen Abstand von 12 h nach Gabe von 20 μ g LPS wurde das Maximum dieser Zytokinspiegel in der BALF erreicht. Ein Rückgang auf basale TNF- α - und MIP-2-Werte wurde bei einer verabreichten LPS-Dosis von 10–20 μ g nach Ablauf von 72–96 h beobachtet, bei geringeren LPS-Dosen früher (Abb. 4, linke und mittlere Spalte). Die Analyse der Zytokinspiegel von MIP-2 und TNF- α in der BALF von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen zeigt, dass – abhängig von der applizierten LPS-Dosis – die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in den Alveolen beider Versuchstiergruppen in gleichem Ausmaß stattfindet.

Das Zytokin CCL2 war in den Bronchiallavageflüssigkeiten unbehandelter Wildtyp- und CCR2-defizienter Mäuse nur in geringer Konzentration nachweisbar. Nach einem inflammatorischen LPS-Stimulus von 0,1 μ g stieg der CCL2-Gehalt der BALF in beiden Versuchstiergruppen in gleichem Ausmaß an. Nach Behandlung mit höheren LPS-Dosen hingegen stieg der CCL2-Spiegel in der BALF bei CCR2-defizienten Mäusen zehnfach stärker an als bei Wildtypmäusen. Maximale CCL2-Werte wurden bei CCR2-defizienten Mäusen 48–72 h nach einer verabreichten Dosis von 20 μ g LPS beobachtet. Diese fielen in einem zeitlichen Abstand von 5 Tagen zur LPS-Behandlung wieder auf Ausgangswerte (Abb. 4, rechte Spalte). Die in den Lavageflüssigkeiten derselben Mäuse ebenfalls untersuchten CCL12-Konzentrationen zeigten im Vergleich zwischen Wildtyp- und CCR2-defizient keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3). Diese Befunde zeigen, dass LPS-behandelte CCR2-defiziente Mäuse, denen eine alveoläre Monozytenrekrutierung weitgehend fehlt, drastisch höhere CCL2-Spiegel in der BALF aufweisen als Wildtypmäuse, während sich die alveolären Konzentrationen der Zytokine MIP-2, TNF- α und CCL12 in beiden Versuchstiergruppen nicht signifikant unterscheiden.

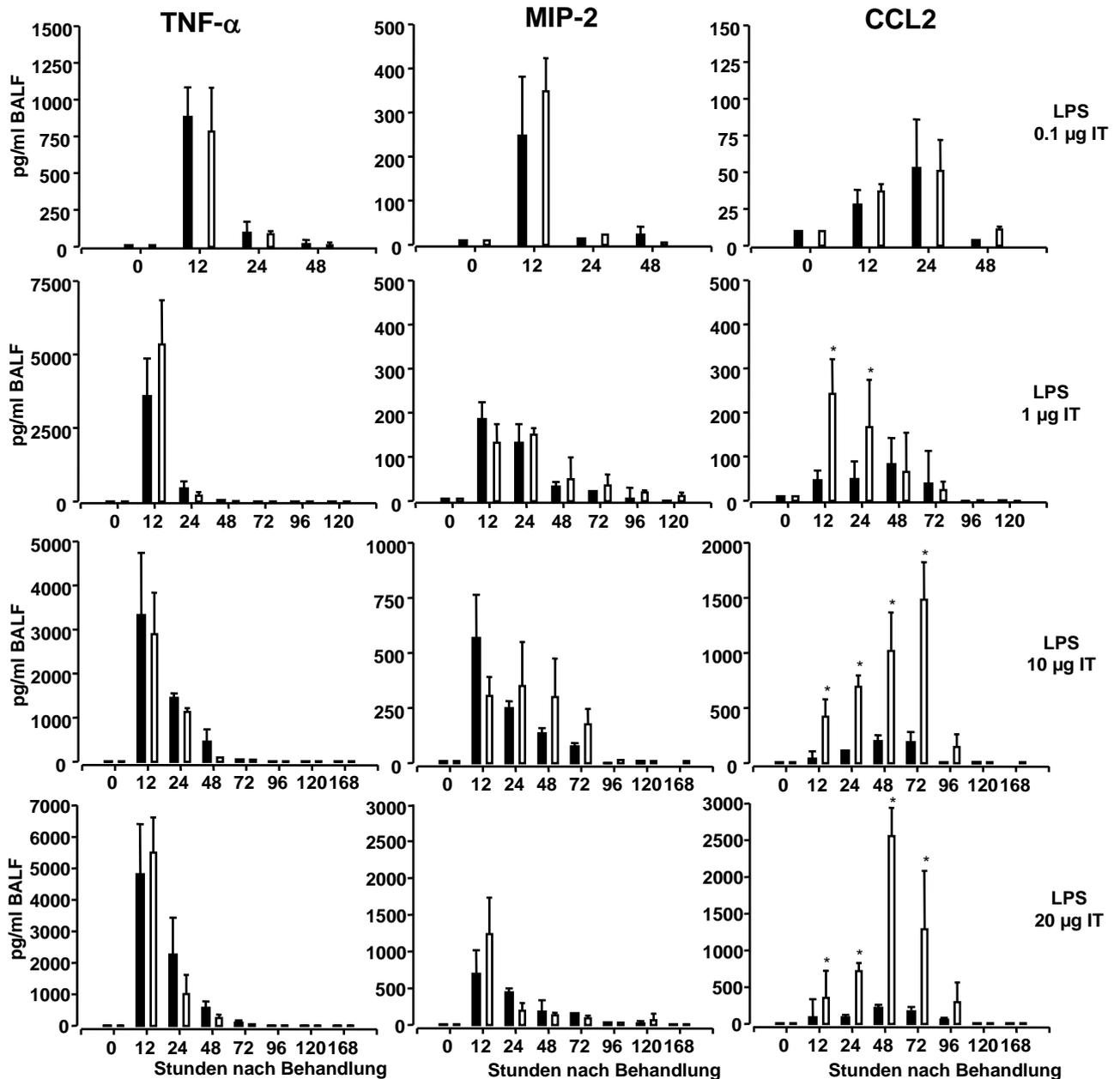


Abb. 4: Zeit- und dosisabhängige Effekte der intratrachealen (IT) Applikation von LPS auf die Konzentrationen von TNF- α , MIP-2 und CCL2 im Alveolarraum von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen. Gruppen von Wildtyp- (ausgefüllte Balken) und CCR2-defizienten Mäusen (offene Balken) wurden jeweils über verschiedene Zeitintervalle mit steigenden LPS-Dosen behandelt. Danach wurden die Mäuse getötet und einer Bronchiallavage unterzogen. Die Bronchiallavageflüssigkeiten (BALF) wurden mittels ELISA auf ihre TNF- α - (linke Spalte), MIP-2- (mittlere Spalte) und CCL2-Konzentration (rechte Spalte) untersucht. Die Konzentrationen der Zytokine sind als Mittelwerte \pm SD (n = 5–9 Tiere je Behandlungsgruppe und Zeitpunkt) dargestellt. * p < 0,01 vs. Wildtypmäuse.

Tabelle 3: CCL12-Konzentrationen in den Bronchiallavageflüssigkeiten von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen nach intratrachealer Gabe von 20 µg LPS

Versuchstiergruppe (mit jeweils n = 5 Tieren)	Zeitpunkt der BAL in h nach Gabe von 20 µg LPS	CCL12-Spiegel der BALF in pg/ml (Mittelwert ± SD)
Wildtypmäuse	24	5 ± 8
CCR2-defiziente Mäuse	24	19 ± 14
Wildtypmäuse	48	109 ± 42
CCR2-defiziente Mäuse	48	150 ± 30
Wildtypmäuse	72	114 ± 37
CCR2-defiziente Mäuse	72	148 ± 67

3.2. Einfluss von neutralisierenden CCR2-Antikörpern auf den alveolären Entzündungsverlauf nach LPS-Gabe bei Wildtypmäusen

3.2.1. Effekte einer systemischen CCR2-Antikörper-Gabe

Bisher wurde festgestellt, dass LPS-behandelte Wildtypmäuse sich hinsichtlich ihrer alveolären Monozytenzahl und CCL2-Konzentration signifikant von CCR2-defizienten Mäusen unterscheiden. Wildtypmäuse, bei denen nach LPS-Gabe (20 µg/Maus) eine ausgeprägte Rekrutierung von Monozyten in die Alveolen stattfand, zeigten zehnfach niedrigere CCL2-Konzentrationen in den bronchoalveolären Spülflüssigkeiten als CCR2-defiziente Mäuse.

Im Folgenden wurde analysiert, ob eine systemische (intraperitoneale) Vorbehandlung von Wildtypmäusen mit dem funktionsblockierenden CCR2-Antikörper MC21 die Monozytenzahl und CCL2-Konzentration der Bronchiallavageflüssigkeit nach intratrachealer LPS-Stimulation beeinflusst. Als Vergleichsgruppe dienten Wildtypmäuse, die intraperitoneal keinen funktionsblockierenden CCR2-Antikörper, aber intratracheal 20 µg LPS erhielten.

In diesem Experiment zeigten die systemisch mit CCR2-Antikörper vorbehandelten Mäuse eine deutlich geringere alveoläre Monozytenakkumulation (Abb. 5 A) ohne wesentlichen Unterschied in der Neutrophilenzahl der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (Abb. 5 B). Hinsichtlich der Zytokinspiegel in der Bronchiallavageflüssigkeit wiesen die antikörper-vorbehandelten Mäuse eine deutlich höhere CCL2-Konzentration auf als die der Kontrollgruppe mit Spitzenwerten 48 – 72 h nach LPS-Gabe (Abb. 5 C). Im Gegensatz zu CCL2

war die TNF- α -Konzentration in der BALF bei den mit CCR2-Antikörper systemisch vorbehandelten Wildtypmäusen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Abb. 5 D). Die Funktionsblockade mittels CCR2-Antikörpern in Wildtypmäusen führt demnach zu einem Phänotyp, der dem CCR2-defizienter Tiere vergleichbar ist, mit einer drastisch reduzierten alveolären Monozytenrekrutierung und einer deutlich erhöhten CCL2-Konzentration in der BALF.

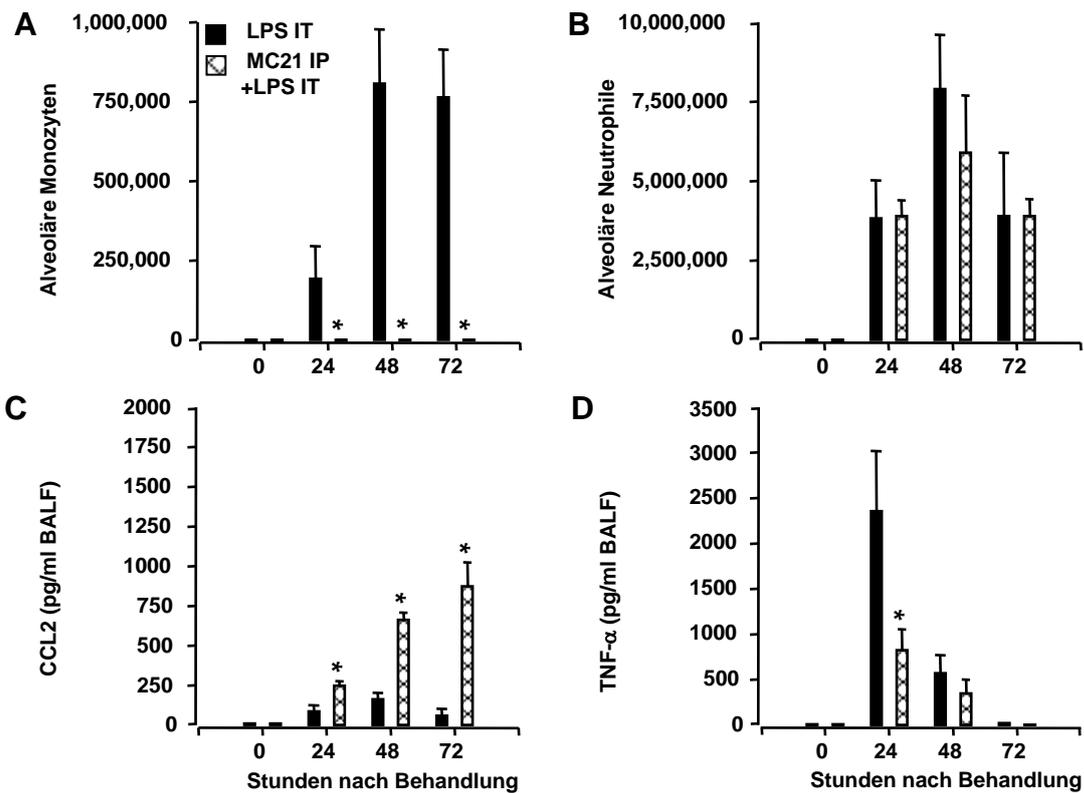


Abb. 5: Effekte der systemischen CCR2-Antikörper-MC21-Applikation auf die Monozyten- und Neutrophilenakkumulation sowie die CCL2- und TNF- α -Konzentration im Alveolarraum LPS-behandelter Wildtypmäuse. Gruppen von Wildtypmäusen erhielten über verschiedene Zeitintervalle entweder eine intratracheale (IT) LPS-Behandlung (20 μ g pro Maus, ausgefüllte Balken) oder zusätzlich – vor der intratrachealen LPS-Gabe – eine systemische (intraperitoneale, IP) Vorbehandlung mit dem CCR2-Antikörper MC21 (schraffierte Balken). Die Mäuse wurden zu den Zeitpunkten 24, 48, bzw. 72 h nach LPS-Gabe getötet und einer Bronchiallavage unterworfen. In den bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten wurden die absoluten Zellzahlen der Monozyten und Neutrophilen, sowie die Konzentrationen der Zytokine CCL2 und TNF- α bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD (n = 6 Tiere je Behandlungsgruppe und Zeitpunkt) dargestellt. * p < 0,01 vs. intratracheal LPS-behandelte Wildtypmäuse ohne MC21-Vorbehandlung (A, D). * p < 0,05 vs. intratracheal mit LPS-behandelte Wildtypmäuse ohne MC21-Vorbehandlung (C).

3.2.2. Effekte einer intratrachealen CCR2-Antikörper-Gabe

In diesem Versuchsansatz wurde überprüft, ob eine CCR2-Funktionsblockade im alveolären Kompartiment durch intratracheale CCR2-Antikörper-Gabe bei Wildtypmäusen Auswirkungen auf die CCL2-Konzentration in der Bronchiallavageflüssigkeit nach LPS-Gabe hat. Wildtypmäuse erhielten eine intratracheale Koapplikation des neutralisierenden CCR2-Antikörpers MC21 (100 µg pro Maus) und 20 µg LPS. Die Vergleichsgruppe erhielt LPS und einen Kontrollantikörper gleichen Isotyps.

Die Koapplikation von CCR2-Antikörper und LPS führte zu einem deutlichen Anstieg der intraalveolären CCL2-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe mit maximalen Werten zum Zeitpunkt 48–72 h nach Behandlung (Abb. 6 A). Die Monozytenzahlen in den bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den CCL2-Konzentrationen ergaben die intraalveolären TNF- α -Spiegel im Vergleich beider Behandlungsgruppen ähnliche Werte (Abb. 6 B).

Diese Befunde zeigen, dass die Funktionsblockade von CCR2 im alveolären Kompartiment zu höheren CCL2-Konzentrationen in der BALF nach LPS-Gabe führt. Dies spricht dafür, dass CCR2 direkt in die Regulation der alveolären CCL2-Spiegel involviert ist.

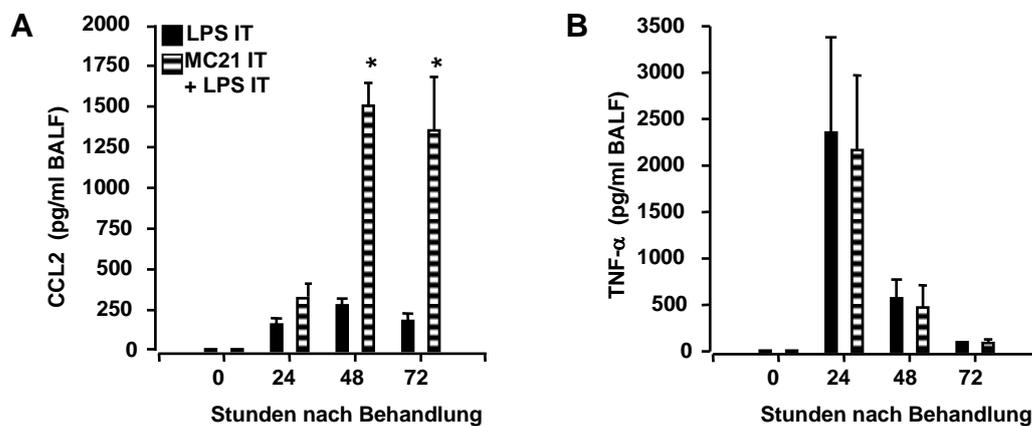


Abb. 6: Effekte der intratrachealen (IT) Applikation des neutralisierenden CCR2-Antikörpers MC21 auf die LPS-induzierte alveoläre CCL2- und TNF- α -Konzentrationen. Gruppen von Wildtypmäusen erhielten eine intratracheale Koapplikation von 20 µg LPS entweder mit dem CCR2-Antikörper MC21 (quergestreifte Balken) oder mit einem Kontrollantikörper (ausgefüllte Balken) über verschiedene Zeitintervalle. Anschließend wurden die Mäuse getötet und einer Bronchiallavage unterzogen. In der Bronchiallavageflüssigkeit wurden die Zytokinkonzentrationen mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD (n = 5 Tiere je Behandlungsgruppe und Zeitpunkt) dargestellt. * p < 0,01 vs. mit Kontrollantikörper und LPS behandelte Wildtypmäuse.

3.3. Alveolärer Entzündungsverlauf nach intratrachealer LPS-Instillation bei chimären Wildtyp- und chimären CCR2-defizienten Mäusen

Um die Rolle des Rezeptors CCR2 unter Berücksichtigung der exprimierenden Zellart (alveolär rekrutierte Monozyten vs. alveolär residente Zellen) zu differenzieren, wurden LPS-induzierte CCL2-Spiegel in der BALF von chimären Wildtyp- und chimären CCR2-defizienten Mäusen verglichen. Chimäre Wildtypmäuse sind Wildtypmäuse, die nach einer Ganzkörperbestrahlung mit dem Knochenmark CCR2-defizienter Mäuse rekonstituiert wurden. Bei diesen Tieren exprimieren im Blut zirkulierende Zellen kein CCR2, während residente Zellen des Alveolarraums CCR2-positiv sind. Chimäre CCR2-defiziente Mäuse sind myeloablativ bestrahlte CCR2-defiziente Tiere, denen Knochenmark von Wildtypmäusen transplantiert wurde. Vier Wochen nach Transplantation exprimieren zirkulierende Blutzellen CCR2, während die residenten Zellen des Alveolarraums bei diesen Tieren CCR2-negativ sind.

Für die chimären Wildtyp- und die chimären CCR2-defizienten Mäuse wurde eine alveoläre Monozytenrekrutierungskinetik mit CCL2-Chemokinprofil in der BALF nach LPS-Stimulus (20 µg pro Maus) erstellt. Die LPS-Dosis von 20 µg wurde gewählt, da sie in den vorangegangenen Untersuchungen die deutlichsten Effekte im Alveolarraum auslöste (Kapitel 3.1.1/3.1.3). Als Vergleichsgruppen dienten mit 20 µg LPS behandelte nichttransplantierte Wildtyp- und CCR2-defiziente Mäuse.

Nach inflammatorischem LPS-Stimulus fand sich in der BALF chimärer Wildtypmäuse eine signifikant niedrigere Monozytenakkumulation und eine signifikant höhere CCL2-Konzentration als in Wildtypmäusen (Abb. 7 A und B) und damit ein Phänotyp vergleichbar mit dem CCR2-defizienter Tiere.

Bei chimären CCR2-defizienten Mäusen führte die intratracheale Instillation von LPS zu einer signifikant höheren alveolären Monozytenrekrutierung (mit Maximalwerten zum Zeitpunkt 48 h nach LPS-Behandlung) und einer stark verminderten CCL2-Konzentration der Bronchiallavageflüssigkeit im Vergleich zu nichttransplantierten CCR2-defizienten Tieren (Abb. 7 C und D), ähnlich wie bei Wildtypmäusen.

Diese Daten demonstrieren, dass die Anwesenheit CCR2-positiver rekrutierter Monozyten im Alveolarraum mit niedrigen lokalen CCL2-Konzentrationen einhergeht. Das Vorhandensein CCR2-positiver alveolär residenter Zellen allein geht hingegen nicht mit geringen lokalen CCL2-Konzentrationen einher.

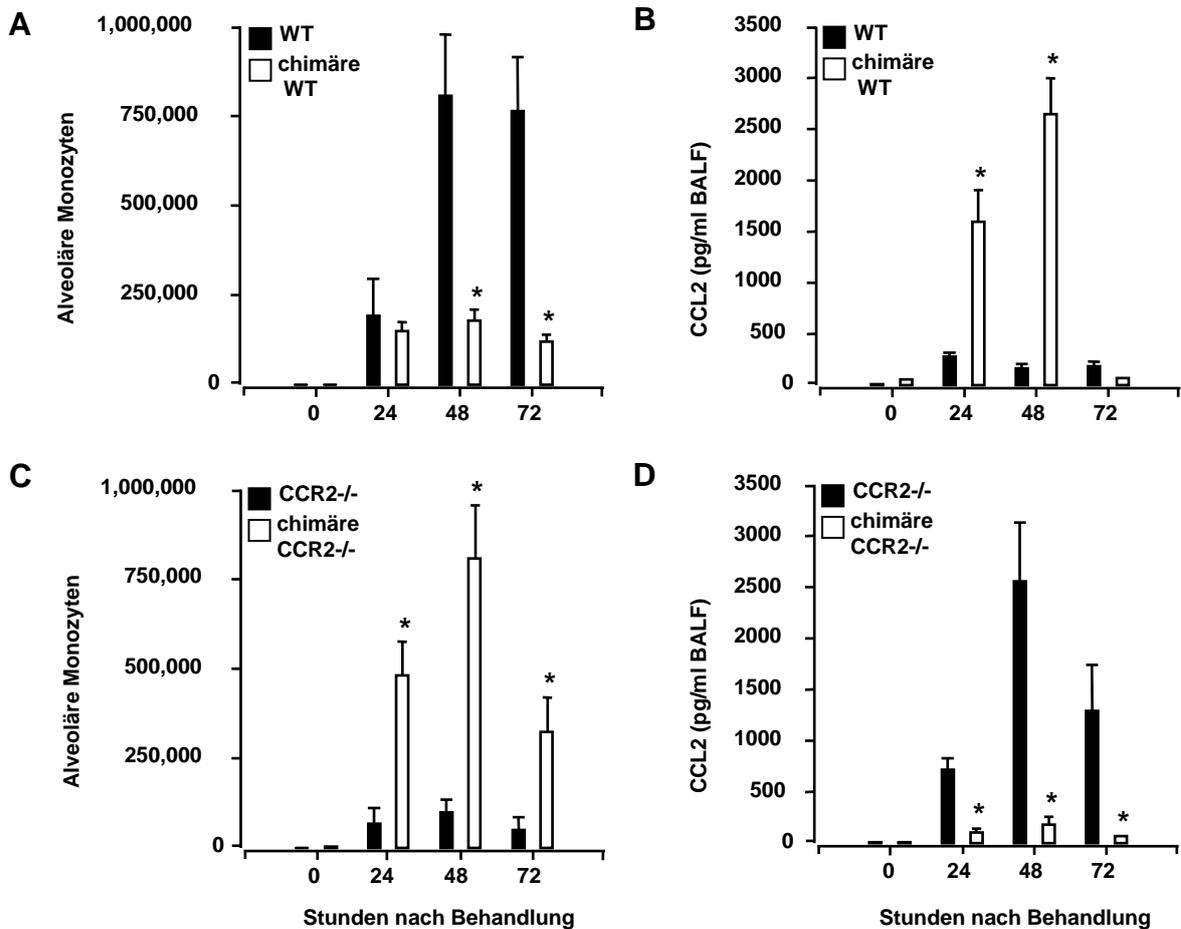


Abb. 7: Effekte des CCR2-Chimärismus in Wildtyp(WT)- und CCR2-defizienten (CCR2-/-) Mäusen auf die LPS-induzierte alveoläre Monozytenakkumulation und CCL2-Konzentration. Wildtypmäuse (ausgefüllte Balken in **A** und **B**) und chimäre Wildtypmäuse (offene Balken in **A** und **B**) bzw. CCR2-defiziente Mäuse (ausgefüllte Balken in **C** und **D**) und chimäre CCR2-defiziente Mäuse (offene Balken in **C** und **D**) wurden über verschiedene Zeitintervalle intratracheal mit LPS behandelt. Anschließend wurden die Mäuse getötet und einer Bronchiallavage unterzogen. In der Bronchiallavageflüssigkeit wurden die absolute Zahl der Monozyten und die Konzentration des Zytokins CCL2 bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n = 5-9$ Tiere je Behandlungsgruppe und Zeitpunkt). **A** und **B**: * $p < 0,05$ vs. Wildtypmäuse; **C** und **D**: * $p < 0,05$ vs. CCR2-defiziente Mäuse.

3.4. In-vitro-Untersuchungen

Ausgehend von der Beobachtung, dass Wildtyp- und chimäre CCR2-defiziente Mäuse hohe Monozytenzahlen bei reduzierten CCL2-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit aufwiesen, wurden zusätzliche Zellkulturexperimente durchgeführt, um zu prüfen, ob monozytär exprimiertes CCR2 einen CCL2-Verbrauch in vitro vermittelt. Für diese CCL2-Verbrauchsanalysen wurden hochreine periphere Blutmonozyten aus Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen verwendet.

Die CCL2-Konzentration im verwendeten Kulturmedium lag unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 8, Balken 1). In Kulturüberständen unstimulierter Wildtypmonozyten waren nach 24 h Inkubation nur geringe Mengen CCL2-Protein nachweisbar (Abb. 8, Balken 2). Auch wurde keine Spontandegradation von CCL2-Protein im Kulturmedium beobachtet. Die dem Medium zugesetzte CCL2-Menge (500 pg/ml) nahm in Abwesenheit von Monozyten im Zeitraum von 24 h nicht wesentlich ab (Abb. 8, Balken 3 und 4). Die Zugabe von Wildtypmonozyten (1×10^5 Zellen/ml) zu dem mit CCL2-Protein (500 pg/ml) angereicherten Kulturmedium führte nach 24 h zu einer signifikanten Abnahme des CCL2-Proteingehalts der Kulturüberstände (Abb. 8, Balken 5). Dieser CCL2-Abnahmeprozess blieb bei 30 minütiger Präinkubation der Zellen mit Ammoniumchlorid – einer lysosomotropen Substanz, die das Rezeptor-Recycling unterbindet – aus. So vorbehandelte Wildtypmonozyten konnten den CCL2-Proteingehalt einer Kultur im Zeitraum von 24 h nicht senken (Abb. 8, Balken 6). Auch nach Zugabe von funktionsblockierenden CCR2-Antikörpern zu Wildtypmonozytenkulturen zeigte sich nach 24 h keine Reduktion der CCL2-Konzentration (Abb. 8, Balken 7). Kulturen peripherer Blutmonozyten, die aus CCR2-defizienten Mäusen isoliert wurden, wiesen nach Ablauf von 24 h ebenfalls keine relevante CCL2-Konzentrationsabnahme auf (Abb. 8, Balken 8). Diese Befunde zeigen, dass Monozyten die CCL2-Konzentration in der Zellkultur reduzieren, wenn sie funktionsfähige CCR2-Rezeptoren tragen.

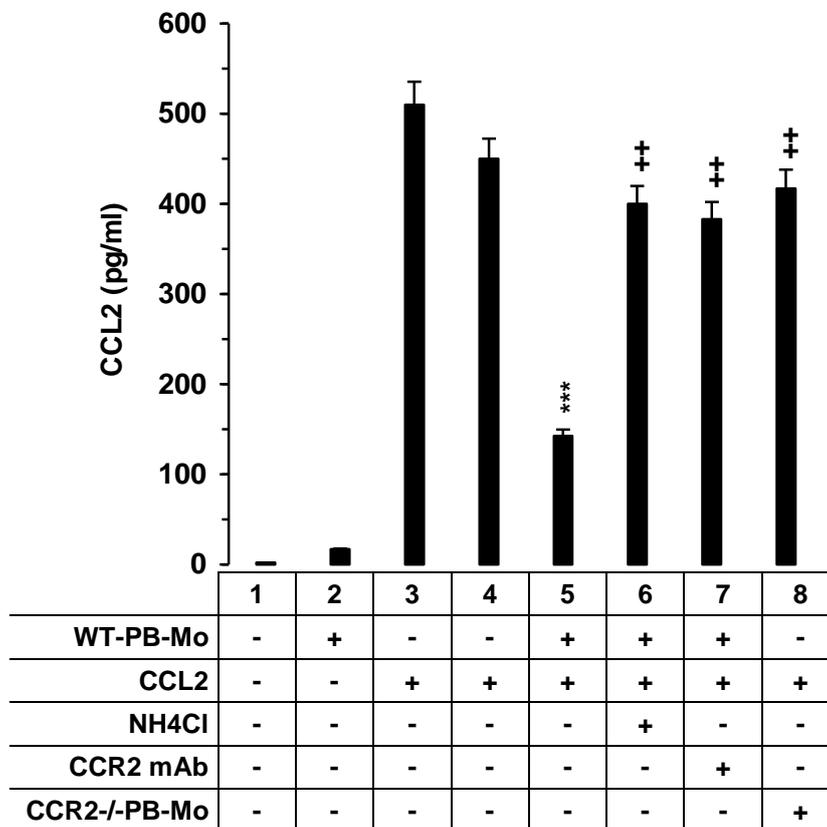


Abb. 8: *Monozyten verbrauchen CCL2-Protein in vitro.* Murine periphere Blutmonozyten (PB-Mo) wurden in An- oder Abwesenheit definierter CCL2-Konzentrationen in vitro inkubiert. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Kulturüberstände abgenommen und mittels ELISA auf ihren CCL2-Proteingehalt analysiert. Balken 1: CCL2-Gehalt des Kulturmediums allein; Balken 2: CCL2-Freisetzung unstimulierter Wildtypmonozyten nach 24 h in Kultur; Balken 3 und 4: CCL2-Spiegel im Kulturmedium zu den Zeitpunkten 0 und 24 h nach Zugabe von rekombinantem CCL2-Protein (500 pg/ml); Balken 5: CCL2-Konzentration in Wildtypmonozytenkulturen 24 h nach Zugabe von rekombinantem CCL2-Protein (500 pg/ml); Balken 6: CCL2-Konzentration nach 24 h in Kulturen von Wildtypmonozyten, die mit der lysosomotropen Substanz Ammoniumchlorid vorbehandelt waren (20 mM NH₄Cl, 30 min); Balken 7: CCL2-Konzentration nach 24 h in Wildtypmonozytenkulturen, die mit dem funktionsblockierenden CCR2-Antikörper MC21 (CCR2 mAb) versetzt wurden; Balken 8: CCL2-Konzentration in Kulturen peripherer Blutmonozyten CCR2-defizienter Mäuse nach 24 h. Die Daten sind als Mittelwerte ± SE dargestellt (n = 3 – 6 unabhängige Experimente). ***p < 0,0004 Balken 5 vs. Balken 4; ++ Balken 6 – 8 vs. Balken 5.

4. Diskussion

Die aktuelle Studie prüfte die Hypothese, dass alveolär rekrutierte Monozyten ihre weitere pulmonale Akkumulation in intratracheal mit LPS behandelten Mäusen limitieren, indem sie die CCL2-Konzentration im Alveolarraum durch CCR2-vermittelte Internalisation senken. Die Untersuchungen ergaben, dass Wildtypmäuse mit intakter CCR2-Expression auf einen intratrachealen LPS-Stimulus mit einer deutlichen alveolären Monozytenakkumulation reagieren. Gleichzeitig lag die CCL2-Chemokin-Konzentration in der Bronchiallavage bei diesen Tieren auf relativ niedrigem Niveau. Dagegen zeigten Mäuse mit fehlender CCR2-Expression auf peripheren Blutmonozyten, nämlich CCR2-defiziente und chimäre Wildtypmäuse (Wildtypmäuse, rekonstituiert mit dem Knochenmark CCR2-defizienter Mäuse), eine stark beeinträchtigte alveoläre Monozytenrekrutierung nach LPS-Gabe zusammen mit drastisch gesteigerten CCL2-Spiegeln in der BALF. Umgekehrt konnte die Rekonstitution myeloablativ bestrahlter CCR2-defizienter Mäuse mit dem hämatopoetischen System von Wildtypmäusen die LPS-induzierte alveoläre Monozytenakkumulation auf Wildtypwerte anheben. Diese gingen wiederum mit einem stark reduzierten CCL2-Spiegel in der BALF einher.

Darüber hinaus führte die Blockade der LPS-induzierten alveolären Monozytenrekrutierung in Wildtypmäusen durch den systemisch (intraperitoneal) verabreichten CCR2-Antikörper MC21 ebenfalls zu signifikant erhöhten alveolären CCL2-Konzentrationen. Die antikörpervermittelte CCR2-Funktionsblockade im Alveolarraum (durch intratracheale Gabe des Antikörpers) beeinträchtigte die LPS-induzierte alveoläre Monozytenakkumulation hingegen nicht, führte aber ebenfalls zu erhöhten CCL2-Konzentrationen im Alveolarraum.

In vitro verursachten aus Wildtypmäusen isolierte Monozyten, die in ein Kulturmedium mit einer definierten Menge CCL2-Protein gegeben wurden, einen deutlichen CCL2-Konzentrationsabfall in den Kulturüberständen. Bei Einsatz von Monozyten CCR2-defizienter Mäuse oder bei gleichzeitiger Zugabe von CCR2-Antikörpern oder bei Präinkubation von Wildtypmonozyten mit Ammoniumchlorid (zur Blockade des Rezeptor-Recyclings) blieb der CCL2-Konzentrationsabfall in den Kulturüberständen aus.

Zusammengenommen deuten die Daten auf eine Regulatorfunktion CCR2-positiver Monozyten für alveoläre CCL2-Konzentrationen während der pulmonalen Inflammation. Da die alveoläre CCL2-Chemokinproduktion die treibende Kraft für die Monozytenakkumulation in diesem Kompartiment darstellt, repräsentiert der CCR2-vermittelte Verbrauch von alveolärem CCL2 durch rekrutierte Monozyten einen potentiellen negativen Rückkopplungsmechanismus zur Verhinderung einer überschießenden alveolären Monozytenakkumulation.

Eine vorangegangene Arbeit zeigte, dass in der Entzündungssequenz früh alveolär rekrutierte neutrophile Granulozyten durch eine lokale Freisetzung von CCL2 zur nachfolgenden Monozytenrekrutierung beitragen [116]. Weitere Auslöser der alveolären Monozytenrekrutierung sind möglicherweise außerdem die residenten Alveolarepithelzellen, die nach inflammatorischem Stimulus CCL2 freisetzen [82]. Prinzipiell können beide Mechanismen ebenfalls die alveolären CCL2-Spiegel im Modell der LPS-induzierten Lungenentzündung beeinflussen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass eine Neutrophilenrekrutierung in der Tat der Monozytenakkumulation im Alveolarraum LPS-behandelter Wildtyp- und CCR2-defizienter Mäuse vorangeht. Da neutrophile Granulozyten jedoch bei Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen in gleichem Ausmaß rekrutiert werden, sind die drastischen Unterschiede zwischen den CCL2-Konzentrationen in der BALF von Wildtyp- gegenüber CCR2-defizienten Mäusen nicht durch Unterschiede in der alveolären Neutrophilenrekrutierung zwischen den beiden Versuchstiergruppen erklärbar. Bezüglich der CCL2-Sekretion von Typ-II-Alveolarepithelzellen wurde gezeigt, dass sie nach Isolation aus Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen *in vitro* nach LPS-Stimulus gleiche Mengen CCL2 freisetzen [M. Srivastava, unveröffentlicht]. Unterschiede in der CCL2-Freisetzungskapazität zwischen Wildtyp- und CCR2-defizienten Alveolarepithelzellen scheinen demnach nicht vorzuliegen.

Hinsichtlich eines CCL2-Verbrauchs im Alveolarraum von Wildtypmäusen ist eine Beteiligung alveolär rekrutierter Neutrophile unwahrscheinlich, da neutrophile Granulozyten keine CCR2-Expression aufweisen [65, 66]. *In-vitro*-Versuche mit Neutrophilen zeigten, dass sie die CCL2-Konzentration in Kultur nicht senken können [67].

Diese Befunde stützen die Hypothese, dass CCR2-positive Monozyten selbst an der Regulation lokaler CCL2-Spiegel während der pulmonalen Inflammation beteiligt sind. Tatsächlich bewirkte nicht nur die CCR2-Gendeletion sondern auch die CCR2-Funktionsblockade bei Wildtypmäusen (durch den systemisch applizierten CCR2-Antikörper MC21) eine Abschwächung der alveolären Monozyten- aber nicht Neutrophilenrekrutierung begleitet von einem Anstieg der alveolären CCL2-Konzentration. Dennoch lässt sich letztlich nicht ausschließen, dass andere Mechanismen an der Entfernung von CCL2 aus dem Alveolarraum beteiligt sind, beispielsweise eine proteolytische Degradation von CCL2 im Bronchialsekret.

Tylaska et al. [101] verglichen CCL2-Konzentrationen in Schwämmen, die mit allogenen Milzzellen präpariert und Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen subkutan implantiert wurden. Dabei blieben die CCL2-Konzentrationen CCR2-defizienter Mäuse über einen Zeitraum von 6 bis 8 Tagen nach Implantation erhöht. Im Vergleich mit der aktuellen Studie fällt auf, dass bei CCR2-defizienten Mäusen nach Implantation von Alloantigen die CCL2-Spiegel länger erhöht blieben (bis zu 8 Tage) als nach intratrachealer Applikation eines LPS-Stimulus (bis zu 3 Tage). Dieser Unterschied in der CCL2-Kinetik kann einerseits auf die verschiedenen Versuchsmodelle (chronische vs. akute Entzündung), andererseits auf die untersuchten Kompartimente (Implantat vs. Lunge) zurückzuführen sein.

Eine frühere Arbeit zeigte, dass Typ-II-Alveolarepithelzellen CCR2 mRNA exprimieren und in vitro auf CCL2-Stimulation reagieren, vermutlich via CCR2 [68]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch residente Alveolarmakrophagen eine gewisse CCR2-Expression aufweisen, wenn auch weniger ausgeprägt als ihre monozytären Vorläufer [63]. Tylaska et al. [101] demonstrierten, dass Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen in vitro CCL2 in Abhängigkeit von CCR2 internalisieren können. In der vorliegenden Studie erscheint jedoch eine wesentliche Beteiligung der residenten Alveolarmakrophagen am Aufbrauch von CCL2 im alveolären Kompartiment in Hinblick auf die an Chimärenmäusen beobachteten Effekte der intratrachealen LPS-Applikation unwahrscheinlich. Chimäre Wildtypmäuse, die phänotypisch CCR2-negative Blutmonozyten und CCR2-positive Alveolarmakrophagen besitzen [66], hatten hohe CCL2-Konzentrationen in der Bronchiallavageflüssigkeit nach LPS-Behandlung, ähnlich wie CCR2-defiziente Mäuse. Dies untermauert die Bedeutung rekrutierter mononukleärer Zellen für die Regulation alveolärer CCL2-Spiegel. Diese Auffassung wird zusätzlich durch die Befunde LPS-behandelter chimärer CCR2-defizienter Mäuse gestützt. Bei chimären CCR2-defizienten Mäusen, bei denen CCR2 auf zirkulierenden Monozyten regelrecht exprimiert ist, war die ausgeprägte alveoläre Monozyten-

akkumulation mit niedrigen alveolären CCL2-Spiegeln assoziiert. Vor diesem Hintergrund reflektiert der hohe CCL2-Spiegel in der BALF intratracheal LPS- plus MC21-behandelter Wildtypmäuse vorwiegend die Antikörperinterferenz mit der CCR2-Rezeptorfunktion neu rekrutierter Monozyten. Die antikörpervermittelte CCR2-Funktionsblockade alveolär residenter Zellen – Alveolarmakrophagen und Epithelzellen – scheint hingegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Der hohe alveoläre CCL2-Spiegel der intratracheal LPS- plus MC21-behandelten Wildtypmäuse ging wider Erwarten nicht mit einer Zunahme der alveolären Monozytenrekrutierung im Vergleich zur Wildtypkontrollgruppe einher. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass ein Teil der applizierten CCR2-Antikörper aus dem Alveolarraum in das Lungeninterstitium diffundiert, wo die Antikörper das für die Monozytenrekrutierung notwendige CCR2-Molekül inhibieren.

In vorangegangenen Studien wurde vielfach gezeigt, dass die entzündungsgetriebene Monozytenrekrutierung in die Lunge mit einer Zunahme der monozytären CD14-Expression einhergeht, zum Beispiel bei der experimentellen Alveolitis durch lokale LPS- oder LPS/CCL2-Exposition [59, 61], beim idiopathischen Pneumoniesyndrom [10] und beim ARDS [82]. Dabei zeigten CD14-positive Monozyten im Alveolarraum erhöhte TNF- α -mRNA-Spiegel und reagierten *in vitro* im Vergleich zu CD14-negativen Monozyten der Zirkulation mit einer stärkeren TNF- α -Freisetzung nach LPS-Stimulation [59]. Daher wird angenommen, dass Monozyten während ihrer Transmigration über die hochspezialisierte endoepitheliale Barriere Aktivierungsprozesse durchlaufen, unabhängig vom Auslöser der monozytären Transmigration. Passend dazu fanden sich in der aktuellen Studie reduzierte TNF- α -Spiegel in der Bronchiallavageflüssigkeit von Wildtypmäusen, deren LPS-induzierte alveoläre Monozytenrekrutierung durch Vorbehandlung mit dem CCR2-Antikörper MC21 blockiert wurde. Eine alternative Erklärung für die signifikant reduzierten TNF- α -Konzentrationen in der BALF von Wildtypmäusen, die vor intratrachealem LPS-Stimulus mit MC21 behandelt wurden, bietet eine Studie von Robinson et al. [76]. Sie zeigten, dass CCL2 *in vitro* eine TNF- α -Freisetzung aus Monozyten/Makrophagen bewirkt. Eine durch CCL2 ausgelöste TNF- α -Freisetzung aus Monozyten würde nach Blockade der CCR2-bedingten Monozytenrekrutierung mittels MC21 ausbleiben. Allerdings sprechen zwei Aspekte gegen die Wirksamkeit dieses Mechanismus im aktuellen Versuchsmodell *in vivo*. Erstens zeigten LPS-behandelte Wildtypmäuse nach Blockade der CCR2-Rezeptorfunktion rekrutierter Monozyten durch intratracheale MC21-Applikation stark erhöhte CCL2-Spiegel ohne einen bemerkenswerten Abfall der TNF- α -Konzentrationen in der BALF im Ver-

gleich zu LPS-behandelten Wildtypkontrollmäusen. Dies lässt annehmen, dass alveolär rekrutierte Monozyten nicht in Abhängigkeit von der CCR2/CCL2-Achse zur intraalveolären TNF- α -Freisetzung beitragen, sondern möglicherweise über andere Signalpfade, zum Beispiel über CD14. Zweitens wiesen CCR2-defiziente Mäuse, die nicht auf CCL2 reagieren können, nach LPS-Behandlung ähnliche TNF- α -Werte auf wie Wildtypmäuse nach LPS. Auch dies weist darauf hin, dass die CCR2/CCL2-Achse eine untergeordnete Rolle für die lokale TNF- α -Freisetzung im beschriebenen Mausmodell spielt.

Nach den Daten der aktuellen Studie ist die Reduktion alveolärer CCL2-Konzentrationen durch CCR2-tragende Monozyten ein möglicher Mechanismus, der das reziproke Verhältnis von Monozytenrekrutierungsrate und CCL2-Konzentration in der Bronchiallavage erklärt. Jedoch lässt sich nicht ausschließen, dass Monozyten regulierend über einen von der CCR2/CCL2-Achse gebahnten zellulären Signalpfad in die CCL2-Produktion durch andere alveoläre Zellpopulationen (z.B. Epithelzellen) eingreifen. Das Konzept des CCL2-Verbrauchs durch CCR2-positive Monozyten wird durch die In-vitro-Untersuchungen der aktuellen Studie weiter gestützt. Ein deutlicher CCL2-Konzentrationsabfall fand sich in Kulturen von Wildtypmonozyten, nicht hingegen in Kulturen von Wildtypmonozyten, deren CCR2-Rezeptorfunktion blockiert wurde (durch den CCR2-Antikörper MC21 oder durch Ammoniumchlorid). Auch in den Kulturen CCR2-defizienter Monozyten blieb ein CCL2-Konzentrationsabfall aus. Passend zu diesen Befunden über die Rolle von Monozyten beim CC-Chemokinverbrauch zeigte eine frühere Studie [120], dass die durch G-CSF gesteigerte Neutrophilenrekrutierung in entzündete Rattenlungen mit einer Reduktion der CXC-Chemokine MIP-2 und CINC (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in der BALF einhergeht. Auch hierbei ließ sich zeigen, dass rekrutierte neutrophile Granulozyten die löslichen CXC-Chemokine im Alveolarraum verbrauchen und damit zur Reduktion lokaler Chemokingradienten im Alveolarraum beitragen [120].

Neben der Reduktion von Chemokinkonzentrationen durch Chemokinrezeptoren können umgekehrt auch lokale Chemokinspiegel den Expressionsgrad ihrer Rezeptoren steuern [55, 86, 110], was das komplexe regulatorische Zusammenspiel von Rezeptoren und Liganden widerspiegelt. Darüber hinaus gibt es noch andere Parameter, die am Entzündungsort auf die Expressionsdichte von Chemokinrezeptoren einwirken, zum Beispiel Pathogen-assoziierte Mustermoleküle selbst [92] und leukozytäre Differenzierungsprozesse wie sie während der Leukozytenmigration in entzündetes Gewebe stattfinden. Letzteres wurde bereits anhand des CCR2-Expressionsprofils von Monozyten gegenüber Alveolarmakrophagen demonstriert [63].

Zusammengenommen präsentiert die vorliegende Arbeit Daten, die einen Feedback-Mechanismus zur Steuerung von Intensität und Dauer der alveolären Monozytenakkumulation während der akuten Lungenentzündung stützen. Die CCR2-Expression zirkulierender Blutmonozyten ist Voraussetzung für eine dem Entzündungsreiz entsprechend ausgeprägte Monozytenrekrutierung in den Alveolarraum LPS-behandelter Wildtypmäuse, die durch alveolär freigesetztes CCL2 induziert wird. Die rekrutierten CCR2-positiven Monozyten im Alveolarraum reduzieren den alveolären CCL2-Spiegel durch Internalisation und limitieren damit die weitere alveoläre Monozytenakkumulation. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus kann möglicherweise eine überschießende alveoläre Monozytenakkumulation verhindern und stellt damit ein antiinflammatorisches Signal im Rahmen pulmonaler Entzündungsprozesse dar.

4.1. Übertragbarkeit der Befunde auf andere Spezies

Ein Vergleich der tierexperimentellen Daten mit Befunden, die zuvor am Menschen bzw. an humanen Zellen oder Genmaterial erhoben wurden, zeigt folgende Gemeinsamkeiten:

1. Murine und humane periphere Blutmonozyten exprimieren den Rezeptor CCR2 [56].
2. CCR2 ist ein hochaffiner Rezeptor für den Liganden CCL2 bei Mäusen [11] und bei Menschen [17]
3. CCL2 löst in beiden Spezies eine Monozytenchemotaxis aus [1, 52, 58, 59, 66, 72, 80, 102, 119].
4. Im Rahmen pulmonaler Entzündungsvorgänge finden sowohl bei Mäusen [10] als auch bei Menschen [82] eine CCL2-Sekretion und eine Monozytenrekrutierung in die Alveolen statt.

Angesichts dieser Datenlage erscheint eine Wirksamkeit des am Mausmodell beschriebenen Rückkopplungseffekts von bereits rekrutierten Monozyten auf ihre weitere Akkumulation im Alveolarraum während pulmonaler Entzündungsprozesse auch am Menschen zumindest möglich. Schließlich wurde entdeckt, dass auch humane Monozyten zum CCL2-Verbrauch in Kultur befähigt sind [67].

Zu beachten ist, dass der humane Rezeptor CCR2 im Gegensatz zum murinen in zwei Isoformen erscheint, CCR2A und CCR2B, die beide mit dem Agonisten CCL2 interagieren [17, 114]. Sanders et al. [87] stellten in vitro funktionelle Unterschiede zwischen

diesen Isoformen in transfizierten Jurkat-T-Zellen fest: CCL2 löst in Interaktion mit beiden CCR2-Varianten eine zelluläre Chemotaxis aus, die auf verschiedene Weise initiiert wird. Bei der Erforschung von idiopathischen inflammatorischen Myopathien [6] und der rheumatoiden Arthritis [19] wurde entdeckt, dass im Rahmen dieser Erkrankungen die Variante CCR2A verstärkt exprimiert wird.

Lundien et al. [55] untersuchten die andere Rezeptorvariante, CCR2B, die in vitro durch LPS und IL-2 in Bronchialepithelzellen induzierbar ist. Sie fanden heraus, dass CCL2 in CCR2B-tragenden Bronchialepithelzellen eine Zellproliferation und Haptotaxis auslöst. Als Resultat beschrieben sie die Heilung einer beschädigten Bronchialepithelzellschicht.

Der Rezeptor CCR2 der Maus wurde erstmals 1996 geklont, wobei eine Ähnlichkeit zu dem humanen Rezeptor CCR2B festgestellt wurde [11, 48]. CCR2B dominiert auf der Zelloberfläche von humanen Monozyten [74, 114].

Da in der aktuellen Studie das Hauptaugenmerk auf den Monozyten liegt, besitzt das beschriebene Mausmodell trotz fehlender CCR2-Isoformen wenigstens eine gewisse Vergleichbarkeit zum Menschen. Um genauere Informationen darüber zu bekommen, welche Rolle den CCR2-Varianten im Alveolarraum insbesondere in Hinblick auf die Regulation von CCL2-Konzentrationen zukommt, bedarf es weiterer Studien. Unter besonderer Berücksichtigung der Variante CCR2B könnten im tierexperimentellen Modell zum Beispiel sogenannte Knock-in-Mäuse eingesetzt werden, bei denen das murine CCR2-Gen gezielt durch das humane CCR2B-Gen ersetzt wurde [75].

4.2. Klinische Relevanz

Hinweise für die klinische Bedeutung der Monozytenakkumulation und der CCL2-Konzentration im Alveolarraum fanden Rosseau et al. [82] in einer Studie an ARDS-Patienten. Bei diesen Patienten korrelierten der CCL2-Spiegel und die Akkumulation von Monozyten bzw. unreifen Alveolarmakrophagen in der Bronchiallavageflüssigkeit in hochsignifikanter Weise mit der Schwere des Atemversagens. Die Überlebensrate von ARDS-Patienten, die anhaltend hohe CCL2-Konzentrationen und Monozytenzahlen in den bronchoalveolären Spülflüssigkeiten aufwiesen, war signifikant reduziert.

Entsprechend könnten ARDS-Patienten von einer gezielten therapeutischen Intervention zur Reduktion der überschießenden alveolären Monozytenrekrutierung möglicherweise profitieren. Hierbei müssen allerdings die Monozyten/Makrophagen-abhängigen Funktionen in der Erregerabwehr und Gewebereparatur erhalten bleiben. Mit den am Mausmodell

in vivo und den an murinen Blutmonozyten in vitro gewonnenen Ergebnissen erweitert die vorliegende Arbeit das aktuelle Wissen zum Thema der alveolären Monozytenrekrutierung bei pulmonalen Entzündungsprozessen. Ob und wie die alveoläre Monozytenakkumulation bei Patienten mit schweren entzündlichen Lungenerkrankungen selektiv moduliert werden kann, müssen weitere Forschungen klären.

5. Zusammenfassung

Für die entzündungsgetriebene Monozytenrekrutierung ins Gewebe besitzen das CC-Chemokin CCL2 und sein Rezeptor CCR2 eine Schlüsselfunktion. CCR2-tragende Monozyten folgen bei pulmonalen Entzündungsprozessen einem CCL2-Gradienten in die Alveolen. Demgegenüber sind die Faktoren für die Regulierung von Dauer und Intensität der alveolären Monozytenrekrutierung weitgehend unbekannt.

Die aktuelle Studie untersuchte die alveoläre Monozytenrekrutierung und das intra-alveoläre CCL2-Konzentrationsprofil im Mausmodell der akuten pulmonalen Inflammation. Ein inflammatorischer Stimulus mit *E. coli* Lipopolysaccharid (LPS) wurde Mäusen von unterschiedlicher CCR2-Genexpression (Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäuse) intratracheal verabreicht. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden die Mäuse getötet und bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) gewonnen.

Wildtypmäuse zeigten eine dosis- und zeitabhängige Steigerung der alveolären Monozytenakkumulation im Verlauf der LPS-induzierten Alveolitis. Die parallel untersuchten CCL2-Spiegel der BALF blieben hingegen auf einem mittleren Niveau konstant. Bei in gleicher Weise behandelten CCR2-defizienten Mäusen verhielten sich die untersuchten Parameter umgekehrt. Eine fehlende Steigerung der alveolären Monozytenzahl ging mit einer signifikanten dosis- und zeitabhängigen Zunahme der CCL2-Konzentration in der BALF einher.

Um die Rolle einer Blockade der Rezeptorfunktion von CCR2 in verschiedenen Kompartimenten zu analysieren, wurde Wildtypmäusen neben LPS der funktionsblockierende CCR2-Antikörper MC21 entweder systemisch (intraperitoneal) oder intratracheal verabreicht. Wildtypmäuse, die eine systemische Vorbehandlung mit dem CCR2-Antikörper MC21 erhielten, zeigten nach intratrachealem LPS-Stimulus wie CCR2-defiziente Mäuse einen fehlenden Monozytenanstieg bei hohen CCL2-Spiegeln in der BALF. Eine selektive CCR2-Funktionsblockade im Alveolarraum durch intratracheale Instillation des Antikörpers (entsprechend einer CCR2-Blockade alveolär residenter und rekrutierter Zellen), führte zu keiner Beeinträchtigung der alveolären Monozytenrekrutierung jedoch zu deutlich erhöhten CCL2-Spiegeln im Alveolarraum im Vergleich zur Kontrolle.

Diese Daten weisen darauf hin, dass der Rezeptor CCR2 im Rahmen der LPS-vermittelten pulmonalen Inflammation nicht nur für die beobachtete Monozytenchemotaxis in die Alveolen von Bedeutung ist, sondern auch maßgeblich an der Reduktion von CCL2-Konzentrationen im Alveolarraum beteiligt ist. Um herauszufinden, welche CCR2-exprimierende

Zellart diese Reduktion vermittelt, wurden Wildtyp- und CCR2-defiziente Mäuse einer reziproken Knochenmarkstransplantation unterzogen und in das Versuchsmodell eingesetzt. Chimäre CCR2-defiziente Mäuse (Zellen des Alveolarraums CCR2-negativ, zirkulierende Monozyten CCR2-positiv) demonstrierten nach LPS-Behandlung einen drastischen Anstieg der alveolären Monozytenzahl bei geringen CCL2-Spiegeln in der BALF ähnlich wie Wildtypmäuse. Bei chimären Wildtypmäusen (Zellen des Alveolarraums CCR2-positiv, zirkulierende Monozyten CCR2-negativ) war die alveoläre Monozytenakkumulation deutlich reduziert bei stark erhöhten alveolären CCL2-Spiegeln wie in CCR2-defizienten Mäusen. Folglich konnte die Funktion der Minderung intraalveolärer CCL2-Konzentrationen den CCR2-exprimierenden Blutmonozyten zugeordnet werden, die während der Entzündung in die Alveolen rekrutiert werden.

In zusätzlich durchgeführten In-vitro-Versuchen gelang der Nachweis, dass aus Wildtypmäusen isolierte periphere Blutmonozyten in Abhängigkeit von funktionsfähigen CCR2-Rezeptoren rekombinantes CCL2-Protein in Kultur verbrauchen können. Demgegenüber waren Monozyten aus CCR2-defizienten Mäusen hierzu nicht in der Lage.

Insgesamt sprechen die in vivo und in vitro erhobenen Daten für folgenden Feedback-Mechanismus zur Regulation von Dauer und Intensität der entzündungsgetriebenen alveolären Monozytenrekrutierung: CCR2-positive Blutmonozyten werden bei der LPS-induzierten Entzündungssequenz entlang eines CCL2-Chemokin-Gradienten in die Alveolen rekrutiert, wo sie den lokalen CCL2-Spiegel durch Verbrauch reduzieren und damit ihre weitere alveoläre Akkumulation limitieren.

6. Abstract

The CC chemokine ligand-2 (CCL2) and its receptor CCR2 are essential for monocyte trafficking under inflammatory conditions. However, the mechanisms that determine intensity and duration of alveolar monocyte accumulation in response to CCL2 gradients in inflamed lungs have not been resolved. To determine the potential role of CCR2-expressing monocytes in regulating alveolar CCL2 levels, we compared leukocyte recruitment kinetics and alveolar CCL2 levels in wild-type and CCR2-deficient mice in response to intratracheal LPS challenges. In wild-type mice LPS elicited a dose- and time-dependent alveolar monocyte accumulation accompanied by low CCL2 levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). In contrast, LPS treated CCR2-deficient mice lacked alveolar monocyte accumulation, which was accompanied by relatively high CCL2 levels in BALF. Similarly, wild-type mice that were treated systemically with the blocking anti-CCR2 antibody MC21 completely lacked LPS-induced alveolar monocyte trafficking that was associated with high CCL2 levels in BALF. Intratracheal application of anti-CCR2 antibody MC21 to locally block CCR2 on both resident and recruited cells did not affect LPS-induced alveolar monocyte trafficking but led to significantly increased BALF CCL2 levels. Reciprocally bone marrow-transplanted, LPS-treated wild-type and CCR2-deficient mice showed a strict inverse relationship between alveolar monocyte recruitment and BALF CCL2 levels. In addition, freshly isolated mouse monocytes were capable of integrating CCL2 *in vitro*. LPS-induced alveolar monocyte accumulation is accompanied by monocytic CCR2-dependent consumption of CCL2 levels in the lung. This feedback loop may limit the intensity of monocyte recruitment to inflamed lungs and play a role in the maintenance of homeostasis.

7. Literaturverzeichnis

1. **Ajuebor MN, Flower RJ, Hannon R, Christie M, Bowers K, Verity A, and Perretti M.** Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in zymosan peritonitis model. *J Leukoc Biol* 63: 108–116, 1998
2. **Bacon K, Bagglioni M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Matsushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K. (IUIS/WHO Nomenclature Committee, Subcommittee on Chemokine Nomenclature).** Chemokine/Chemokine Receptor Nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 22: 1067–1068, 2002
3. **Bagglioni M and Dahinden CA.** CC-chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today* 15: 127–133, 1994
4. **Bagglioni M, Dewald B, and Moser B.** Human chemokines: An update. *Annu Rev Immunol* 15: 675–705, 1997
5. **Bagglioni M, Dewald B, and Moser B.** Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55: 97–179, 1994
6. **Bartoli C, Civatte M, Pellissier JF, and Figarella-Branger D.** CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor, are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 102: 385–392, 2001
7. **Bauss F, Dröge W, and Männel DN.** Tumor necrosis factor mediated endotoxic effects in mice. *Infect Immun* 55: 1622–1625, 1987
8. **Becker S, Devlin RB, and Haskill JS.** Differential production of tumor necrosis factor, macrophage colony stimulating factor, and interleukin-1 by human alveolar macrophages. *J Leuk Biol* 45: 353–361, 1989

9. **Bernard GR.** Acute Respiratory Distress Syndrome. A Historical Perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 798–806, 2005
10. **Bhalla KS and Folz RJ.** Idiopathic pneumonia syndrome after syngenic bone marrow transplant in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1579–1589, 2002
11. **Boring L, Gosling J, Monteclaro FS, Lulis AJ, Tsou C-L, and Charo IF.** Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein-1) and murine macrophage inflammatory protein-1 α receptors. *J Biol Chem* 271: 7551–7558, 1996
12. **Brieland JK, Flory CM, Jones ML, Miller GR, Remick DG, Warren JS, and Fantone JC.** Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 104–109, 1995
13. **Brieland JK, Jones ML, Clarke SJ, Baker JB, Warren JS, and Fantone JC.** Effect of acute lung injury on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat pulmonary alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 134–139, 1992
14. **Burn TC, Petrovick MS, Hohaus S, Rollins BJ, and Tenen DG.** Monocyte chemoattractant protein-1 gene is expressed in activated neutrophils and retinoic acid-induced human myeloid cell lines. *Blood* 84: 2776–2783, 1994
15. **Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni-Grassi G, and Walz A.** Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 655–659, 1994
16. **Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, and Springer TA.** Monocyte chemoattractant protein-1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3652–3656, 1994

17. **Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, and Coughlin SR.** Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein-1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2752–2756, 1994
18. **Chen S, Bacon KB, Li L, Garcia GE, Xia Y, Lo D, Thompson DA, Siani MA, Yamamoto T, Harrison JK, and Feng L.** In vivo inhibition of CC and CX₃C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med* 188: 193–198, 1998
19. **Cho M-L, Yoon B-Y, Ju J-H, Park M-K, Park S-H, Cho C-S, and Kim H-Y.** Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF- β in fibroblast-like synoviocytes of patients with RA. *Exp Mol Med* 39: 499–507, 2007
20. **Colotta F, Sica FL, Sironi M, Luini W, Rabiet MJ, and Mantovani A.** Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol* 144: 975–985, 1994
21. **Cortez KJ, Lyman CA, Kottlilil S, Kim HS, Roilides E, Yang J, Fullmer B, Lempicki R, and Walsh TJ.** Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 74: 2352–2365, 2006
22. **Fearns C, Kravchenko VV, Ulevitch RJ, and Loskutoff DJ.** Murine CD14 gene expression in vivo: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 181: 857–866, 1995
23. **Foley R, Driscoll K, Wan Y, Braciak T, Howard B, Xing Z, Graham F, and Gauldie J.** Adenoviral gene transfer of macrophage inflammatory protein-2 in rat lung. *Am J Pathol* 149: 1395–1403, 1996

24. **Fuentes ML, Durham SK, Swerdel MR, Lewin AC, Barton DS, Megill JR, Bravo R, and Lira SA.** Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol* 155 : 5769–5776, 1995
25. **Fujinaka H, Yamamoto T, Takeya M, Feng L, Kawasaki K, Yaoita E, Kondo D, Wilson CB, Uchiyama M, and Kihara I.** Suppression of antiglomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WYK rats. *J Am Soc Nephrol* 8: 1174–1178, 1997
26. **Geiser T.** Inflammatorische Zytokine und Chemokine bei akuter, entzündlicher Lungenerkrankung. *Schweiz Med Wochenschr* 129: 540–546, 1999
27. **Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim Y-C, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Luster AD, Luscinskas FW, and Rosenzweig A.** MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398: 718–723, 1999
28. **Gordon S.** Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest* 117: 89–93, 2007
29. **Gordon S and Taylor PR.** Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953–964, 2005
30. **Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, and Martin TR.** Inflammatory cytokines in patients with persistence of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 154 : 602–611, 1996
31. **Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, and Charo IF.** MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 103: 773–778, 1999

32. **Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Laichalk LL, McGillicuddy DC, and Standiford TJ.** Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis* 173: 159–165, 1996
33. **Grewal IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, and Rollins BJ.** Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes: abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *J Immunol* 159: 401–408, 1997
34. **Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, and Rollins BJ.** Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2: 275–281, 1998
35. **Gunn MD, Nelken NA, Liao X, and Williams LT.** Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J Immunol* 158: 376–383, 1997
36. **Gupta S, Feng L, Yoshimura T, Redick J, Fu SM, and Rose CE Jr.** Intraalveolar macrophage inflammatory peptide 2 induces rapid neutrophil localization in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 656–663, 1996
37. **Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, and Wright SD.** Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179: 269–277, 1994
38. **Horan PK and Slezak SE.** Stable cell membrane labelling. *Nature* 340: 167–168, 1989
39. **Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, and Akira S.** Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol* 162: 3749–3752, 1999

40. **Isowa N, Keshavjee SH, and Liu M.** Role of microtubules in LPS-induced macrophage inflammatory protein-2 production from rat pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1057–L1082, 2000
41. **Izikson I, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, and Luster AD.** Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med* 192: 1075–1080, 2000
42. **Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, and Graves DT.** Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 148: 2423–2428, 1992
43. **Jiang Y, Valente AJ, Williamson MJ, Zhang L, and Graves DT.** Post-translational modification of a monocyte-specific chemoattractant synthesized by glioma, osteosarcoma, and vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 265: 18318–18321, 1990
44. **Kaifeng LL, Suzuki Y, Nakano H, Ramsburg E, and Gunn MD.** CCR2⁺ Monocyte-Derived Dendritic Cells and Exudate Macrophages Produce Influenza-Induced Pulmonary Immune Pathology and Mortality. *J Immunol* 180: 2562–2572, 2008
45. **Kennedy KJ, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW, and Karpus WJ.** Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1 α and monocyte chemoattractant protein-1. *J Neuroimmunol* 92: 98–108, 1998
46. **Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, and Strieter RM.** Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 90: 772–779, 1992
47. **Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Nagai S, and Izumi T.** Type II pneumocytes release chemoattractant activity for monocytes constitutively. *Am J Pathol* 272: L830–L837, 1997

48. **Kurihara T and Bravo R.** Cloning and functional expression of mCCR2, a murine receptor for the C-C chemokines JE and FIC. *J Biol Chem* 271: 11603–11606, 1996
49. **Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, and Finberg RW.** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1: 398–401, 2000
50. **Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, and Maeda N.** Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12053–12058, 1997
51. **Le J and Vilcek J.** Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 56: 234–248, 1987
52. **Leonard EJ and Yoshimura T.** Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 11: 97–101, 1990
53. **Li XC, Miyasaka M, and Issekutz TB.** Blood monocyte migration to acute lung inflammation involves both CD11/CD18 and very late activation antigen-4-dependent and independent pathways. *J Immunol* 161: 6258–6264, 1998
54. **Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, and Rollins BJ.** Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 187: 601–608, 1998
55. **Lundien MC, Mohammed KA, Nasreen N, Tepper RS, Hardwick JA, Sanders KL, Van Horn RD, and Antony VB.** Induction of MCP-1 expression in airway epithelial cells: Role of CCR2 receptor in airway epithelial injury. *J Clin Immunol* 22: 144–152, 2002

56. **Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AEI, Plachý J, Brühl H, Frink M, Anders H-J, Vielhauer V, Pfirstinger J, Stangassinger M, and Schlöndorff D.** Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol* 166: 4697–4704, 2001
57. **Mahad D, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisäkk P, Tucky B, Kidd G, Kingsbury GA, Chang A, Fox RJ, Mack M, Sniderman MB, Ravid R, Staugaitis SM, Stins MF, and Ransohoff RM.** Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain* 129: 212–223, 2006
58. **Matsushima K, Baldwin ET, and Mukaida N.** Interleukin-8 and MCAF: Novel leukocyte recruitment and activating cytokines. *Chem Immunol* 51: 236–265, 1992
59. **Maus U, Herold S, Muth H, Maus R, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rosseau S, Seeger W, Grimminger F, and Lohmeyer J.** Monocytes recruited to the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L58–L68, 2001
60. **Maus U, Huwe J, Ermert L, Ermert M, Seeger W, and Lohmeyer J.** Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 95–100, 2002
61. **Maus U, Huwe J, Maus R, Seeger W, and Lohmeyer J.** Alveolar JE/MCP-1 and endotoxin synergize to provoke lung cytokine upregulation, sequential neutrophil and monocyte influx, and vascular leakage in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 406–411, 2001
62. **Maus UA, Janzen S, Wall G, Srivastava M, Blackwell TS, Christman JW, Seeger W, Welte T, and Lohmeyer J.** Resident Alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 227–235, 2006

63. **Maus U, Koay MA, Delbeck T, Mack M, Ermert M, Ermert L, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Seeger W, and Lohmeyer J.** Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L1245–L1252, 2002
64. **Maus U, Rosseau S, Seeger W, and Lohmeyer J.** Separation of human alveolar macrophages by flow cytometry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 272: L566–L571, 1997
65. **Maus U, von Grote K, Kuziel WA, Mack M, Miller EJ, Cihak J, Stangassinger M, Maus R, Schlöndorff D, Seeger W, and Lohmeyer J.** The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 268–273, 2002
66. **Maus UA, Waelsch K, Kuziel WA, Delbeck T, Mack M, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Seeger W, and Lohmeyer J.** Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: Role of the CCL2-CCR2 Axis. *J Immunol* 170: 3273–3278, 2003
67. **Maus UA, Wellmann S, Hampl C, Kuziel WA, Srivastava M, Mack M, Everhart MB, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Bohle RM, Seeger W, and Lohmeyer J.** CCR2-positive monocytes recruited to inflamed lungs downregulate local CCL2 chemokine levels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L350–L358, 2005
68. **Moore BB, Peters-Golden M, Christensen PJ, Lama V, Kuziel WA, Paine R 3rd, and Toews GB.** Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE₂. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L324–L349, 2003
69. **Nakamura K, Williams IR, and Kupper TS.** Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): Analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J Invest Dermatol* 105: 635–643, 1995

70. **Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, and Wilcox JN.** Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88: 1121–1127, 1991
71. **Ogata H, Su I, Miyake K, Nagai Y, Akashi S, Mecklenbräuker I, Rajewsky K, Kimoto M, and Tarakhovsky A.** The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J Exp Med* 192: 23–30, 2000
72. **Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, and Matsushima K.** Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9: 617–648, 1990
73. **Paine R 3rd, Rolfe MW, Standiford TJ, Burdick MD, Rollins BJ, and Strieter RM.** MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J Immunol* 150: 4561–4570, 1993
74. **Polentarutti N, Allavena P, Bianchi G, Giardino G, Basile A, Sozzani S, Mantovani A, and Introna M.** IL-2-regulated expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human NK cells: characterization of a predominant 3.4-kilobase transcript containing CCR2B and CCR2A sequences. *J Immunol* 158: 2689–2694, 1997
75. **Prosser HM, Cooper DG, Forbes IT, Geppert M, Gribble AD, Grau EV, Groot PH, Harper AJ, Moores KE, Pickering SJ, and Piercy V.** Targeted replacement of rodent CCR2 with the human orthologue CCR2B: A mouse model for in vivo analysis of human target-selective small molecule MCP-1 receptor antagonists. *Drug Develop Res* 55: 197–209, 2002
76. **Robinson SC, Scott KA, and Balkwill FR.** Chemokine stimulation of monocyte matrix-metalloproteinase-9 requires endogenous TNF- α . *Eur J Immunol* 32: 404–412, 2002

77. **Robson RL, McLoughlin RM, Witowski J, Loetscher P, Wilkinson TS, Jones SA, and Topley N.** Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN- γ controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *J Immunol* 167: 1028–1038, 2001
78. **Rollins BJ.** Monocyte chemoattractant protein-1: A potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 2: 198–204, 1996
79. **Rollins BJ.** Chemokines. *Blood* 90: 909–928, 1997
80. **Rollins BJ, Walz A, and Bagglioni M.** Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78: 1112–1116, 1991
81. **Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, and Pober JS.** Rapid communication. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 136: 1229–1233, 1990
82. **Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Walmrath H-D, Schütte H, Grimminger F, Seeger W, and Lohmeyer J.** Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L25–L35, 2000
83. **Rosseau S, Selhorst J, Wiechmann K, Leissner K, Maus U, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, and Lohmeyer J.** Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: Adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol* 164: 427–435, 2000
84. **Rosseau S und Suttorp N.** Ambulant erworbene Infektionen der Atemwege und des Lungenparenchyms. Klinische und experimentelle Aspekte. *Internist* 41: 1158–1169, 2000

85. **Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MKB, and Dower SK.** Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: A critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* 168: 4701–4710, 2002
86. **Samanta AK, Oppenheim JJ, and Matsushima K.** Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem* 265: 183–189, 1990
87. **Sanders SK, Crean SM, Boxer PA, Kellner D, LaRosa GJ, and Hunt SW 3rd.** Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. *J Immunol* 165: 4877–4883, 2000
88. **Scherberich JE and Nockher WA.** Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 15: 574–578, 2000
89. **Schütt C und Bröker B.** *Grundwissen Immunologie.* München: Spektrum Akademischer Verlag, S. 108 und S. 23, 2006
90. **Shanley TP, Schmal H, Warner RL, Schmid E, Friedl HP, and Ward PA.** Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. *J Immunol* 158: 3439–3448, 1997
91. **Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, and Kimoto M.** MD-2, a molecule, that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777–1782, 1999
92. **Sica A, Saccani A, Borsatti A, Power CA, Wells TNC, Luini W, Polentarutti N, Sozzani S, and Mantovani A.** Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med* 185: 969–974, 1997

93. **Soler-Rodriguez AM, Zhang H, Lichenstein HS, Qureshi N, Niesel DW, Crowe SE, Peterson JW, and Klimpel GR.** Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements of serum and CD14. *J Immunol* 164: 2674–2683, 2000
94. **Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, and Strieter RM.** Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem* 266: 9912–9918, 1991
95. **Sugiyama Y, Kasahara T, Mukaida N, Matsushima K, and Kitamura S.** Chemokines in bronchoalveolar lavage fluid in summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 8: 1084–1090, 1995
96. **Suzuki T, Hashimoto S, Toyoda N, Nagai S, Yamazaki N, Dong H-Y, Sakai J, Yamashita T, Nukiwa T, and Matsushima K.** Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. *Blood* 96: 2584–2591, 2000
97. **Takahashi M, Masuyama J-I, Ikeda U, Kasahara T, Kitagawa S-I, Takahashi Y-I, Shimada K, and Kano S.** Induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human monocytes during transendothelial migration in vitro. *Circ Res* 76: 750–757, 1995
98. **Tobias PS, Soldau K, and Ulevitch RJ.** Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 164: 777–793, 1986
99. **Toews GB.** Cytokines and the lung. *Eur Respir J* 18: Suppl. 34, 3s–17s, 2001
100. **Tsou C-L, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, and Charo IF.** Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117: 902–909, 2007

101. **Tylaska LA, Boring L, Weng W, Aiello R, Charo IF, Rollins BJ, and Gladue RP.** CCR2 regulates the level of MCP-1/CCL2 in vitro and at inflammatory sites and controls T-cell activation in response to alloantigen. *Cytokine* 18: 184–190, 2002
102. **Uguccioni M, D'Appuzzo M, Loetscher M, Dewald B, and Bagglioni M.** Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes. *Eur J Immunol* 25, 64–68, 1995
103. **Ulevitch RJ.** Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Adv Immunol* 53: 267–289, 1993
104. **Ulich TR, del Castillo J, Ni R-X, and Bikhazi N.** Hematologic interactions of endotoxin, tumor necrosis factor alpha (TNF α), Interleukin 1, and adrenal hormones and the hematologic effects of TNF α in *Corynebacterium parvum*-primed rats. *J Leuk Biol* 45: 546–557, 1989
105. **Ulich TR, Watson LR, Yin S, Guo K, Wang P, Thang H, and del Castillo J.** The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* 138: 1485–1496, 1991
106. **Vaddi K and Newton RC.** Regulation of monocyte integrin expression by β -family chemokines. *J Immunol* 153: 4721–4732, 1994
107. **Van Damme J, Proost P, Put W, Arens S, Lenaerts JP, Conings R, Opdenakker G, Heremans H, and Billiau A.** Induction of monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2 in human fibroblasts and leukocytes by cytokines and cytokine inducers. Chemical synthesis of MCP-2 and development of a specific RIA. *J Immunol* 152: 5495–5502, 1994
108. **Varga G, Ehrchen J, Tsianakas A, Tenbrock K, Rattenholl A, Seeliger S, Mack M, Roth J, and Sunderkoetter C.** Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* 84: 644–650, 2008

109. **Waelsch KMI.** Schrittmacherfunktion zirkulierender Monozyten für die inflammatorische Rekrutierung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten in die Lunge. Medizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, S. 28, S. 35, 2005
110. **Wang JM, Hishinuma A, Oppenheim JJ, and Matsushima K.** Studies of binding and internalization of human recombinant monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by monocytic cells. *Cytokine* 5: 264–275, 1993
111. **Warren JS, Jones ML, and Flory CM.** Analysis of monocyte chemoattractant protein-1-mediated lung injury using rat lung organ cultures. *Am J Pathol* 143: 894–906, 1993
112. **Weber C.** Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J Mol Med* 81: 4–19, 2003
113. **Wells CA, Ravasi T, and Hume DA.** Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. *J Leukoc Biol* 78: 9–13, 2005
114. **Wong L-M, Myers SJ, Tsou C-L, Gosling J, Arai H, and Charo IF.** Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. *J Biol Chem* 272: 1038–1045, 1997
115. **Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, and Mathison JC.** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431–1433, 1990
116. **Yamamoto T, Kajikawa O, Martin TR, Sharar SR, Harlan JM, and Winn RK.** The role of leukocyte emigration and IL-8 on the development of lipopolysaccharide-induced lung injury in rabbits. *J Immunol* 161: 5704–5709, 1998
117. **Yang H, Young DW, Gusovsky F, and Chow JC.** Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4: MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein-kinases and Elk-1. *J Biol Chem* 275, 20861–20866, 2000

118. **Yoshimura T and Leonard EJ.** Secretion by human fibroblasts of monocyte chemo-attractant protein-1, the product of gene JE. *J Immunol* 144: 2377–2383, 1990
119. **Zachariae COC, Anderson AO, Thompson HL, Appella E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Matsushima K.** Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. *J Exp Med* 171: 2177–2182, 1990
120. **Zhang P, Bagby GJ, Kolls JK, Welsh DA, Summer WR, Andresen J, and Nelson S.** The effects of granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recruitment on the pulmonary chemokine response to intratracheal endotoxin. *J Immunol* 165: 458–465, 2001
121. **Zlotnik A and Yoshie O.** Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121–127, 2000

Hergestellte Lösungen

Mausmedium

verwendet bei der Gewinnung von Knochenmarkszellen und bei der Aufbereitung der BAL

Mausserum und RPMI 1640 mit GlutaMAX, Mischungsverhältnis 1:10

Xylazinhydrochloridlösung

verwendet bei der Narkose

Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%) und NaCl 0,9%, Mischungsverhältnis 2:5 weitere Verdünnung mit NaCl 0,9%, Mischungsverhältnis 1:5

Ketaminhydrochloridlösung

verwendet bei der Narkose

Ketaminhydrochlorid (Ketavet® 100 mg/ml) und NaCl 0,9%, Mischungsverhältnis 1:3

PBS (-/-), einfach konzentriert

(Grundlage für weitere Ansätze)

PBS ohne Ca/Mg (-/-), zehnfach und Aqua destillata, Mischungsverhältnis 1:10

PBS/EDTA

verwendet bei der BAL

5 mM EDTA (Versen) und PBS (-/-) einfach, Mischungsverhältnis 1:5 pH 7,2

Formaldehydlösung 4,5%

verwendet bei der Fixierung von Mauslungen

Formaldehyd und PBS (-/-) einfach, Mischungsverhältnis 9:200 pH 7,2

Materialien, Versuchstiere und Bezugsquellen

Abbocath 26 G Venenverweilkatheter.....	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Ammoniumchlorid.....	Sigma, München, Deutschland
Aqua destillata.....	Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland
BALB/c-Mäuse.....	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
Bepanthen Augensalbe.....	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
Calibrite Beads.....	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CCL2 (murin, rekombinant).....	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
CCR2-Antikörper MC21, monoklonal, von der Ratte, antimurin, Isotyp IgG2b	zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Matthias Mack, Universität Regensburg, Deutschland
CCR2-defiziente Mäuse, Zuchtlinie C57BL/6x129/Ola	zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. William A. Kuziel University of Texas, Austin, Texas, USA
Cell Strainer, 40 µm, 70 µm, Nylon-Zellsiebe.....	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Coatest®, Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test.....	Chromogenix, Möln dal, Schweden
EDTA-Probenröhrchen.....	KABE Labortechnik, Nürnberg, Deutschland
EDTA Versen.....	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Einwegmaterial aus Polyethylen,..... Polypropylen, Polystyren	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
	Corning Costar, Bodenheim, Deutschland
Ethanol 70%.....	Fischer, Saarbrücken, Deutschland	
F4/80-Antikörper, FITC-konjugiert, monoklonal, von der Ratte, antimurin	Serotec, München, Deutschland	
Fc-Block (CD16/CD32).....	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland	
FCS (fötales Käberserum).....	Gibco, Karlsruhe, Deutschland	
Forene® (Isofluran).....	Abbott, Wiesbaden, Deutschland	
Formaldehyd.....	Sigma, München, Deutschland	
Giemsa-Lösung.....	Merck, Darmstadt, Deutschland	
Hämatoxylin-Eosin.....	Merck, Darmstadt, Deutschland	
HSA (humanes Serumalbumin).....	Sigma, München, Deutschland	
Kanülen, steril.....	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid).....	Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland	
Kontrollantikörper, von der Ratte, antimurin, Isotyp IgG2b	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland	
Leibovitz L15-Medium.....	Gibco, Karlsruhe, Deutschland	
Lipopolysaccharid des Bakterienstamms Escherichia coli O111:B4	Sigma, München, Deutschland	

Mausserum.....	Serotec, München, Deutschland
May-Grünwald-Lösung.....	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mikrotiterplatten, flexibel.....	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
NaCl 0,9%.....	Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland
NaOCl (Natriumhypochlorid).....	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland
Omnican® 30 Insulinspritze (300 µl) mit integrierter Kanüle (29 G)	Braun, Melsungen, Deutschland
Omnifix® 100 Insulinspritze (1ml) ohne Kanüle	Braun, Melsungen, Deutschland
Paraffin.....	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS ohne Ca/Mg (-/-), zehnfach konzentriert	PAA Laboratories Cölbe, Deutschland
Quantikine® ELISA Kit für..... mouse CCL2/JE/MCP-1, mouse TNF- α , mouse MIP-2, mouse CCL12/MCP-5	R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Vicryl 4.0 und 6.0 Faden.....	Johnson & Johnson, Dilbeek, Belgien
Rompun® (Xylazinhydrochlorid) 2%.....	Bayer, Leverkusen, Deutschland
RPMI 1640 mit GlutaMAX.....	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Skalpelle, steril.....	pfm AG, Köln, Deutschland
Softasept® Desinfektionslösung.....	Braun, D-Melsungen

Geräte und Herstellernachweis

Brutschrank.....	Heraeus, Hanau, Deutschland
ELISA-Plattenphotometer.....	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
ELISA-Washer.....	Tecan, Crailsheim, Deutschland
FACSVantage SE, DiVA Modul, DiVa Software.....	BD Bioscience, San Jose, California, USA
Hellfeldmikroskop Orthoplan.....	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Dialux 20.....	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikropräparierbesteck.....	Hammacher, Solingen, Deutschland Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer.....	Braun, Melsungen, Deutschland
pH-Meter.....	Schott, Hofheim, Deutschland
Pipetten.....	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Abimed, Langenfeld, Deutschland
Stereomikroskop Leica MS 5.....	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Vortex-Gerät.....	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Zentrifuge.....	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zytozentrifuge.....	Shandon Frankfurt am Main, Deutschland

Eidesstattliche Erklärung

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

Sandra Wellmann

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. J. Lohmeyer, und meinem fachlichen Betreuer, Herrn PD Dr. U. Maus, aussprechen.

Herrn PD Dr. U. Maus danke ich für die gründliche Einarbeitung in die Arbeitstechniken, insbesondere im tierexperimentellen Teil. Seine kompetente experimentelle Betreuung war für diese Arbeit unerlässlich.

Herrn Prof. Dr. J. Lohmeyer danke ich dafür, dass er mich so freundlich in seine Arbeitsgruppe aufnahm, mir ein interessantes Thema zur Bearbeitung stellte und mich in vielerlei Hinsicht unterstützte.

Frau R. Maus gilt mein Dank für ihre Hilfe besonders bei den zellbiologischen und immunologischen Methoden. In geduldiger und liebenswürdiger Weise war sie auch dann behilflich, wenn ein praktisches Problem auftrat.

Frau P. Janssen und den anderen Mitarbeitern im Infektionslabor möchte ich ebenfalls danken. Die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor bereitete mir viel Freude.

Frau Dr. C. Hampl danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den tierexperimentellen Versuchen.

Herrn Dr. M. Steinmüller gilt mein Dank für das kritische und aufmerksame Lesen meiner Dissertation, wobei er gute Hinweise vorbrachte.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie: Frau U. Mailand ermöglichte mir mein Studium, ihre motivierenden Ratschläge kamen mir stets zugute. Herr T. Wellmann lieferte hilfreiche Anregungen hinsichtlich Form und Computertechnik. Herr J. Felske zeigte ein beständiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Bei ihnen bedanke ich mich auch für das Gegenlesen der ersten Fassung meiner Dissertation.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**