

**Schrittmacherfunktion zirkulierender Monozyten für
die inflammatorische Rekrutierung polymorph-
kerniger neutrophiler Granulozyten in die Lunge.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Katharina Maria Irena Waelsch

aus Essen

Gießen 2005

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen,
Sonderforschungsbereich 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“
(Sprecher: Prof. Dr. med. Werner Seeger)**

Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Gutachter: PD Dr. H. Hackstein

Tag der Disputation: 16.10.2006

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGEN.....	4
1 EINLEITUNG	7
1.1 EINFÜHRUNG	7
1.1.1 Die CCL2-CCR2-Achse	7
1.1.2 Zirkulierende Blutmonozyten als Bestandteile des mononukleär-phagozytären Systems ..	10
1.2 ZIEL DER ARBEIT	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 VERSUCHSTIERE UND EXPERIMENTELLE METHODEN	14
2.1.1 Mäuse.....	14
2.1.2 Narkose	14
2.1.3 Markierung des residenten Alveolarmakrophagenpools mit PKH26-PCL.....	15
2.1.4 Generierung chimärer Wildtyp-Mäuse und chimärer CCR2-defizienter Mäuse	17
2.1.5 Gemischte Knochenmarktransplantation.....	18
2.1.6 Depletion residenter Alveolarmakrophagen mittels liposomalen Clodronates.....	18
2.1.7 Transfusion mononukleärer CCR2 +/+ Zellen auf CCR2-defiziente Mäuse	19
2.1.8 Induktion der akuten pulmonalen Inflammation durch intratracheale Applikation von CCL2 plus LPS.....	20
2.1.9 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Blutentnahme	20
2.1.10 Prinzip der Durchflußzytometrie und Immunfluoreszenz.....	22
2.1.11 Durchflußzytometrische Analyse der CCR2 und F4/80- Expression auf peripheren Blutmonozyten und residenten Alveolarmakrophagen bzw der CCR2- und GR1- Expression der peripheren neutrophilen Granulozyten.....	23
2.1.12 Quantifizierung der Zellen in der BAL-Flüssigkeit	25
2.1.13 Bestimmung der TNF α -Konzentration in der BAL	25

2.1.14	<i>Statistik</i>	25
3	ERGEBNISSE	26
3.1	EXPERIMENTELLE GRUPPEN.....	26
3.2	ANALYSE DER CCR2-EXPRESSION ZIRKULIERENDER BLUTMONOZYTEN IN DEN VERSCHIEDENEN VERSUCHSGRUPPEN.....	28
3.3	EVALUIERUNG DER LEUKOZYTENREKRUTIERUNGSPROFILE IN DEN VERSCHIEDENEN BEHANDLUNGSGRUPPEN.....	30
3.3.1	<i>Monozytenrekrutierungsprofile in den verschiedenen Behandlungsgruppen</i>	30
3.3.2	<i>Alveoläre Neutrophilenrekrutierung in den verschiedenen Behandlungsgruppen</i>	33
3.4	FUNKTION RESIDENTER ALVEOLARMAKROPHAGEN IN DER CCL2 PLUS LPS-INDUZIERTEN AKUTEN PULMONALEN INFLAMMATION.....	35
3.5	ROLLE DER CCR2-EXPRESSION RESIDENTER ALVEOLARMAKROPHAGEN IN DER CCL2 PLUS LPS-INDUZIERTEN INTRA-ALVEOLÄREN TNF α - PRODUKTION	38
3.6	EFFEKT GEMISCHTER KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION AUF DIE CCL2 PLUS LPS-INDUZIERTE ALVEOLÄRE NEUTROPHILENREKRUTIERUNG IN DEN VERSCHIEDENEN BEHANDLUNGSGRUPPEN ..	39
3.7	EFFEKT DER TRANSFUSION MONONUKLEÄRER WILDTYPELEUKOZYTEN AUF DIE DURCH CCL2 PLUS LPS INDUZIERTE ALVEOLÄRE NEUTROPHILENREKRUTIERUNG IN CCR2- DEFIZIENTEN MÄUSEN	43
4	DISKUSSION	45
4.1	DIE BEDEUTUNG DER CCL2/CCR2-ACHSE FÜR DIE PULMONALE MONOZYTENREKRUTIERUNG UNTER AKUTEN ENTZÜNDUNGSBEDINGUNGEN.....	46
4.2	RELEVANZ DER CCR2- EXPRESSION RESIDENTER ALVEOLARMAKROPHAGEN FÜR DIE ALVEOLÄRE NEUTROPHILEN- UND MONOZYTENREKRUTIERUNG IN DER AKUTEN PULMONALEN INFLAMMATION DER MAUS	49
4.3	EFFEKT DER TRANSFUSION MONONUKLEÄRER LEUKOZYTEN AUF DIE CCL2 PLUS LPS INDUZIERTE NEUTROPHILEN-ALVEOLITIS CCR2-DEFIZIENTER MÄUSE	50
4.4	DIE BEDEUTUNG DER CCL2/CCR2-ACHSE IN ANDEREN MODELLEN DER AKUTEN VERSUS CHRONISCHEN LUNGENENTZÜNDUNG.....	53
4.5	AUSBlick	54

5	ZUSAMMENFASSUNG	56
6	SUMMARY	59
7	LITERATURVERZEICHNIS	60
8	ANHANG	77
8.1	VERWENDETE LÖSUNGEN	77
8.2	MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN.....	78
8.3	GERÄTE UND HERSTELLERNACHWEIS VERWENDETER GERÄTE.....	82
8.4	DANKSAGUNG	83
8.5	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	83
8.6	LEBENS LAUF	84
8.7	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	85

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Ak	Antikörper
Alv-Mo	Alveolär rekrutierte Monozyten
Alv-PMN	Alveolär rekrutierte neutrophile Granulozyten
Aqua dest.	Aqua destillata
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	cirka
Ca ²⁺	Kalzium
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCL2	CC-Chemokin Ligand 2 (entspricht in alter Nomenklatur: MCP-1)
CCR2	CC-Chemokinrezeptor 2
CCR2 ^{-/-}	CCR2-defizient
CCR2 ^{+/+}	CCR2-exprimierend
CD	cluster of differentiation
CFU-GM	colony-forming unit, granulocyte-macrophage
Co	Kobalt
d	Tag
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting

FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Fallbeschleunigung Gramm
G	Gauge
Gy	Gray
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSA	humanes Serumalbumin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRDS	infant respiratory distress syndrom
JE/MCP-1	rekombinantes murines MCP-1
LPS	Lipopolysaccharid
Ly	Lymphozyt
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2)
mg	Milligramm
min	Minuten
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 α
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MNC	mononukleäre Zellen
mW	Milliwatt
NaCl	Natrium-Chlorid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natural killer-Zellen
PB-Mo	periphere Blutmonozyten
PB-PMN	periphere neutrophile Granulozyten
PBS	phosphate-buffered saline
PCL	phagocyte linker
PE	Phycoerythrin

pg	Pikogramm
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
rAM	residente Alveolarmakrophagen
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Rosevelt park memorial institute
s	Sekunden
SA	Streptavidin
SEM	Standard error of the mean
SPF	specific pathogen-free
SSC	sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	Units
W	Watt
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die akute pulmonale Inflammation, welche regelhaft im Verlauf pulmonaler Erkrankungen wie dem akuten Atemnotsyndrom des Erwachsenen oder der bakteriellen Pneumonie zu beobachten ist, trägt trotz verbesserter intensivmedizinischer Therapiemaßnahmen nach wie vor maßgeblich zur hohen Morbidität und Mortalität dieser Krankheiten bei (001, 002, 003). Ein charakteristisches Kennzeichen der akuten pulmonalen Inflammation ist die koordinierte frühe Neutrophilen- und verzögerte Monozytenrekutierung aus dem Gefäßbett der Lunge über die endotheliale Barriere, das Lungeninterstitium und das Alveolarepithel in den Alveolarraum der Lunge (004, 005, 006, 007). Obwohl bekannt ist, dass in diesem Prozess die Freisetzung neutrophilen- und monozytenspezifischer Chemokine sowie die Zelloberflächenpräsentation von komplementären Leukozyten- und Endothelzell- bzw. Epithelzell-assoziierten Adhäsionsmolekülen eine zentrale Rolle spielen, sind die zugrundeliegenden Mechanismen, welche für Kinetik und Ausmaß der alveolären Neutrophilen- und Monozytenrekutierung verantwortlich sind, noch nicht völlig geklärt (005; 008, 009, 010).

1.1.1 Die CCL2-CCR2-Achse

In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Chemokinen sowie Adhäsionsmolekülen identifiziert werden, welche in den Transmigrationsprozess sowohl von Monozyten wie auch von neutrophilen Granulozyten über die endo-epitheliale Barriere in das alveoläre Kompartiment involviert sind (009; 011; 012; 013; 014; 015; 016; 017). Klinische Untersuchungen an septischen ARDS-Patienten zeigten, dass parallel zu einer erheblich gesteigerten alveolären Neutrophilen- und Monozytenakkumulation persistierend gesteigerte Spiegel des monozytenrekutierenden Proteins CCL2 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit zu

beobachtet sind. Zugleich konnte dargestellt werden, daß das Ausmaß der alveolären Monozytenrekrutierung mit dem Grad der Lungenschädigung (lung injury score) korrelierte (005; 018). Auch das IRDS des neugeborenen Kindes (infant respiratory distress syndrome) ist charakterisiert durch erhöhte alveoläre Spiegel des monozyten rekrutierenden Chemokins CCL2, welche mit der Entwicklung pulmonaler Hämorrhagien sowie bronchopulmonaler Dysplasien korrelieren (019).

Erhöhte intraalveoläre CCL2-Spiegel konnten auch bei chronischen Lungenerkrankungen, wie zum Beispiel der Sarkoidose, der idiopathischen pulmonalen Fibrose (ILF) (020; 021), bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) (022), Hypersensitivitätspneumonitis (023; 024), anderen interstitiellen granulomatösen Lungenerkrankungen (021; 025; 026; 027; 028; 029; 030), beim Asthma (031; 032; 033) sowie bei experimenteller Endotoxämie (034; 035, 036) nachgewiesen werden. Desweiteren ist CCL2 (MCP-1) auch bei (chronischen) nicht-pulmonalen inflammatorischen Prozessen beteiligt, wie der rheumatoiden Arthritis (037; 038; 039; 040), Atherosklerose (041; 042; 043; 044; 045; 046; 047; 048; 049), bei bestimmten Nephritiden (050; 051; 052; 053; 054; 055), in Tiermodellen der Multiplen Sklerose (056; 057), Psoriasis (058) Lupus erythematodes (059; 060) und Morbus Crohn (061).

CCL2 ist ein 148 Aminosäuren langes, stark glykosyliertes Protein, welches nach Stimulation mit Endotoxin, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 bzw. Interferon- γ , von makro- und mikrovaskulären Endothelzellen der pulmonalen Strombahn, von Alveolarepithelzellen, residenten Alveolarmakrophagen, zirkulierenden Monozyten, neutrophilen Granulozyten, glatten Muskelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten sezerniert wird (012; 058; 062; 063; 064; 065; 066; 067; 068; 069, 070; 071; 072; 073). CCL2 gehört zur Familie der CC-Chemokine, welche primär Monozyten- und Lymphozyten-rekrutierende Eigenschaften aufweisen (074; 075; 076; 077; 078; 079). Chemokine ihrerseits gehören zur Superfamilie der Zytokine und entfalten ihre chemotaktische Wirkung auf die Zielzelle durch Bindung an 7-tms-Rezeptoren (7- trans-membrane-segment-spanning receptors), welche intrazellulär an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind (080). Die primäre Zielzelle des hämatopoetischen Systems, welche chemotaktisch durch CCL2 rekrutiert wird, ist der zirkulierende Blutmonozyt, welcher eine homogene Expression des CCL2-Rezeptors CCR2 auf der Zelloberfläche trägt (081).

Die Spezifität von CCL2 für die Rekrutierung zirkulierender Monozyten aus dem vaskulären Kompartiment in die Lunge konnte kürzlich in einem transgenen Mausmodell gezeigt werden, in welchem CCL2 spezifisch in Typ II-Alveolarepithelzellen überexprimiert wurde und eine starke selektive Akkumulation von Monozyten im alveolären Kompartiment induzierte (082). Auch andere transgene Mausmodelle haben einen kausalen Zusammenhang zwischen CCL2-Expression und der Akkumulation von Monozyten in verschiedenen Organsystemen zeigen können. So fanden sich Infiltrate von Monozyten in perivaskulären Arealen des Zentralnervensystems von Mäusen, welche CCL2 im Gehirn überexprimierten oder ein ähnliches, monozytär dominiertes Zellinfiltrat in Mäusen mit einer Überexpression des Chemokins in pankreatischen Inselzellen (083; 084). Bei Überexpression von CCL2 in der Basalzellschicht der Haut fanden Nakamura et al. eine vermehrte Infiltration von dendritischen Zellen mit Langerhanszell-spezifischen Charakteristika (058).

Neben seinen Monozyten-chemotaktischen Aktivitäten kann CCL2 auch den Aktivierungszustand von Monozyten beeinflussen: es induziert in Monozyten regelhaft eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die Freisetzung von Arachidonsäurederivaten, sowie auch den respiratorischen Burst (085; 086; 087). Es kann weitere Monozyten-Makrophagen Effektor Zell-Funktionen modulieren, beispielsweise durch eine Steigerung der $\beta 2$ -Integrinexpression (088; 089), welche relevant ist für die Monozytenpassage über die endo-und epitheliale Barriere in vitro und in vivo (011; 012). Außer seinem Effekt auf Monozyten zeigt CCL2 chemotaktische Effekte, wenn auch deutlich schwächer, auf CD4-positive T-Lymphozyten, basophile Granulozyten und NK-Zellen (020; 058; 072; 074; 082; 083; 090). Desweiteren beeinflusst es die Affinität von Adhäsionsmolekülen der zu rekrutierenden Zellen zum jeweiligen Liganden auf Endo- oder Epithelzellen (088; 091; 089). Eine Vielzahl von Untersuchungsergebnissen deuten darauf hin, dass im Gegensatz zu anderen CC-Chemokinen CCL2 primär an den auf zirkulierenden Blutmonozyten homogen exprimierten G-Protein-gekoppelten 7-tms-receptor CCR2 bindet (081; 092; 080). Auch residente Alveolarmakrophagen exprimieren CCR2, allerdings in geringerer Dichte als zirkulierende Blutmonozyten (073). Darüberhinaus zeigen ca 15% der zirkulierenden T-Lymphozyten eine CCR2-Expression (081). Im Gegensatz zum murinen System existieren beim Menschen zwei Isoformen des Rezeptors (CCR2 A bzw. CCR2 B), welche gleichermassen Ligandenbindung zeigen (093; 094). Die Expression von CCR2

auf humanen sowie auch murinen mononukleären Phagozyten wird durch proinflammatorische Stimuli reguliert (095; 096; 097; 072). So konnte gezeigt werden, dass sowohl eine CCL2-vermittelte wie auch eine LPS- bzw. TNF α -vermittelte CCR2-Internalisierung durch die Effektorzelle (Liganden-abhängiges-Rezeptor-recycling) in Funktionsassays zu einer passageren Anergie der Effektorzelle gegenüber dem Liganden CCL2 führt. Schließlich konnte kürzlich auch gezeigt werden, dass die Expressionsdichte des CCR2-Rezeptors im Verlauf der Monozyten-Makrophagendifferenzierung herunterreguliert wird (073). Die durch inflammatorische Stimuli wie LPS induzierte alveoläre Monozytenrekrutierung ist strikt abhängig von der CCL2-Interaktion mit seinem Rezeptor CCR2 auf der Monozytenoberfläche (098).

1.1.2 Zirkulierende Blutmonozyten als Bestandteile des mononukleär-phagozytären Systems

Zirkulierende Blutmonozyten sind integrale Bestandteile des mononukleär-phagozytären Systems (MPS), zu welchem neben Blutmonozyten die Gesamtheit der gewebetypischen Makrophagen zählen. Zirkulierende Blutmonozyten selbst gehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks hervor. Die sowohl für die Neutrophilen-, als auch für die Monozytenentwicklung relevante hämatopoetische Vorläuferzelle wird als CFU-GM (colony forming unit of the granulocytic and monocytic lineage) bezeichnet, aus welcher neben Neutrophilen-Vorläuferzellen auch sogenannte Monoblasten hervorgehen. Monoblasten ihrerseits reifen im Knochenmark zu Promonozyten, welche als Vorläuferzellen zirkulierender Monozyten zu betrachten sind, die ihrerseits nach unterschiedlicher Verweildauer im Blut in Organewebe emigrieren, wo sie zu den gewebetypischen Makrophagen ausdifferenzieren. Dieser komplexe Prozess der Monozyten-Makrophagendifferenzierung wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert (G-CSF, M-CSF, GM-CSF). Eine der wichtigsten bisher definierten Funktionen zirkulierender Blutmonozyten besteht somit zweifelsfrei in ihrer Funktion als Progenitorzelle gewebetypischer Makrophagen (099) (siehe *Abbildung 1*). In seiner komplexen Struktur stellt das mononukleär-phagozytäre

System ein hocheffizientes Netzwerk an gewebetypischen professionellen Phagozyten dar, deren wichtigste Funktion in der „inade host defence“ des Organismus besteht.

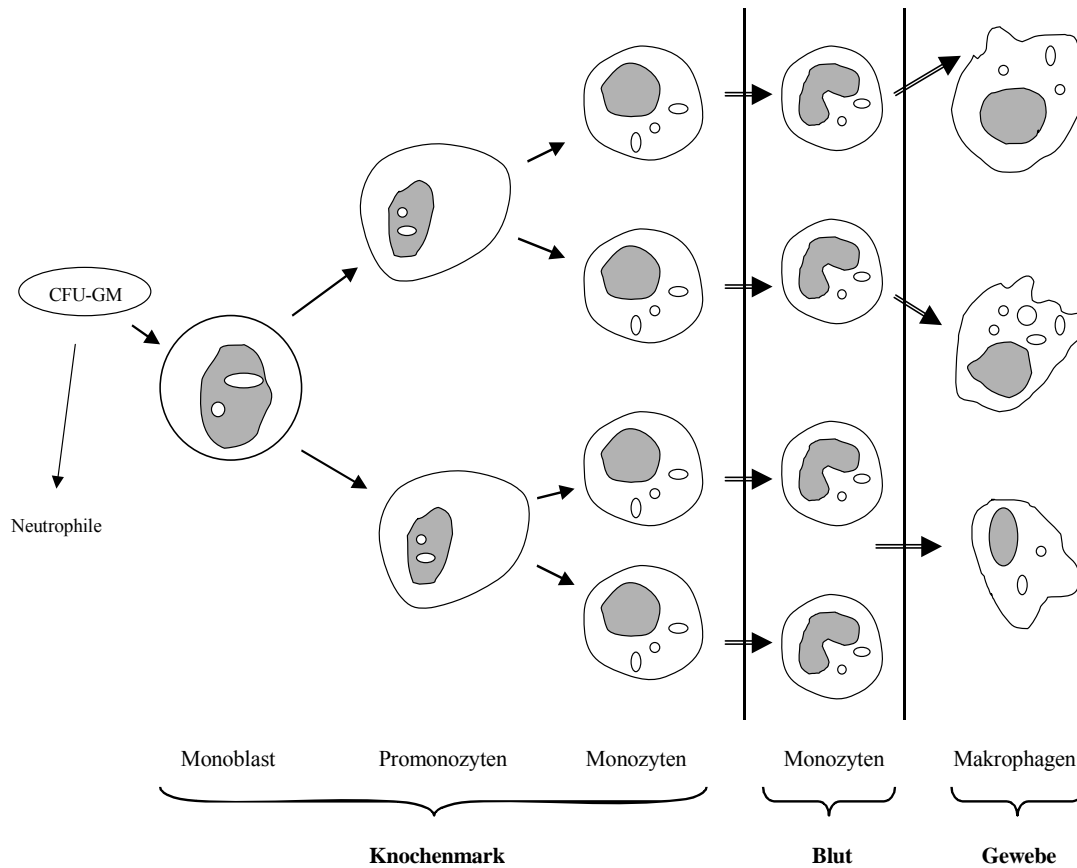


Abbildung 1. Differenzierung des monozytär-phagozytären Systems. Das mononukleär-phagozytäre System findet seinen Ursprung in der sogenannten CFU-GM, welche sowohl neutrophile Vorläuferzellen als auch monozytäre Vorläuferzellen in Form von Monoblasten hervorbringt. Monoblasten differenzieren in Promonozyten, aus welchen knochenmarkstämmige Monozyten hervorgehen, welche wiederum nach bestimmter Verweildauer im Knochenmark in das periphere Blut ausgeschwemmt werden und dort als zirkulierende Monozyten in Erscheinung treten. Zirkulierende Blutmonozyten wiederum stellen Progenitorzellen für gewebetypische Makrophagen dar (099).

Zur Charakterisierung der inflammatorischen Funktion von Monozyten im Kontext akuter pulmonaler Inflammation wurde ein Mausmodell entwickelt, welches mit Hilfe der Durchflußzytometrie ein Monitoring des Monozytenverkehrs unter nicht-entzündlichen sowie unter akut-entzündlichen Bedingungen erlaubt (009; 100; 101). In diesem Modell ließ sich zeigen, dass die alleinige Deposition von rekombinantem murinen CCL2 (JE, MCP-1) in die Lungen von Wildtypmäusen eine selektive alveoläre Monozytenakkumulation ohne Ausbildung einer akuten Lungenentzündung induzierte (100; 101). Demgegenüber induzierte die intratracheale Applikation von CCL2 zusammen mit niedrigen Dosen von *E. coli* Endotoxin eine starke, selbstlimitierte pulmonale Inflammation, welche durch eine strikte Rekrutierungskinetik mit früher Neutrophilen- und verzögerter Monozytenakkumulation im Alveolarraum charakterisiert war (098; 101). Parallel zu diesen Befunden konnte eine gesteigerte endo-epitheliale Permeabilitätserhöhung mit korrespondierenden Proteinübertritten in das alveoläre Kompartiment nachgewiesen werden (101). Dieses Mausmodell einer akuten pulmonalen Inflammation zeigte somit pathophysiologische Charakteristika des ARDS beim Menschen (005; 101). Zugleich demonstrierte es die strikte CCR2-Abhängigkeit der inflammatorischen alveolären Monozytenrekrutierung, da sowohl die genetische Deletion als auch die spezifische Blockade des CCR2-Rezeptors durch Applikation funktionsblockierender anti-CCR2-Antikörper eine nahezu 100%ige Attenuierung des akut entzündlichen alveolären Monozyteneinstroms bewirkte (081; 091; 098).

Überraschend bei diesen Untersuchungen war, dass die Blockade der CCR2-abhängigen Monozytenrekrutierung nicht nur den alveolären Monozyteneinstrom attenuierte, sondern darüberhinaus auch die frühe alveoläre Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum beeinflusste. Dieser Befund ist unerwartet, da zirkulierende neutrophile Granulozyten keinen CCR2-Rezeptor exprimieren und per se durch Funktionsblockade von CCR2 in ihrem Migrationsverhalten nicht beeinträchtigt werden sollten (098; 102).

1.2 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, welche Rolle zirkulierende Monozyten für die Regulation der alveolären Neutrophilenrekrutierung unter akuten Entzündungsbedingungen spielen. Insbesondere sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welche Rolle spielen CCR2-positive zirkulierende Blutmonozyten versus CCR2-positive residente Alveolarmakrophagen für die CCL2 bzw. CCL2 plus LPS induzierte alveoläre Monozyten- bzw. Neutrophilenrekrutierung in die Lunge?
2. Welchen Effekt hat die Transfusion CCR2-positiver mononukleärer Zellen von Wildtypmäusen in CCR2-defiziente Mäuse auf die alveoläre Neutrophilenrekrutierung?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und experimentelle Methoden

2.1.1 Mäuse

In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche BALB/c Wildtypmäuse im Alter von 8 – 12 Wochen (18– 21 g Gewicht) verwendet. Darüber hinaus wurden CCR2-defiziente Mäuse verwendet, welche in einer internationalen Kooperation mit Prof. William A. Kuziel (University of Texas, Austin, Texas, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Mäuse wurden durch „targeted disruption“ des CCR2-Gens in einem gemischten C57BL/6 x 129/Ola Background generiert (091). Die Nachkommen dieser CCR2 defizienten Mäuse wurden über 6 Generationen in den BALB/c Background rückgekreuzt. CCR2-defiziente Zuchtpaare wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (specific pathogen-free, SPF) vermehrt, und deren Nachkommen im Alter von 8-12 Wochen in die korrespondierenden Versuche eingesetzt. Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

2.1.2 Narkose

Zur Sedierung und Muskelrelaxation der Mäuse erfolgte die intramuskuläre Gabe von Xylacinhydrochlorid (Rompun®). Rompun® 2% wurde 1:15 in 0,9%iger Natriumchloridlösung verdünnt und von der entstehenden Gebrauchsverdünnung wurden 50 µl/Maus intramuskulär appliziert. Hierfür wurden 200 µl der Xylacinhydrochloridlösung und 300 µl einer 0,9%igen Natriumchloridlösung in eine 1 ml-Spritze aufgezogen und gemischt. Hiervon wurden 150 µl mit weiteren 750 µl einer 0,9%igen Natriumchloridlösung verdünnt.

Zur Narkose wurden die Mäuse mit Ketamin (Ketaminhydrochloridlösung, Ketavet®) versorgt. Ketamin (Stammlösung 100 mg/ml) wurde 1:3 mit 0,9%iger Natriumchloridlösung verdünnt und hiervon wurden 60 µl den Mäusen intramuskulär appliziert.

Zum Austrocknungsschutz wurden die Augen der narkotisierten Tiere mit Bepanthen® Augensalbe versorgt.

2.1.3 Markierung des residenten Alveolarmakrophagenpools mit PKH26-PCL

Zur Diskriminierung der in den verschiedenen Behandlungsregimen (*siehe Tabelle 1, Seite 27*) in die Lunge rekrutierten Leukozytenpopulationen von residenten Alveolarmakrophagen erhielten die Mäuse 24 Stunden vor der intratrachealen Instillation inflammatorischer Mediatoren eine intravenöse Injektion des rotfluoreszenten Intravitalfarbstoffes PKH26-PCL (*100*). Wie in *Abbildung 2* dargestellt, akkumuliert PKH26-PCL nach intravenöser Applikation selektiv in residenten Alveolarmakrophagen, ohne zirkulierende Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten) zu markieren (*100*).

PKH26-PCL (1 mM Stamm-Lösung in 100% Ethanol gelöst) wurde unter sterilen Bedingungen mit „Diluent B“ im Verhältnis 1:4 verdünnt und hiervon 100 µl/Maus über die laterale Schwanzvene mit Hilfe einer 29 G Kanüle intravenös appliziert, so dass bei Zugrundelegen eines austauschbaren Blutvolumens von etwa 2 ml/Maus eine in vivo-Konzentration des Intravitalfarbstoffes von ca. 15 µM resultierte.

Wie *Abbildung 2* zeigt, akkumuliert dieser Farbstoff selektiv in residenten Alveolarmakrophagen, welche hierdurch eine Verstärkung ihrer Rotfluoreszenz-Emissions-Charakteristika in der durchflusszytometrischen Analyse zeigen. Da zugleich zirkulierende Leukozyten den Farbstoff nicht aufnehmen, können diese nach experimentell induzierter Rekrutierung in den Alveolarraum von den nunmehr rotfluoreszenten residenten Alveolarmakrophagen durchflusszytometrisch leicht diskriminiert werden (*009; 098; 100; 101*).

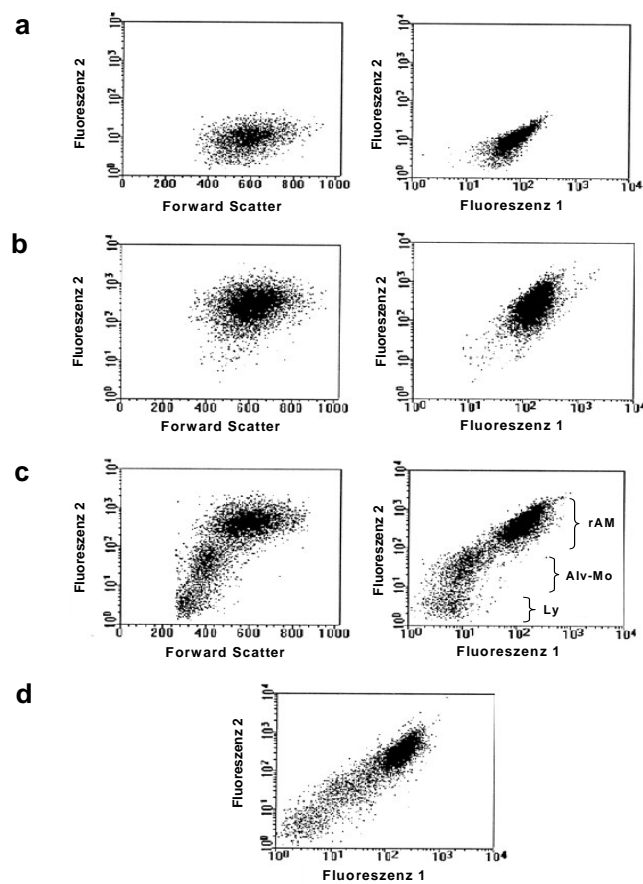


Abbildung 2. Identifikation alveolär rekrutierter Monozyten. BALB/c Mäuse erhielten entweder eine intravenöse Injektion von Trägerlösung alleine (*a*), eine intravenöse Injektion von PKH26 (15 μ molar Endkonzentration, *b*) oder eine intravenöse Injektion von PKH26 gefolgt von einer intratrachealen Instillation von murinem rekombinantem CCL2 (*c*). 48 h später wurde eine bronchoalveoläre Lavage zur Analyse alveolär rekrutierter Leukozyten durchgeführt. *a-c*, *Diagramme links*: Forward Scatter-Charakteristik BAL-Zellen (lineare Skala) und rote Fluoreszenz 2-Charakteristik (FL2, F488/575, logarithmische Skala). *a-c*, *Diagramme rechts*: grüne Autofluoreszenz (Fluoreszenz 1, FL1, Emission bei 535 nm) – Charakteristik (F488/535) und rote Fluoreszenz 2-Charakteristik (FL 2, F488/575) der BAL-Zellen (logarithmische Skala). Die intravenöse Injektion von PKH26 führt zu einer drastischen Steigerung der Rotfluoreszenz-Charakteristika residenter Alveolarmakrophagen (*b*) versus (*a*). Die intratracheale Instillation von CCL2 induzierte eine massive Akkumulation von Monozyten und Lymphozyten im Alveolarraum der Mäuse, welche leicht von den PKH26-markierten rAMs unterschieden werden konnten (*c*). Inkubation der BAL-Zellen mit dem Monozyten-/Makrophagen-spezifischen Antikörper F4/80 (FITC-markiert) färbt alveolär rekrutierete Monozyten und residente Alveolarmakrophagen, jedoch nicht Lymphozyten (*d*) (100).

2.1.4 Generierung chimärer Wildtyp-Mäuse und chimärer CCR2-defizienter Mäuse

Um die Funktion CCR2-positiver zirkulierender Leukozyten versus residenter Alveolarmakrophagen in der CCL2 plus LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation zu differenzieren, wurden chimäre Wildtyp- bzw. chimäre CCR2-defiziente Mäuse mit der in *Tabelle I (Seite 27)* aufgelisteten CCR2-Expressionscharakteristik generiert. Hierfür wurden zunächst aus Spendermäusen (Wildtypmäuse bzw. CCR2-defiziente Mäuse) Knochenmarkstammzellen isoliert. Die Spender-Tiere wurden durch eine Überdosis Isofluran (Forene®) getötet und anschliessend in 70%iger Alkohollösung desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurden anschliessend Femur und Tibia beider Hinterläufe der Mäuse freipräpariert, im Kniegelenk exartikuliert und anschliessend der Knochenmarkskanal unter stereomikroskopischer Kontrolle mit 300 µl-Aliquots RPMI + 10% Mausserum mit einer 30 G Kanüle mehrfach gespült. Die Knochenmarkstammzellen wurden anschliessend in eine Einzelzellsuspension überführt, durch 70 µm und 40 µm Nylon-Siebe filtriert und in Leibovitz L15-Medium gewaschen. Die Ausbeute an Knochenmarkzellen pro Spendermaus betrug etwa $30 - 40 \times 10^6$ Knochenmarkzellen. Vor reziproker Knochenmarktransplantation von Wildtyp- bzw. CCR2-/- Knochenmarkstammzellen auf CCR2-/- bzw. Wildtypempfängermäuse wurden diese einer vollständigen myeloablativen Bestrahlung unterzogen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Empfängermäuse mit 12 Gy einer ^{60}Co Strahlenquelle bestrahlt, zur Reduktion gastrointestinaler Nebenwirkungen wurde die Gesamtdosis in zwei Einzeldosen (8 Gy und 4 Gy) im Abstand von 3 Stunden appliziert. Anschliessend erfolgte die Sedierung der Empfängermäuse mit Ketamin und die reziproke Knochenmarkstammzelltransplantation (1×10^7 unfraktionierte Knochenmarkstammzellen/Empfängermaus) in einem Gesamtvolumen von 150 µl Leibovitz L15-Medium per intravenöser Injektion über die laterale Schwanzvene mittels Omnican 30 Spritzen (29 G). Nach erfolgter Transplantation wurden die Empfängertiere für mindestens 3-4 Wochen unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF-Bedingungen, specific pathogen-free) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

2.1.5 Gemischte Knochenmarktransplantation

In weiteren experimentellen Ansätzen wurde die Frage untersucht, welchen Effekt eine partielle CCR2-Rekonstitution des hämatopoetischen Systems auf die Initiation und den Verlauf der LPS plus CCL2-induzierten pulmonalen Inflammation nimmt. Hierfür wurden CCR2-defiziente Mäuse letal bestrahlt und anschliessend einer gemischten Knochenmarktransplantation bestehend aus 75:25 bzw 50:50 Anteilen von CCR2-defizienten zu Wildtyp-Knochenmarkstammzellen zugeführt. Auch in diesen experimentellen Ansätzen wurden 1×10^7 Knochenmarkstammzellen/Maus in einem Gesamtvolumen von 150 μ l Leibovitz L15-Medium intravenös über die laterale Schwanzvene in CCR2-defiziente Empfängermause transplantiert.

2.1.6 Depletion residenter Alveolarmakrophagen mittels liposomalen Clodronates

Liposomal verkapseltes Clodronate zur Depletion residenter Alveolarmakrophagen wurde für die vorliegende Arbeit im Rahmen einer internationalen Kooperation von Prof. Dr. John W. Christman (Vanderbilt University, Nashville, USA) zur Verfügung gestellt. Liposomales Clodronate wurde hergestellt durch Vermischung von 8 mg Cholesterol mit 86 mg Ei-Phosphatidylcholin, gefolgt von Evaporisation der Chloroformphase unter Helium unter zu Hilfenahme eines Speedvac-Konzentrators. Zur Herstellung der Clodronate-Lösung wurden 1,2 g Dichloromethylen Diphosphorsäure in 5 ml sterilem PBS (phosphate-buffered saline) gelöst, 5 ml dieser Clodronate-Lösung zu den Liposomen hinzugefügt und gründlich vermischt. Diese Emulsion wurde bei 10.000 g und 4 °C für 1 Stunde ultrazentrifugiert. Die Liposomenpellets wurden abgenommen, in PBS resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert. Anschließend wurden die Liposomenpellets in 5 ml steriler PBS Lösung resuspendiert, bei 4 °C gelagert und binnen einer Woche verwendet (073). Intratracheal appliziertes liposomales Clodronate (100 μ l/Maus eine Stunde vor CCL2 plus LPS-Instillation) wird insbesondere durch die zur Phagozytose befähigten residenten Alveolarmakrophagen aufgenommen und führt aufgrund intrazellulärer Blockade des ATP-Soffwechsels in diesen Zellen zum induzierten Zelltod. Mit Hilfe dieser Technik ist eine ca. 85%ige Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools in Wildtyp-Mäusen induzierbar (073).

Die Eigenschaft liposomalen Clodronates zur Depletion residenter Alveolarmakrophagen wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um den residenten Alveolarmakrophagenpool CCR2-defizienter Mäuse zu depletieren und durch neueinströmende CCR2-positive Makrophagen zu ersetzen. Dieses Vorgehen erlaubt eine differentielle Analyse der Funktion der CCR2-Expression residenter Alveolarmakrophagen in der Entwicklung der CCR2 plus LPS induzierten akuten pulmonalen Inflammation in chimären CCR2-defizienten Mäusen.

2.1.7 Transfusion mononukleärer CCR2 +/- Zellen auf CCR2-defiziente Mäuse

Darüberhinaus wurde die Frage untersucht, welchen Effekt die Transfusion CCR2-positiver, mononukleärer Leukozyten in CCR2-defiziente Spendertiere hinsichtlich der CCL2 plus LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation hat. Zur Gewinnung mononukleärer Leukozyten von Wildtypspendertieren wurde in diesen zunächst eine transiente Neutropenie durch intraperitoneale Applikation des komplementbindenden anti-Gr-1-Antikörpers induziert. Hierfür wurden ca. 7,5 µg anti-Gr-1 in 100 µl PBS/0,1% Maus-Serum in den Peritonealraum von Empfänger-Wildtypmäusen injiziert. Ergebnisse früherer Untersuchungen zeigten, dass die intraperitoneale Injektion von anti-Gr-1 zu einer ca. 92%igen Reduktion der Neutrophilenzahl in Wildtypmäusen führt (073; 098). 24 Stunden nach Applikation von anti-Gr-1 wurden die transient neutropenen Wildtypmäuse mit Isofluran getötet und EDTA-Vollblut entnommen. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte mittels Ammoniumchloridlösung (NH₄CL 2 x 5 min). In der resultierenden Population mononukleärer Zellen konnte anhand von Pappenheim gefärbten Zytozentrifugen-Präparaten und durchflusszytometrischen Untersuchungen unter Verwendung von anti-Gr-1-Antikörpern und sekundär FITC-markierten anti-Ratte IgG die erfolgreiche Depletion der neutrophilen Granulozyten bestätigt werden; der Neutrophilenanteil in transient neutropenen Mäusen betrug < 2%.

Die so gewonnene mononukleäre Zellfraktion wurde anschließend zwei mal bei Raumtemperatur in RPMI + 10% FCS gewaschen und CCR2-defizienten Empfängermäusen ($1,5 \times 10^7$ mononukleäre Zellen/Maus) intravenös über die laterale Schwanzvene transfundiert. In Kontrollexperimenten wurde CCR2-defizienten

Kontrollmäusen entsprechend aufbereitete mononukleäre Zellpräparationen von CCR2-defizienten Spendertieren transfundiert. Etwa 15 Minuten nach erfolgter Transfusion von Wildtyp-mononukleären Spenderzellen in CCR2-defiziente Empfängermäuse wurden diese narkotisiert und einer intratrachealen Instillation von CCL2 plus LPS unterworfen.

2.1.8 Induktion der akuten pulmonalen Inflammation durch intratracheale Applikation von CCL2 plus LPS

Die Mäuse der verschiedenen experimentellen Gruppen wurden zunächst mit Rompun® und Ketamin narkotisiert und anschliessend in Rückenlage mittels Klebestreifen auf einer Korkunterlage fixiert und die Haut im Halsbereich rasiert. Nach Desinfektion erfolgte ein Längsschnitt der Haut mit sterilem Skalpell. Mit sterilen Pinzetten wurde anschliessend das Unterhautgewebe stumpf disseziert und die Trachea exponiert. Mit einer 23 G Kanüle wurde die Trachea ca. 3-4 Trachealspangen unterhalb des Kehlkopfes punktiert und ein Venenverweilkatheter (Abbocath, 26 G) in die Trachea vorgeschoben. Nach Entfernung des Kathetermandrins wurde erneut die korrekte Lage des Teflon-Katheters überprüft. Über diesen Katheter erfolgte nun unter stereomikroskopischer Kontrolle die intratracheale Instillation von CCL2 (50 µg/Maus) oder LPS (10 ng/Maus) bzw der Kombination aus CCL2 (50 µg/Maus) + LPS (10 ng/Maus). Die intratracheale Applikation der inflammatorischen Stimuli in die spontan atmende Maus erfolgte in 10 µl Aliquots unter Beachtung der Atmungsaktivität der Tiere. Das Gesamt-Applikationsvolumen betrug für CCL2 sowie für LPS bzw. CCL2 plus LPS 70-80 µl/Maus. Nach Beendigung der intratrachealen Instillation wurde der Venenverweilkatheter vorsichtig aus der Trachea entfernt, der Hautschnitt mit 2 Stichen (Vicryl 6.0) vernäht und die Wunde mit Softasept®-Lösung desinfiziert.

2.1.9 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Blutentnahme

Zur Charakterisierung der entzündlichen Leukozytenrekrutierung in das alveoläre Kompartiment wurden die Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen einer bronchoalveolären Lavage (BAL) unterzogen. Nach Tötung der Tiere mit einer Überdosis Isofluran wurde die Hautnaht über der Trachea mittels einer Mikropräparierschere entfernt und das darunterliegende Gewebe stumpf disseziert. Die freigelegte Trachea wurde zwischen zwei Knorpelspangen mittels Mikropräparierschere

quer eingeschnitten und eine gekürzte 20 G-Kanüle in der Trachea mit Hilfe eines Vicryl-Fadens (4.0) fixiert. Die bronchoalveoläre Lavage wurde anschliessend mit kalter, steriler PBS/EDTA- Lösung (1 mM EDTA, pH-Wert 7,2) durchgeführt. Mit Hilfe einer Omnifix 100 Spritze wurden aufsteigende Flüssigkeitsmengen an PBS/EDTA-Lösung in die Lunge instilliert (0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml) und anschliessend wieder aspiriert, bis ein Gesamtvolumen von 1,5 ml BAL-Flüssigkeit resultierte. Anschliessend wurde die bronchoalveoläre Lavage bis zu einem Gesamtvolumen von ca. 6 ml BAL-Flüssigkeit fortgesetzt. Beide Lavage-Aliquots (1,5 ml und 4,5 ml) wurden anschliessend bei 1400 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die zellfreien Überstände des 1,5 ml-BAL-Aliquots dienten zur Bestimmung proinflammatorischer Zytokine und wurden in Aliquots á 500 µl bei -80 °C zur späteren Zytokinbestimmung eingefroren. Die Zellzahl der BAL-Flüssigkeit wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Mit Hilfe von Pappenheim gefärbten Zytozentrifugen-Präparaten erfolgte anschließend die zelluläre Differenzierung der in der BAL-Flüssigkeit enthaltenen Leukozytenpopulationen. Hierfür wurden 10^5 BAL-Zellen in 100 µl PBS mit Hilfe einer Zytozentrifuge 5 min bei 500 rpm auf vertikal montierte Objektträger zentrifugiert, luftgetrocknet und 10 min in May-Grünwald- (Eosin-Methylenblau-) Lösung fixiert und anschliessend 5 min in Giemsa- (Azur-Eosin-Mehylenblau)- Lösung (10% v/v in Aqua dest.) angefärbt (Pappenheim-Färbung). Unter dem Mikroskop (Leitz, 400-fache Vergrößerung) erfolgte die Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen, insbesondere die Ermittlung des Anteils an polymorphkernigen Neutrophilen.

Zur Blutentnahme wurden die Versuchstiere durch eine Überdosis Isofluran getötet und mit Hilfe einer Mikropräparierschere und feinen Pinzetten die Bauchhöhle eröffnet. Unter stereomikroskopischer Kontrolle erfolgte die Punktion der Vena cava inferior mittels einer 23 G Kanüle und einer Omnifix 100 Spritze. Typischerweise konnte pro Versuchstier ein durchschnittliches Blutvolumen von 0,7 bis 0,9 ml venöses Blut gewonnen werden. Die Blutproben wurden antikoaguliert, in 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und anschliessend zur durchflusszytometrischen Analyse der CCR2 – und F4/80- bzw GR1- Expression einer Immunfluoreszenz-Markierung unterworfen. Hierfür wurde das antikoagulierte Blut durch Zugabe von 10 ml Ammoniumchloridlösung einer

Erythrozytolyse für die Dauer von 5 min bei Raumtemperatur unterworfen, anschliessend 9 min bei 1400 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet anschliessend in 0,5 ml PBS mit 10% FCS (foetales Kälberserum) resuspendiert und auf Eis inkubiert.

2.1.10 Prinzip der Durchflußzytometrie und Immunfluoreszenz

Zur Diskriminierung der verschiedenen Leukozytenpopulationen in Blut und BAL-Flüssigkeit der Mäuse der verschiedenen Versuchstiergruppen wurde in der vorliegenden Arbeit die Zwei-Farben-Durchflusszytometrie verwendet. Hierbei wird die Zellsuspension mittels Pressluft durch eine dünne Kapillare geführt. Der so entstandene feine Strom (Probestrom) wird von einem Hüllstrom aus entgastem Wasser umgeben, welcher eine höhere Flussgeschwindigkeit besitzt als der Probestrom. Die so entstandene Flussdynamik erzeugt eine laminare Strömung, in der die enthaltenen Zellen hintereinander perlschnurartig aufgereiht und in Längsrichtung ausgerichtet werden. Nach dieser „hydrodynamischen“ Fokussierung treten die Zellen einzeln durch den Fokus eines Laserstrahls, wobei die hierbei durch die einzelnen Zellen verursachte Laserlicht-Streuung in Vorwärtsrichtung (Forwardscatter; FSC) und in Seitwärtsrichtung (Sidescatter; SSC) registriert wird. Je nach Zellart ergeben sich hierbei zellpopulationsspezifische Unterschiede hinsichtlich Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, welche mit der Zellgröße (FSC) bzw der zellulären Granularität (SSC) der analysierten Partikel korrelieren. Über diese Forwardscatter- und Sidescatter-Charakteristika läßt sich eine Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie erreichen. Über die reine durchflusszytometrische Analytik der Lichtstreuungsparameter hinaus können weitere Fluoreszenzcharakteristika zu analysierender Zellpopulationen erfasst werden. Man unterscheidet grundsätzlich die endogene Autofluoreszenz von der exogenen Fluoreszenz, welche durch Bindung Fluorochrom-markierter Antikörper an die entsprechenden Antigenstrukturen der Zelloberfläche den einzelnen Populationen spezifische Fluoreszenz-Emissions-Charakteristika verleihen. Diese Fluoreszenzlicht-Emissions-Charakteristika werden im Fluoreszenz 1-Kanal (FL 1, Grünfluoreszenz, 535 nm) und dem Fluoreszenz 2- Kanal (FL 2, Rotfluoreszenz, 575 nm) nach Amplifikation des Fluoreszenz-Signals in sogenannten Sekundärelektronenvervielfachern (Photomultiplier) quantitativ erfasst und

dargestellt. Die aus der durchflusszytometrischen Analyse resultierenden Streulicht- sowie Fluoreszenzsignale werden in zweiparametrischen Dot-Plot-Diagrammen dargestellt. Hierbei werden bei Betrachtung der Streuung Forwardscatter gegen Sidescatter und bei Betrachtung der Fluoreszenzen FL 1 versus FL 2 dargestellt.

2.1.11 Durchflußzytometrische Analyse der CCR2 und F4/80-Expression auf peripheren Blutmonozyten und residenten Alveolarmakrophagen bzw der CCR2- und Gr-1-Expression der peripheren neutrophilen Granulozyten

Zur Analyse der Expression des Monozyten-/ Makrophagenspezifischen Markers F4/80 bzw des CCR2-Rezeptors auf der Oberfläche von peripheren Blutmonozyten wurde ein 2-Farben-Immunfluoreszenzansatz verwendet. Hierfür wurden Zell-Aliquots (1×10^6 Zellen/100 μ l) in flexible Mikrotiter-Platten (BD Biosciences) pipettiert und anschliessend mit Fc-Block zur Blockade unspezifischer Bindungen via Fc-IgG-Rezeptoren auf der Monozytenoberfläche vorinkubiert. Anschliessend wurden 50 μ l eines 1:500 verdünnten anti-CCR2-Antikörpers (Klon MC-21) (081) in die wells pipettiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellsuspension wurden die Zellen mit 20 μ l eines 1:1250 verdünnten biotinylierten F(ab')₂-Fragments eines Ziege anti Ratte Ig Antikörpers für 30 min auf Eis inkubiert, gewaschen und mit 5 μ l Phycoerythrin (PE)- konjugiertem Streptavidin in Anwesenheit von 20 μ l eines 1:10 verdünnten FITC-konjugierten anti-F4/80-Antikörpers für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Markierung wurden die Zellen zweimal gewaschen und der durchflusszytometrischen Analyse der F4/80- bzw CCR2- Expression unterworfen.

Zur Analyse der Expression des PMN-spezifischen Markers Gr-1 bzw des CCR2-Rezeptors auf der Oberfläche von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten wurde analog verfahren, lediglich wurde statt dem FITC-konjugierten anti-F4/80-Antikörper ein 1:100 verdünnter FITC-konjugierter Anti-Gr-1-Antikörper verwendet.

Die Analyse der F4/80- bzw CCR2- Expression auf residenten Alveolarmakrophagen der verschiedenen Behandlungsgruppen erfolgte aufgrund der hohen Autofluoreszenz dieser Zellpopulation im FL 1-Kanal (grüne Autofluoreszenz der Alveolarmakrophagen) mittels Einfarbenfluoreszenz mit Hilfe Phycoerythrin (PE)-

markierter Antikörper. Hierfür wurden ca. 200.000 – 500.000 Alveolarmakrophagen pro well mit Fc-Block zur unspezifischen Blockade der Fc-IgG-Rezeptoren auf der Oberfläche der residenten Alveolarmakrophagen vorinkubiert und zur Detektion der CCR2- Expression mit 50 µl eines 1:500 verdünnten anti-CCR2-Antikörpers inkubiert. Für die Analyse der F4/80-Expression wurden 20 µl eines unverdünnten anti-F4/80-Antikörpers pro well pipetiert. Nach Inkubation von 30 min bei 4 °C auf Eis wurden die Zellen gewaschen und anschliessend mit einem PE-markierten F(ab')₂-Fragment eines Kaninchen anti Ratte Ig Antikörpers in einer 1:20 Verdünnung für 30 min auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen zweimal in PBS + 5% Mausserum gewaschen und der durchflusszytometrischen Analyse unterworfen.

Die Analyse der F4/80- und CCR2- Expression auf peripheren Blutmonozyten und residenten Alveolarmakrophagen bzw. der Gr-1-und CCR2-Expression auf polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten wurde mit einem FACStar^{PLUS} Durchflußzytometer durchgeführt, welches mit einem Argonionen-Laser ausgestattet ist. Der Argonionen-Laser wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einem Laser-output von 200 mW betrieben. Das optische System des Durchflußzytometers wurde täglich mittels standardisierter, fluoreszierender Kalibrierbeads justiert.

Die F4/80- und CCR2- Expression residenter Alveolarmakrophagen wurde in der Einfarben-Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurden die residenten Alveolarmakrophagen zunächst über ihre Forwardscatter (FSC) versus Sidescatter (SSC)- Charakteristika „ge-gated“ und anschliessend erfolgte die Analyse der F4/80- bzw CCR2- Expression im Fluoreszenzkanal 2 (FL2, F488/575).

Die Analyse der CCR2-Expression auf peripheren Blutmonozyten erfolgte mittels Zweifarben-Fluoreszenz. Zunächst wurden die peripheren Blutmonozyten anhand ihrer FSC-Charakteristika versus ihrer F4/80-FITC-Fluoreszenz-Markierung gated und anschließend die CCR2-Expression im FL 2-Kanal (CCR2-PE; F488/575) analysiert. Analog wurde mit polymorphkernigen Neutrophilen verfahren.

2.1.12 Quantifizierung der Zellen in der BAL-Flüssigkeit

Zur Berechnung der absoluten Zahlen der in den Versuchen gewonnenen Zellen wurden die anhand von Zytozentrifugenpräparaten ermittelten prozentualen Anteile von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bzw. die mittels FACS ermittelten prozentualen Anteile von Monozyten und Makrophagen mit der Gesamtzellzahl (Neubauer Zählkammer) multipliziert.

2.1.13 Bestimmung der TNF α -Konzentration in der BAL

Die Quantifizierung der TNF- α -Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Mäusen der verschiedenen Versuchsgruppen erfolgte in Doppelbestimmung mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits (enzyme-linked immunosorbent assay) unter Beachtung der Herstellerangaben. Die Absorptionsmessung erfolgte hierbei bei 500 nm unter Verwendung eines ELISA-Plattenphotometers (Molecular Dynamics). Die untere bzw. obere Nachweisgrenze für TNF α lag bei 5 pg bzw 1000 pg/ml BAL-Flüssigkeit.

2.1.14 Statistik

Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert \pm SEM. 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 Experimentelle Gruppen

Die Funktion CCR2-positiver zirkulierender Blutmonozyten versus residenter Alveolarmakrophagen in der CCL2 + LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation der Maus wurde in der vorliegenden Arbeit in sechs verschiedenen Behandlungsgruppen evaluiert, welche in *Tabelle I (Seite 27)* zusammengefasst sind.

Untersuchungen wurden durchgeführt in

Gruppe 1: Wildtypmäusen (WT)

Gruppe 2: CCR2-defizienten Mäusen

Gruppe 3: chimären Wildtypmäusen

(mit CCR2^{-/-}-Knochenmarkstammzellen rekonstituierte, letal bestrahlte Wildtypmäuse)

Gruppe 4: chimären CCR2-defizienten Mäusen

(mit Wildtyp-Knochenmarkstammzellen rekonstituierte, letal bestrahlte CCR2-defiziente Mäuse)

Gruppe 5: chimären CCR2-defizienten Mäusen nach Clodronate-induzierter Repopulierung des Alveolarraums mit CCR2-positiven Alveolarmakrophagen.

Gruppe 6: in CCR2-defizienten Mäusen nach Transfusion mononukleärer Wildtypzellen aus dem peripheren Blut.

Die Mäuse erhielten eine intratracheale Instillation entweder mit CCL2 alleine (50 µg rekombinantes murines CCL2/Maus), oder LPS alleine (10 ng LPS/Maus) oder aber CCL2 (50 µg rekombinantes murines CCL2/Maus) plus LPS (10 ng LPS/Maus) (101).

Tabelle I:

Behandlungsregime und CCR2-Expressionsprofil der experimentellen Gruppen

Gruppe	Behandlungsregime	Bezeichnung (und CCR2- Expressionsprofil)
1) Wildtypmäuse	-	WT (CCR2 positive Zirkulation + CCR2 positive Peripherie)
2) CCR2-defiziente Mäuse	-	CCR2 defizient (CCR2 negative Zirkulation + CCR2-defiziente Peripherie)
3) CCR2-defiziente Mäuse, WT transplantiert	letale Bestrahlung, Rekonstitution mit WT Knochenmarkstammzellen	CCR2-defiziente Chimären (CCR2 positive Zirkulation + CCR2-defiziente Peripherie)
4) WT-Mäuse, CCR2 defizient transplantiert	letale Bestrahlung, Rekonstitution mit CCR2- defizienten Knochenmarkstammzellen	WT-Chimären (CCR2-defiziente Zirkulation + CCR2 positive Peripherie)
5) CCR2-defiziente Mäuse, WT transplantiert, Repopulierung des alveolären Makrophagenpools	siehe Nr. 3) und Behandlung mit liposomalem Clodronate	CCR2-defiziente Chimären/ rAM CCR2 +/+
6) CCR2-defiziente Mäuse nach Transfusion WT- mononukleärer Zellen	Transfusion gereinigter mononukleärer Zellen aus peripherem Blut von WT- Mäusen in CCR2-defiziente Mäuse	CCR2-defiziente Mäuse/ periphere Blutmonozyten CCR2 +/+

3.2 Analyse der CCR2-Expression zirkulierender Blutmonozyten in den verschiedenen Versuchsgruppen

Die durchflusszytometrische Analyse der CCR2-Expression auf der Zelloberfläche F4/80-positiver zirkulierender Blutmonozyten unbehandelter WT-Mäuse ergab ein homogenes Expressionsprofil, wie in *Abbildung 3a* dargestellt. Demgegenüber zeigten F4/80-positive zirkulierende Blutmonozyten CCR2-defizienter Mäuse wie erwartet keine Reaktivität mit dem spezifischen anti-CCR2-Antikörper MC 21 (*Abbildung 3b*). Kontrastierend hierzu zeigten chimäre CCR2-defiziente Mäuse, welche nach letaler Bestrahlung mit Knochenmark von Wildtypmäusen rekonstituiert wurden, eine homogene CCR2-Expression ihrer zirkulierenden Blutmonozyten (*Abbildung 3c*), welches zugleich eine „Engraftment-Effizienz“ von ca. 96% dokumentiert (*Abbildung 3e*). Diese Daten zeigen, dass nach myeloablativer Bestrahlung mit einer ^{60}Co -Quelle ein fast vollständiger Austausch der Monopoese von Empfängermäusen durch die Monopoese entsprechender Spendertiere erreicht wurde.

Passend hierzu zeigten bestrahlte Wildtypmäuse nach Rekonstitution mit CCR2-defizientem Knochenmark einen fast ebenso vollständigen Austausch der CCR2-positiven Monopoese durch CCR2-negative Spendermonozyten. *Abbildung 3d und Tabelle 3e* zeigen, dass in chimären Wildtypmäusen der Anteil F4/80 positiver zirkulierender Blutmonozyten, welche zugleich eine CCR2-Expression aufweisen, bei lediglich 4% lag und somit eine ca. 96%ige „engraftment-Effizienz“ erreicht wurde.

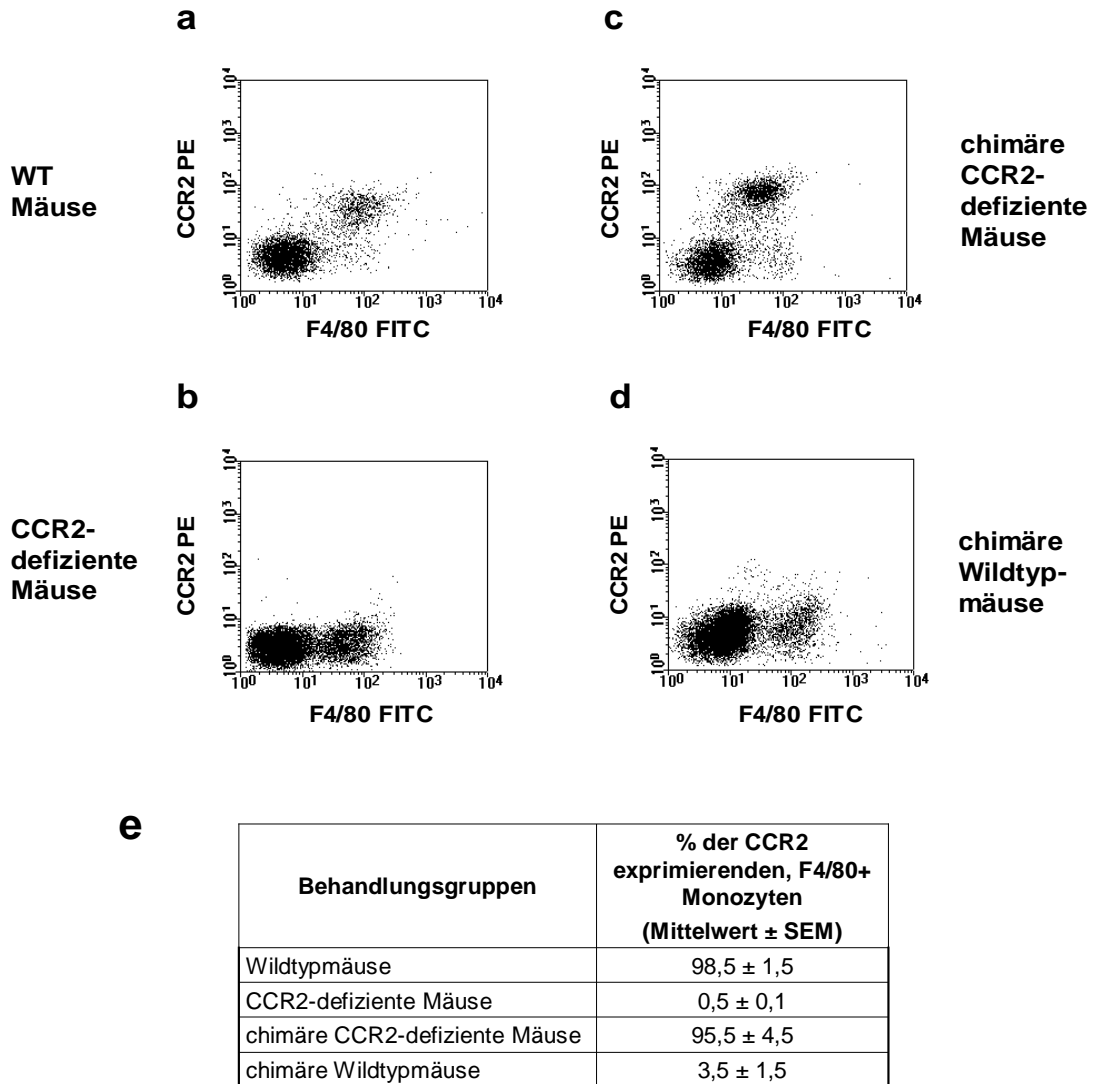


Abbildung 3. Durchflusszytometrische Analyse der CCR2-Expression auf peripheren Blutmonozyten in den verschiedenen experimentellen Gruppen. Monozyten von WT Mäusen (a), CCR2-defizienten Mäusen (b), chimären CCR2-defizienten Mäusen (c) oder chimären Wildtypmäusen (d) wurden einer durchflusszytometrischen Analyse der F4/80- und CCR2-Expression unterworfen. Die Dot-Plots zeigen eine homogene F4/80-Expression (erhöhte FITC Fluoreszenz 1 Emission; F4/80 FITC; x-Achse) und CCR2-Expression (erhöhte PE Fluoreszenz 2 Emission; CCR2 PE; y-Achse) auf zirkulierenden Monozyten von WT Mäusen (a) oder chimären CCR2-defizienten Mäusen (c), wogegen Monozyten von CCR2-defizienten Mäusen (b) und chimären Wildtypmäusen (d) eine homogene F4/80-Expression, aber keine CCR2-Expression zeigen. Die Tabelle (e) zeigt den durchschnittlichen Prozentsatz der CCR2-exprimierenden, F4/80-positiven Blutmonozyten der verschiedenen experimentellen Gruppen (n = 5 je Gruppe).

3.3 Evaluierung der Leukozytenrekrutierungsprofile in den verschiedenen Behandlungsgruppen

3.3.1 Monozytenrekrutierungsprofile in den verschiedenen Behandlungsgruppen

Um die Frage zu klären, welche Rolle CCR2-positive Monozyten in der alveolären Neutrophilenrekrutierung unter nichtentzündlichen versus akut entzündlichen Bedingungen spielen, erhielten Wildtypmäuse, CCR2-defiziente Mäusen, sowie chimäre CCR2-defiziente Mäuse und chimäre Wildtypmäuse eine intratracheale Instillation von CCL2 oder LPS oder CCL2 plus LPS.

Die Instillation von CCL2 zeigte in Wildtypmäusen eine verzögerte alveoläre Monozytenrekrutierung mit einem Akkumulationsmaximum 48 Stunden post intratrachealer CCL2-Instillation (*Abbildung 4a*). Im Gegensatz dazu zeigten CCR2-defiziente Mäuse ein vollständiges Fehlen der CCL2-induzierten alveolären Monozytenrekrutierung während des gesamten Beobachtungszeitraums von 48 Stunden. Die Rekonstitution CCR2-defizienter Mäuse mit Wildtypknochenmark (chimäre CCR2-defiziente Mäuse) zeigte eine im Vergleich zur Monozytenrekrutierung in CCR2-defizienten Mäusen fast vollständig wiederhergestellte Monozytenrekrutierung in den Alveolarraum nach intratrachealer Instillation von CCL2. Die Gesamtzellzahl alveolär rekrutierter Monozyten entsprach in dieser Behandlungsgruppe weitestgehend den auch in Wildtypmäusen beobachteten Werten. Demgegenüber zeigten Wildtypmäuse, welche mit CCR2-defizientem Knochenmark rekonstituiert wurden (chimäre Wildtypmäuse) eine fast vollständig fehlende alveoläre Monozytenrekrutierung auf intratracheale CCL2-Applikation (*Abbildung 4a*). Diese Untersuchungen belegen die Notwendigkeit der CCR2-Expression auf zirkulierenden Blutmonozyten zur CCL2-abhängigen Rekrutierung in das alveoläre Kompartiment. Ganz ähnliche Versuchsergebnisse lieferte die Behandlung der verschiedenen experimentellen Versuchstiergruppen nach intratrachealer Applikation von CCL2 plus LPS (*Abbildung 4b*). Wildtypmäuse zeigten auf intratracheale Ko-Applikation von CCL2 plus LPS eine gesteigerte alveoläre Monozytenakkumulation mit einem Maximum nach 48 Stunden post Instillation, während CCR2-defiziente Mäuse eine vollständig attenuierte alveoläre Monozytenrekrutierung auf CCL2 plus LPS Co-Applikation zeigten. Demgegenüber

fand sich bei CCR2-defizienten Mäusen, welche mit Wildtypknochenmark rekonstituiert wurden, eine fast vollständig wiederhergestellte alveoläre Monozytenrekrutierung, welche zumindest bis zum 24-Stunden-Zeitpunkt post intratrachealer Instillation diejenigen Monozytenrekrutierungswerte erreichte, welche in Wildtypmäusen beobachtet wurden. Kongruent hierzu zeigten chimäre Wildtyp Mäuse nach Rekonstitution mit CCR2-defizienten Knochenmarkstammzellen eine vollständig attenuierte alveoläre Monozytenakkummulierung (*Abbildung 4b*). Korrespondierend zu Ergebnissen der alleinigen CCL2-Applikation zeigen diese Untersuchungen, dass auch die gesteigerte Monozytenrekrutierung nach Applikation von CCL2 plus LPS strikt CCR2-abhängig ist. Der durch intra-alveoläre Deposition des CCL2-Chemokins etablierte Chemokingradient treibt die alveoläre Monozytenrekrutierung, sowohl unter nicht entzündlichen Bedingungen (CCL2), als auch unter akut entzündlichen Bedingungen (CCL2 plus LPS) an.

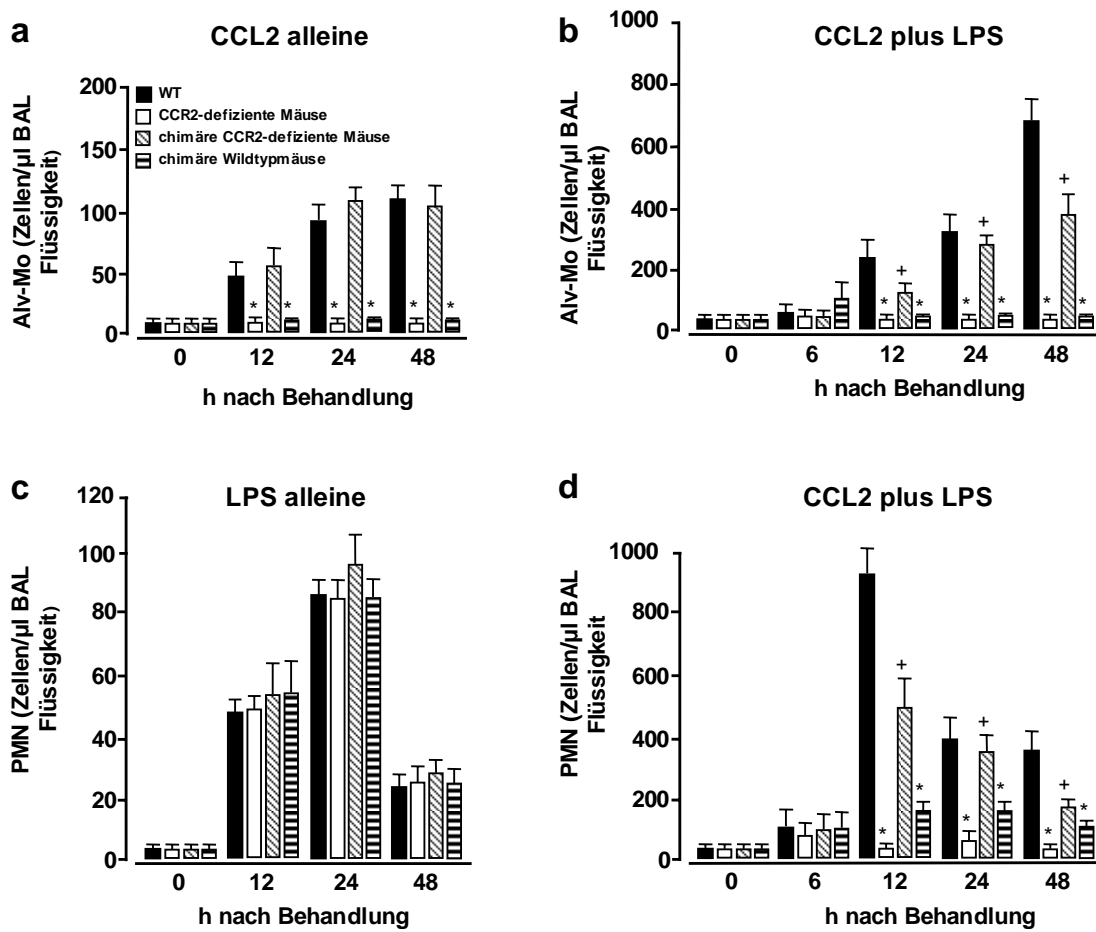


Abbildung 4. Der koordinierte alveoläre Neutrophilen- und Monozyteneinstrom ist von der CCR2-Expression zirkulierender Zellen des hämatopoetischen Systems abhängig. *a* und *b*: alveoläre Monozytenakkumulation in WT Mäusen, CCR2-defizienten Mäusen, chimäre CCR2-defizienten Mäusen oder chimären Wildtypmäusen nach alveolärer CCL2 (*a*) oder kombinierter CCL2 plus LPS (*b*) Applikation. *c* und *d*: alveoläre Neutrophilenakkumulation in WT Mäusen, CCR2-defizienten Mäusen, CCR2-defizienten chimären Mäusen oder WT chimären Mäusen nach alveolärer LPS (*c*) oder kombinierter CCL2 plus LPS (*d*) Applikation. *, $p < 0,05$ vs WT; +, $p < 0,05$ vs CCR2-defizient; Mittelwert \pm SEM ($n = 5$)

3.3.2 Alveoläre Neutrophilenrekrutierung in den verschiedenen Behandlungsgruppen

Im Gegensatz zu den deutlichen Unterschieden bezüglich der Monozytenrekrutierung in den verschiedenen Behandlungsgruppen nach CCL2-Applikation alleine bzw. kombinierter CCL2 plus LPS Applikation zeigten alle Behandlungsgruppen auf LPS-Applikation alleine eine vergleichbare alveoläre Neutrophilenrekrutierungsrate (*Abbildung 4c*). Diese Daten zeigen, dass die differentielle Expression von CCR2 auf zirkulierenden Zellen versus residenten Zellen des Alveolarraums die LPS-induzierte Neutrophilenrekrutierung nicht beeinflusst.

Die kombinierte Gabe von LPS plus CCL2 sorgte für eine drastische Steigerung der Neutrophilenakkumulation in Wildtypmäusen mit einem deutlichen Maximum 12 Stunden nach Stimulation (*Abbildung 4d*), obwohl Neutrophile selbst kein CCR2 exprimieren (*Abbildung 5*). Demgegenüber zeigten sowohl CCR2-defiziente Mäuse als auch chimäre Wildtyp Mäuse, welche ebenfalls ein CCR2-defizientes hämatopoetisches System aufweisen, nach intratrachealer CCL2 plus LPS-Applikation eine fast vollständig attenuierte alveoläre Neutrophilenrekrutierung. Passend zu den Befunden in Wildtypmäusen zeigten chimäre CCR2-defiziente Mäuse nach Rekonstitution mit Wildtyp-Knochenmarkstammzellen eine weitestgehend wiederhergestellte alveoläre Neutrophilenrekrutierung auf CCL2 plus LPS-Applikation, welche nach 12 bis 24 Stunden post Instillation ihr Maximum erreichte. Diese Daten zeigen, dass das Fehlen der CCR2-Expression auf Monozyten nicht nur mit einer zu erwartenden signifikanten Reduktion der alveolären Monozytenrekrutierung einhergeht, sondern zugleich begleitet wird durch eine signifikante Reduktion der alveolären Neutrophilenrekrutierung nach LPS plus CCL2-Applikation. Parallel hierzu lässt sich feststellen, dass die Rekonstitution der CCR2-Expression im hämatopoetischen System nicht nur mit einer Steigerung der alveolären Monozytenrekrutierung, sondern überraschenderweise auch mit einer Zunahme der alveolären Neutrophilenrekrutierung auf CCL2 plus LPS assoziiert ist. Diese Daten stützen somit die Hypothese, dass knochenmarkstämmige CCR2-exprimierende Zellen des hämatopoetischen Systems den alveolären Neutrophileninflux auf intratracheale CCL2 plus LPS-Applikation regulieren.

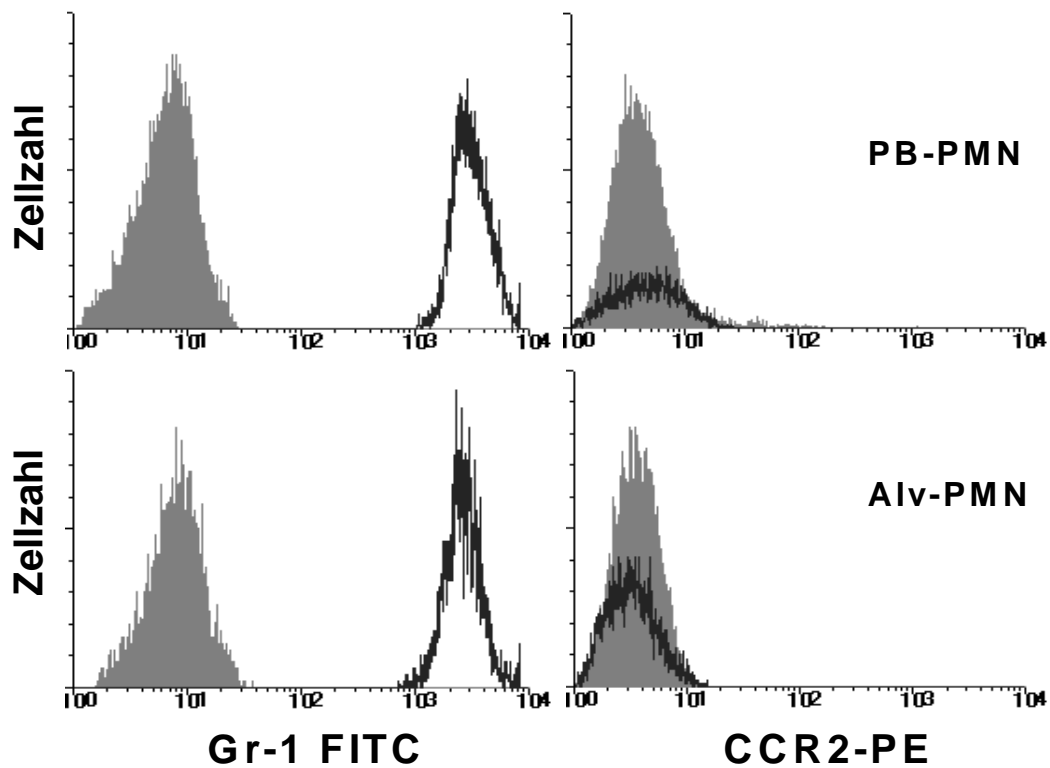


Abbildung 5. Durchflußzytometrische Analyse der CCR2-Expression GR-1-positiver zirkulierender bzw alveolär rekrutierter neutrophiler Granulozyten. Wildtypmäuse wurden mit CCL2 plus LPS intratracheal behandelt und nach 24 Stunden einer bronchoalveolären Lavage unterzogen. In der BAL-Flüssigkeit enthaltene neutrophile Granulozyten wurden anschließend einer Gr-1 FITC plus CCR2-PE-Oberflächenantigenexpressionsanalyse unterworfen. *Die Histogramme auf der linken Seite zeigen die Gr-1-Expression (weißes Histogramm mit erhöhter Fluoreszenz-1-Emission; Gr-1 FITC) von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten (PB-PMN) und alveolär rekrutierten neutrophilen Granulozyten (Alv-PMN). Sowohl zirkulierende wie alveolär rekrutierte neutrophile Granulozyten zeigen keine CCR2-Expression (dunkle Linie in den Histogrammen auf der rechten Seite) verglichen mit der Negativkontrolle (graue Histogramme).*

3.4 Funktion residenter Alveolarmakrophagen in der CCL2 plus LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation

Kürzlich durchgeführte durchflußzytometrische und histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass der CCL2-Rezeptor CCR2 auch auf Alveolarmakrophagen von Wildtypmäusen exprimiert ist (073). Diese Daten legen nahe, dass diese residenten Phagozyten der Lunge ebenfalls aktiv am Entzündungsgeschehen nach intratrachealer Applikation von CCL2 plus LPS beteiligt sein könnten. Um die Rolle residenter Alveolarmakrophagen bei der CCL2 plus LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation genauer zu evaluieren, wurden chimäre CCR2-defiziente Mäuse mit liposomalem Clodronate vorbehandelt. Clodronate induziert nach Phagozytose durch residente Alveolarmakrophagen eine Blockade des ATP-Stoffwechsels in diesen Zellen, wodurch der apoptotische Zelltod ausgelöst wird. Mit Hilfe dieses Werkzeugs ist es damit möglich den residenten Alveolarmakrophagenpool in den Lungen von Mäusen selektiv zu depletieren. Dieser experimentelle Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, um zu klären, welchen Effekt eine mittels liposomalen Clodronates induzierte Repopulierung des Alveolarraums chimärer CCR2-defizienter Mäuse durch CCR2-positive Spender-Blutmonozyten mit anschließender Differenzierung zu CCR2-positiven, residenten Alveolarmakrophagen im Vergleich zu chimären CCR2-defizienten Mäusen (ohne Repopulierung des Alveolarraums mit CCR2-positiven Alveolarmakrophagen) auf die Induktion der CCL2 plus LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation hat.

Residente Alveolarmakrophagen chimärer Wildtypmäuse zeigten in der durchflußzytometrischen Analyse ein homogenes CCR2-Expressionsmuster (*Abbildung 6a*), welches in chimären CCR2-defizienten Mäusen ohne Clodronate-Vorbehandlung nicht detektiert werden konnte (*Abbildung 6b*). Demgegenüber zeigten Alveolarmakrophagen chimärer CCR2-defizienter Mäuse nach Vorbehandlung mit Clodronate und Repopulierung durch Spenderzellen eine homogene CCR2-Expression ihrer residenten Alveolarmakrophagenpopulation (*Abbildung 6c*). Diese Daten zeigen, dass die Clodronate-Applikation in chimären CCR2-defizienten Mäusen zu einem vollständigen Austausch der residenten CCR2-negativen Alveolarmakrophagen durch CCR2-positive Spendermakrophagen führte. In der vergleichenden Analyse der

alveolären Neutrophilen- und Monozytenrekrutierung in chimären CCR2-defizienten Mäusen mit und ohne Clodronate-Vorbehandlung zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich sowohl der alveolären Monozytenrekrutierung als auch der alveolären Neutrophilenrekrutierung (Abbildung 7). Hieraus kann geschlossen werden, dass die CCR2-Expression residenter Alveolarmakrophagen für die CCL2 plus LPS-induzierte alveoläre Neutrophilen- und Monozytenrekurtierung ohne Relevanz ist.

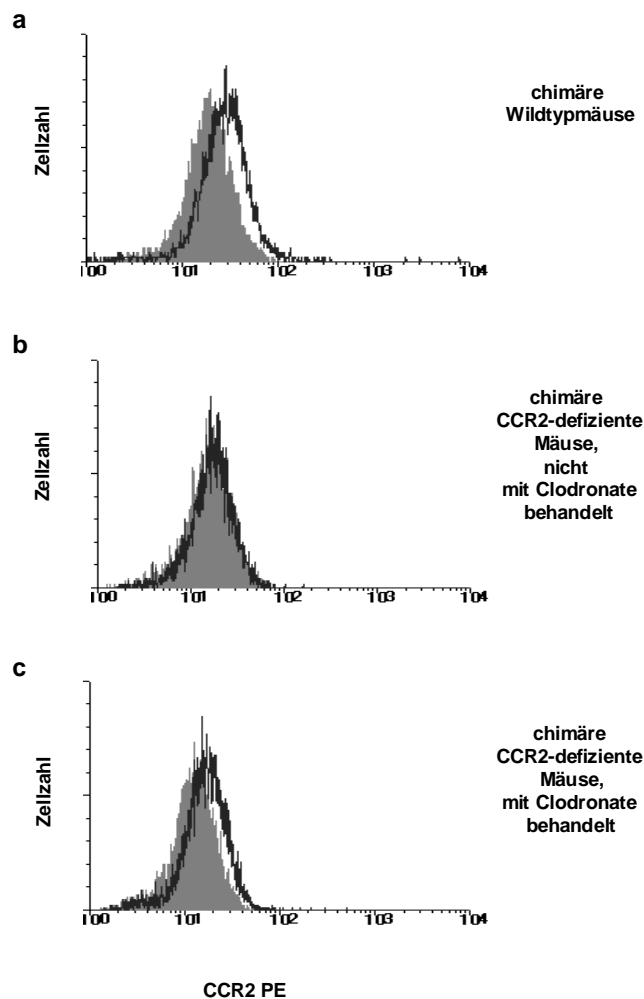


Abbildung 6. Analyse der CCR2 Expression alveolärer Makrophagen der verschiedenen Behandlungsgruppen. Residente Alveolarmakrophagen von chimären Wildtypmäusen (a) bzw. chimären CCR2-defizienten Mäusen ohne (b) bzw. mit Clodronate Vorbehandlung (c) wurden einer durchflusszytometrischen Analyse ihrer CCR2-Expression unterworfen. Die offenen Histogramme in a-c zeigen die CCR2-PE-Fluoreszenz-Charakteristik der rAM der jeweiligen Behandlungsgruppe. Die ausgefüllten Histogramme in a-c zeigen Negativkontrollen.

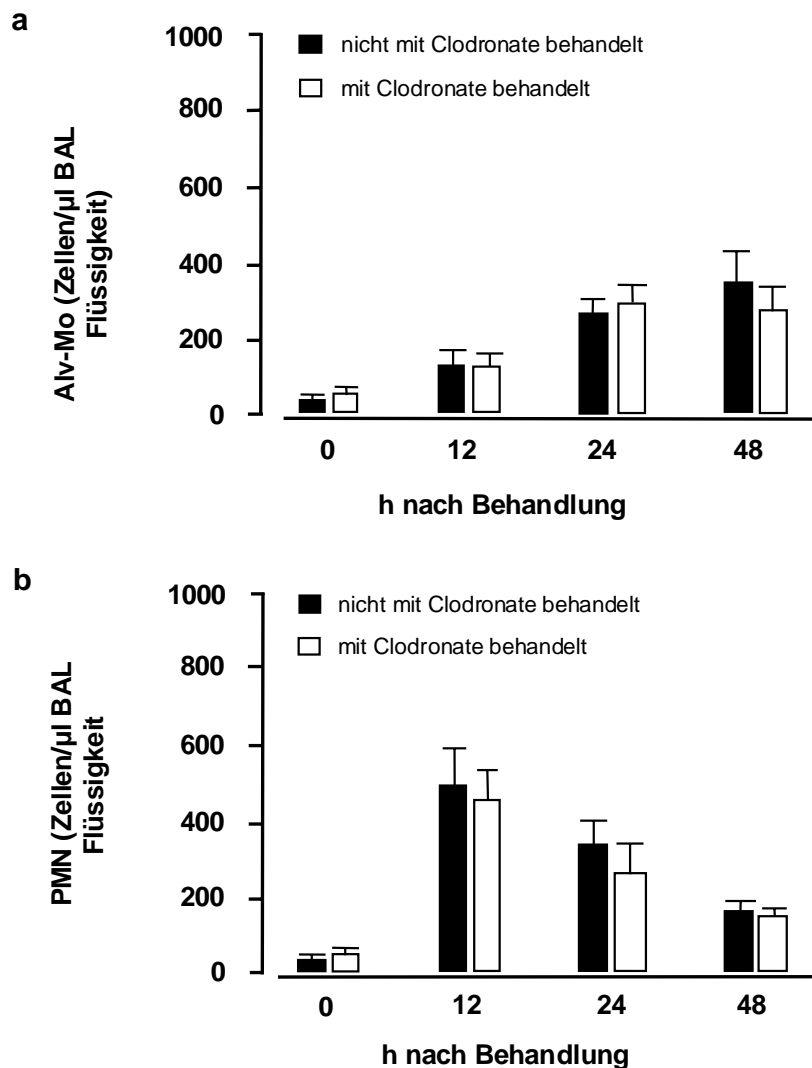


Abbildung 7. Pulmonale Leukozyten-Rekrutierungsprofile in chimären CCR2-defizienten Mäusen ohne und mit Clodronate Vorbehandlung. Die ausgefüllten Histogrammbalken in *a* und *b* repräsentieren die alveoläre Monozyten- und Neutrophilenakkumulation in chimären CCR2-defizienten Mäusen ohne Clodronate Vorbehandlung nach CCL2 plus LPS-Applikation. Die offenen Histogrammbalken in *a* und *b* zeigen den alveolären Monozyten- und Neutrophileneinstrom in chimären CCR2-defizienten Mäusen nach Clodronate-Vorbehandlung und konsekutiver CCL2 plus LPS-Applikation.

3.5 Rolle der CCR2-Expression residenter Alveolarmakrophagen in der CCL2 plus LPS-induzierten intra-alveolären TNF α - Produktion

In den bisher dargestellten Experimenten wurde gezeigt, daß residente Alveolarmakrophagen von sowohl Wildtypmäusen als auch chimären Wildtypmäusen nach Rekonstitution mit CCR2-defizientem Knochenmark eine homogene CCR2-Expression aufweisen. Somit sollte bei vergleichbarer CCR2-Expression auf residenten Alveolarmakrophagen von Wildtypmäusen und chimären Wildtypmäusen die durch CCL2 plus LPS-induzierte initiale Liberierung endogener proinflammatorischer Mediatoren wie TNF α im alveolären Kompartiment dieser Mäuse in vergleichbarem Umfang stattfinden. Diese Hypothese wurde überprüft, indem Wildtypmäuse und chimäre Wildtypmäuse intratracheal CCL2 plus LPS instilliert bekamen und 6 Stunden nach intratrachealer Applikation die TNF α -Zytokinkonzentration in der BAL-Flüssigkeit dieser Mäuse mittels ELISA analysiert wurde. Tatsächlich zeigten beide Gruppen auf kombinierte CCL2 plus LPS-Applikation eine vergleichbare TNF α -Produktion. Sowohl in unbehandelten Wildtypmäusen als auch in unbehandelten chimären Wildtypmäusen fand sich eine basale TNF α -Sekretion von < 30 pg/ml BAL-Flüssigkeit. Sechs Stunden nach intratrachealer Instillation von LPS plus CCL2 wurde in Wildtypmäusen ein TNF α Spiegel von 3150 ± 660 pg/ml (n=5) und in chimären Wildtypmäusen ein Spiegel von 2910 ± 430 pg/ml (n = 5) gemessen. Diese Daten geben somit einen klaren Hinweis darauf, dass die Initiation der akuten Entzündungsreaktion auf CCL2 plus LPS in den beiden Behandlungsgruppen gemessen an der TNF α Liberierung in vergleichbarem Umfang ablief. Somit sind die beobachtete Unterschiede in der alveolären Neutrophilenrekrutierung, welche zwischen diesen beiden Behandlungsgruppen gefunden wurden, nicht auf eine unterschiedliche Initiation der akuten Entzündungsreaktion in der Lunge zurückzuführen.

3.6 Effekt gemischter Knochenmarkstransplantation auf die CCL2 plus LPS-induzierte alveoläre Neutrophilenrekrutierung in den verschiedenen Behandlungsgruppen

Um die Rolle CCR2-positiver zirkulierender Zellen bei der Regulation der alveolären Neutrophilenrekrutierung auf intratracheale CCL2 plus LPS-Applikation näher zu evaluieren, wurden CCR2-defiziente Mäuse nach letaler Bestrahlung durch gemischte Knochenmarkstransplantation lediglich partiell mit CCR2-positivem Knochenmark von Spendermäusen rekonstituiert. Zu diesem Zweck wurden Knochenmarkstammzellen sowohl von CCR2-defizienten Mäusen als auch von Wildtypmäusen isoliert und in vitro in verschiedenen Verhältnissen nach Aufbereitung gemischt, entweder im Verhältnis 50:50 oder im Verhältnis 75:25 (CCR2-defizient versus Wildtyp). Nach erfolgter in-vitro-Vorbereitung des zu transplantierenden Knochenmarkstammzellgemisches wurde dieses CCR2-defizienten Empfängermäusen via laterale Schwanzveneninjektion transplantiert. Das Engraftment des gemischten Knochenmarktransplantates wurde durch durchflusszytometrische Evaluierung der CCR2-Expression auf zirkulierenden Monozyten vier Wochen nach erfolgter Transplantation bestätigt: tatsächlich zeigten die mit 50:50-gemischtem Knochenmark rekonstituierten CCR2-defizienten Mäusen eine ca. 50%ige CCR2-positive sowie 50% CCR2-negative zirkulierende Monozytenfraktion. Demgegenüber zeigten die mit 75:25-gemischtem Knochenmark transplantierten CCR2-defiziente Mäuse eine entsprechend zu 25% CCR2-positive Monozytenfraktion im peripheren Blut (*Abbildung 8a bzw 8b*).

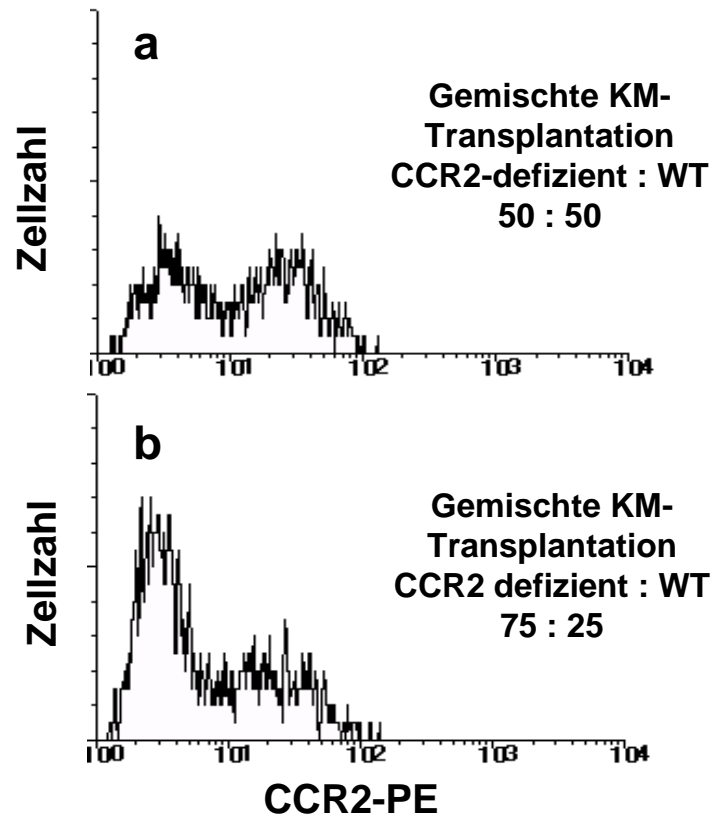


Abbildung 8. Durchflusszytometrische Analyse der CCR2-Expression zirkulierender Monozyten von letal bestrahlten CCR2-defizienten Mäusen nach Transplantation mit definierten Mischungsverhältnissen von CCR2-defizientem und Wildtyp-Knochenmark. Letal bestrahlte CCR2-defiziente Mäuse wurden mit einer gemischten Knochenmarktransplantation bestehend aus 50% CCR2-defizienten und 50% Wildtyp-Knochenmarkstammzellen (a) bzw mit 75:25 gemischtem Knochenmark rekonstituiert (b). Die durchflusszytometrische Analyse der CCR2-Expression zirkulierender Zellen reflektiert die erfolgreiche Generierung gemischter CCR2-defizienter chimärer Mäuse. (a, gemischte Transplantation von 50:50 CCR2-defizienten : Wildtyp-Knochenmarkzellen; b, gemischte Transplantation von 75 : 25 CCR2-defiziente : Wildtyp-Knochenmarkzellen).

Um zu evaluieren, in welchem Umfang CCR2-positive zirkulierende Blutmonozyten an der Regulation der alveolären Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation erforderlich sind, wurden in den nachfolgenden Experimenten CCR2-defiziente Mäuse nach Rekonstitution mit gemischtem Knochenmark, wie vorab beschrieben, einer intratrachealen CCL2 plus LPS-Applikation unterworfen. Es liess sich zeigen, dass CCR2-defiziente Mäuse nach Rekonstitution mit 25%-Wildtypknochenmarkstammzellen eine im Vergleich zur Wildtypkontrolle (100% CCR2-positive zirkulierende Blutmonozyten) vollständig wiederhergestellte alveoläre Neutrophilenrekrutierung auf CCL2 plus LPS-Applikation zeigten. Diese konnte auch durch Rekonstitution CCR2-defizienter Mäuse mit 50%-Wildtyp-Knochenmarkstammzellen nicht weiter gesteigert werden (*Abbildung 9a*).

Demgegenüber zeigten CCR2-defiziente Mäuse nach letaler Bestrahlung und Rekonstitution mit aufsteigenden Anteilen an Wildtypknochenmarkstammzellen (25%, 50%, 100%) eine proportional hierzu ansteigende durch CCL2 plus LPS induzierte alveoläre Monozytenrekrutierung (*Abbildung 9b*). Diese Daten deuten darauf hin, dass für die alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach alveolärer Applikation von CCL2 plus LPS bereits 25% CCR2-positiver zirkulierender Monozyten ausreichend sind, um eine volle, mit der Wildtypkontrolle vergleichbare, alveoläre Neutrophilenrekrutierung zu induzieren. Demgegenüber erfolgt die alveoläre Monozytenrekrutierung strikt proportional zum Anteil CCR2-exprimierender zirkulierender Monozyten.

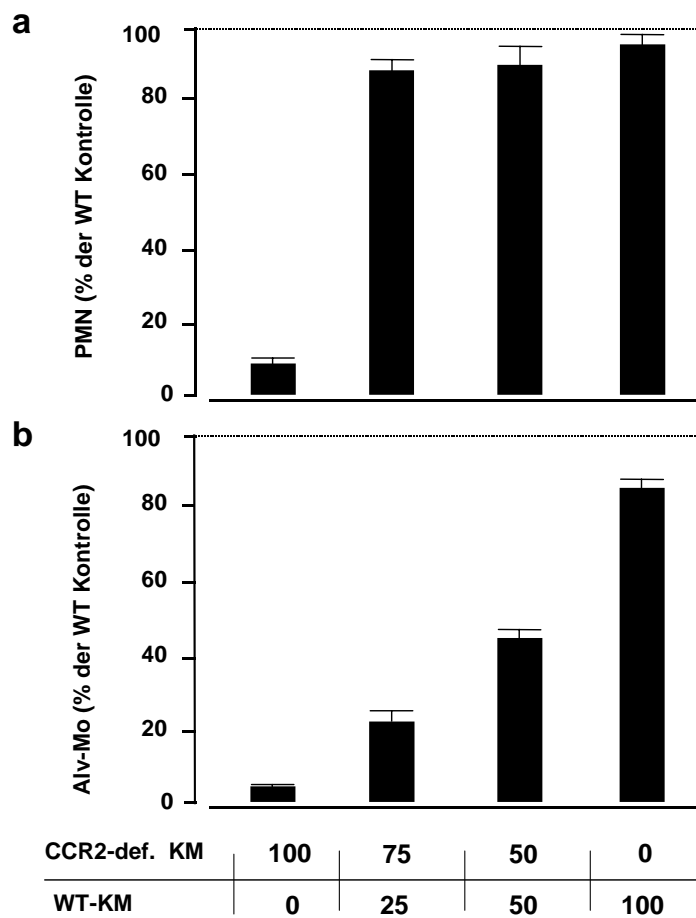


Abbildung 9. Die CCR2 exprimierende Zelle, welche für die koordinierte alveoläre Neurophilenakkumulation notwendig ist, entstammt dem Knochenmark und ist oberhalb eines Schwellenwertes effektiv. CCR2-defiziente Mäuse wurden letal bestrahlt und anschließend einer gemischten Knochenmarktransplantation unterzogen. Es wurden CCR2-defiziente Knochenmarkstammzellen und Wildtypknochenmarkstammzellen im Verhältnis 75:25 bzw 50:50 sedierten CCR2-defizienten Mäusen via lateraler Schwanzveneninjektion transplantiert. Ca. drei Wochen später wurden die Mäuse mit einer intratrachealen Applikation von CCL2 plus LPS behandelt. 24 Stunden nach intratrachealer Applikation von CCL2 plus LPS wurden die Mäuse einer bronchoalveolären Lavage unterworfen und die Anteile alveolär rekrutierter neutrophiler Granulozyten (a) bzw alveolär rekrutierter Monozyten (b) analysiert. Es zeigte sich, dass ca. 25% Wildtyp-stämmiger Blutleukozyten ausreichend waren, um eine im Vergleich zur CCR2-defizienten Kontrolle eine volle Revertierung der alveolären Neutrophilenrekrutierung auf CCL2 plus LPS zu induzieren. Demgegenüber zeigte sich, dass das Ausmaß der alveolären Monozytenrekrutierung proportional zum Anteil CCR2 positiver Monozyten des transplantierten Wildtypknochenmarks anstieg.

3.7 Effekt der Transfusion mononukleärer Wildtypleukozyten auf die durch CCL2 plus LPS induzierte alveoläre Neutrophilenrekrutierung in CCR2- defizienten Mäusen

Die Ergebnisse der Experimente mit gemischter Knochenmarktransplantation verdeutlichen, dass lediglich 25% CCR2-positive zirkulierende Leukozyten in CCR2-defizienten Mäusen ausreichen, um die alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation in CCR2-defizienten Mäusen auf Wildtypniveau anzuheben. Um nachfolgend genauer zu evaluieren, welche Zellen des hämatopoetischen Systems an der Regulation der alveolären Neutrophilenrekrutierung in dieser Behandlungsgruppe beteiligt sind, wurden CCR2-defizienten Mäusen hochaufgereinigte mononukleäre Leukozyten von Wildtypmäusen transfundiert. Anschliessend wurde den Mäusen intratracheal CCL2 plus LPS verabreicht. Als Kontrollgruppe dienten CCR2-defiziente Mäuse, welchen auf gleiche Weise aufbereitete mononukleäre Zellen CCR2-defizienter Mäuse transfundiert wurden. Wie *Abbildung 10* demonstriert, zeigten CCR2-defiziente Mäuse nach intratrachealer CCL2 plus LPS-Applikation nur eine marginale alveoläre Neutrophilenrekrutierung korrespondierend zu den Daten in *Abbildung 4d*. Auch CCR2-defiziente Mäuse, welche CCR2-defiziente mononukleäre Zellen transfundiert bekamen, zeigten keine gesteigerte alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation. In deutlichem Kontrast hierzu zeigten CCR2-defiziente Mäuse nach Transfusion von mononukleären Wildtypzellen eine signifikant gesteigerte alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation, welche die gleiche Größenordnung wie in Wildtypmäusen erreichte (*Abbildung 10*). Diese Daten verdeutlichen, dass CCR2-positive Zellen der mononukleären Zellfraktion die verstärkte alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation im Kontext der akuten pulmonalen Inflammation der Maus vermitteln. Da im Maus-System zirkulierende Blutmonozyten die mononukleäre Zellpopulation repräsentieren, welche eine homogene CCR2-Rezeptor-Expression aufweist, während lediglich 10 – 15% der zirkulierenden T-Zellen eine schwache CCR2-Expression zeigen, sind aller Wahrscheinlichkeit nach zirkulierende Blutmonozyten der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes für die Regulation der CCL2 plus LPS-induzierten Neutrophilen-Alveolitis im beschriebenen Entzündungsmodell verantwortlich.

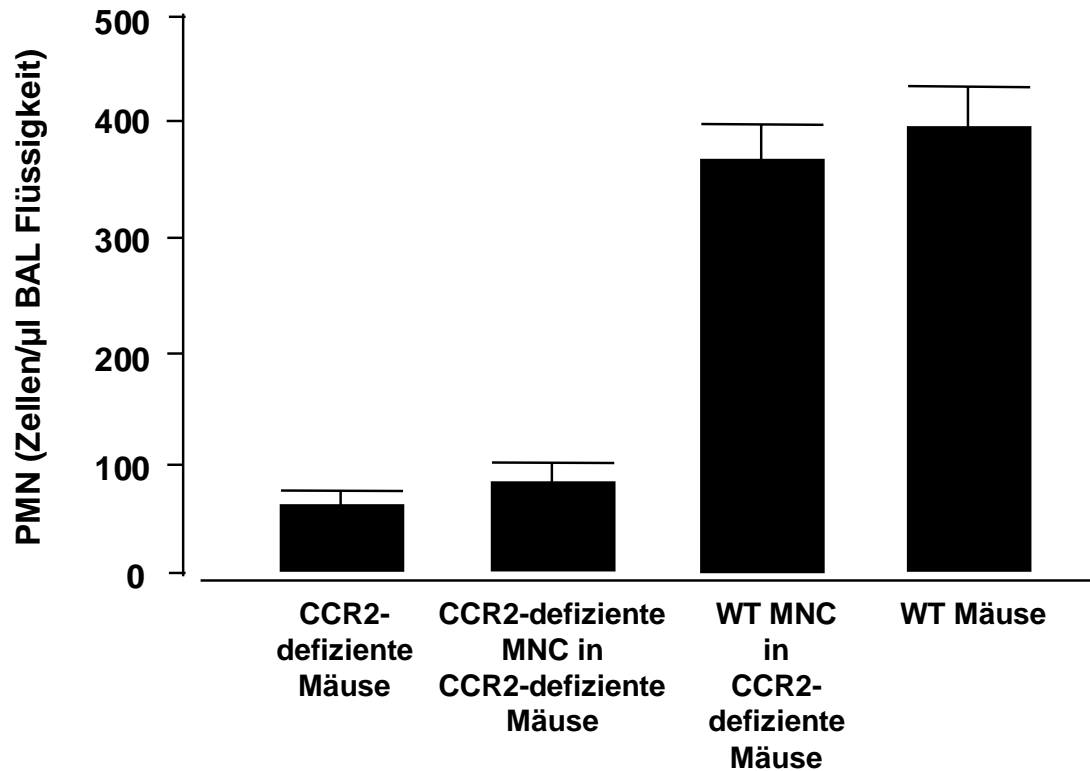


Abbildung 10. Die CCR2 exprimierenden Zellen, welche für die koordinierte alveoläre Neutrophilenakkumulation notwendig sind, sind in der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes enthalten. CCR2-defiziente Mäuse blieben entweder unbehandelt oder erhielten eine Transfusion CCR2-defizienter mononukleärer Zellen oder eine Transfusion von Wildtyp-mononukleären Zellen gefolgt von einer intratrachealen Instillation von CCL2 plus LPS. Vierundzwanzig Stunden später wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt und die alveoläre Neutrophilenrekrutierung evaluiert. Interessanterweise zeigten CCR2-defiziente Mäuse nach Transfusion mit Wildtyp-mononukleären Zellen eine im Vergleich zu Wildtypmäusen vergleichbare alveoläre Neutrophilenrekrutierung, welche signifikant verschieden war von der alveolären Neutrophilenrekrutierung, welche in CCR2-defizienten Mäusen nach Transfusion mit CCR2-defizienten mononukleären Zellen beobachtet wurde.

4 Diskussion

Die akute pulmonale Inflammation, welche in ihrer progredienten Verlaufsform bis hin zum akuten Atemnotsyndrom (ARDS) führen kann, ist charakterisiert durch eine frühe massive alveoläre Neutrophilenakkumulation gefolgt von einer verzögerten alveolären Monozytorekrutierung (004; 005). Während seit vielen Jahren bekannt ist, dass neutrophile Granulozyten aufgrund ihres Potentials zur Liberierung reaktiver Sauerstoffspezies aktiv am Entzündungsgeschehen beteiligt sind (007; 103; 104), wurde die Funktion alveolär rekrutierter Monozyten im Verlauf des ARDS eher in der verzögerten Heilphase, unter anderem im Zusammenhang mit der Phagozytose apoptotischer neutrophiler Granulozyten, gesehen. Jüngere Untersuchungen konnten demgegenüber zeigen, dass alveolär rekrutierte Monozyten zu einer Expansion des Alveolarmakrophagenpools beitragen und gesteigerte Spiegel des Monozyten-rekrutierenden Chemokins CCL2 zusammen mit einer gesteigerten alveolären Monozytenrekrutierung mit dem Ausmaß der akuten Lungenschädigung (lung-injury-score) korrelierten (005; 018). Diese auf Grundlage klinischen Untersuchungsmaterials von septischen ARDS-Patienten erhobenen Befunde deuteten erstmals auf eine aktive proinflammatorische Steuerfunktion alveolär rekrutierter Monozyten im Kontext der akuten pulmonalen Inflammation hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein etabliertes Mausmodell der akuten pulmonalen Inflammation mit selbstlimitierender Entzündungskinetik verwendet, charakterisiert durch frühe alveoläre Neutrophilenrekrutierung und verzögerte alveoläre Monozytenrekrutierung (100, 101). Es sollte insbesondere die Frage geklärt werden, welche Funktion alveolär rekrutierte Monozyten im Vergleich zu residenten Alveolarmakrophagen im Kontext der akuten pulmonalen Inflammation der Maus haben. Da Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass die Rekrutierung von Monozyten unter akuten Entzündungsbedingungen strikt abhängig ist von der Interaktion des Monozyten-rekrutierenden Chemokins CCL2 mit seinem monozytär exprimierten Rezeptor CCR2 (075, 077, 082; 083; 084), wurden in der vorliegenden Arbeit neben Wildtypmäusen sowie CCR2-defizienten Mäusen, chimäre Wildtyp- bzw. chimäre CCR2-defiziente Mäuse zur Untersuchung der Monozytenfunktion in der

pulmonalen Inflammation eingesetzt. Diese Mäuse wurden durch letale Bestrahlung sowie nachfolgende reziproke Knochenmarktransplantation zwischen CCR2-defizienten- bzw Wildtyp-Spendertieren generiert. Durch die Generierung CCR2-chimärer Mäuse gelang in der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines experimentellen Systems, in welchem der Verlauf der akuten pulmonalen Inflammation, die sich regelhaft nach CCL2 plus LPS Instillation in Mäusen entwickelt, sowohl in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit CCR2-positiver alveolär rekrutierter Monozyten charakterisiert werden konnte (105).

4.1 Die Bedeutung der CCL2/CCR2-Achse für die pulmonale Monozytenrekrutierung unter akuten Entzündungsbedingungen

Eine Vielzahl von Untersuchungen konnte klare Evidenzen dafür liefern, dass die lokale Sekretion von CCL2 Voraussetzung für die inflammatorische Rekrutierung und Extravasation zirkulierender Monozyten ins Gewebe ist. So konnten Gunn et al. zeigen, dass die Überexpression von CCL2 in Typ II Alveolarepithelzellen der Mauslunge zu einer kontinuierlichen Rekrutierung zirkulierender Monozyten in die Lunge führte ohne dass eine pulmonale Inflammation auftrat (082). Korrespondierend hierzu konnten Grewal et al. zeigen, dass die Überexpression von CCL2 (MCP1) in Pankreaszellen zu einer monozytären Gewebsakkumulation führte, ohne zugleich einen Diabetes zu induzieren (084). Ergänzend hierzu induzierte die gehirnspezifische Überexpression von CCL2 eine Monozytenakkumulation im zentralen Nervensystem von Mäusen (083). Nakamura et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von CCL2 in der Basalzellschicht der Haut zu einer vermehrten Infiltration dendritischer Zellen mit Langerhanszell-spezifischen Charakteristika führt (058). Desweiteren zeigten CCL2 (MCP1)-defiziente Mäuse eine Attenuierung der Monozytenakkumulation (077). Zusammengefaßt weisen diese Daten eindeutig darauf hin, dass lokale CCL2-Chemokingradienten treibende Kraft für die Gewebsakkumulation von Monozyten sind. Darüberhinaus deuten diese Daten darauf hin, dass eine Akkumulation von Monozyten in Abwesenheit inflammatorischer Stimuli nicht per se zu einer akuten Entzündung des

jeweiligen Organs oder Organsystems führt. Kongruent zu diesen Befunden konnten Gunn et al. zeigen, dass erst die Applikation sekundärer entzündlicher Stimuli in der Lunge eine akute pulmonale Inflammation in Mäusen mit spezifischer CCL2-Überexpression in Alveolarepithelzellen induziert (082). Umgekehrt zeigten Untersuchungen von Kurihara et al., Boring et al. sowie von Kuziel et al., dass die Deletion von CCR2 zu einer Aufhebung der lokalen Monozytenakkumulation unter akuten Entzündungsbedingungen führte, wodurch wiederum die Relevanz der CCL2/CCR2-Achse für die Monozytenrekrutierung ins Gewebe belegt wird (091; 106; 107). Passend zu diesen Befunden konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die intratracheale Instillation von CCL2 zu einer selektiven alveolären Monozytenakkumulation in Wildtypmäusen, nicht aber in CCR2-defizienten Mäusen führte. Zur genaueren Differenzierung der Relevanz der CCR2-Expression zirkulierender Blutmonozyten versus alveolärer Makrophagen, welche bekanntermaßen aus zirkulierenden Blutmonozyten hervorgehen, wurden Experimente in chimären CCR2-defizienten bzw chimären Wildtypmäusen durchgeführt. Chimäre CCR2-defiziente Mäuse, welche nach letaler Bestrahlung mit Wildtypknochenmark rekonstituiert wurden, zeigten im Vergleich zu CCR2-defizienten Mäusen eine vollständig wiederhergestellte Monozytenrekrutierung auf CCL2-Instillation. Da sich die CCR2-Expressionsprofile auf zirkulierenden Monozyten versus residenten Alveolarmakrophagen zwischen CCR2-defizienten Mäusen und chimären CCR2-defizienten Mäusen dahingehend unterscheiden, dass in chimären CCR2-defizienten Mäusen zirkulierende Blutmonozyten CCR2 exprimieren, während alveoläre Makrophagen kein CCR2 exprimieren, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass primär die CCR2-Expression zirkulierender Blutmonozyten, nicht aber residenter Alveolarmakrophagen für die CCL2-getriebene alveoläre Monozytenrekrutierung verantwortlich ist. Diese Interpretation wird untermauert durch die Daten, welche in chimären Wildtypmäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen gewonnen werden konnten. Chimäre Wildtypmäuse zeichnen sich nach letaler Bestrahlung und Rekonstitution mit CCR2-defizientem Knochenmark dadurch aus, dass ihre residenten Alveolarmakrophagen noch CCR2 exprimieren, während das rekonstituierte hämatopoetische System dieser Mäuse CCR2 defizient ist und somit auch zirkulierende Monozyten kein CCR2 exprimieren. Entsprechend zeigte die intratracheale Instillation von CCL2 in die Lungen chimärer Wildtypmäuse keine alveoläre

Monozytenakkumulation, so dass wiederum deutlich wird, dass die fehlende CCR2-Expression auf zirkulierenden Monozyten kausal verantwortlich für die fehlende alveoläre Monozytenakkumulation nach intratrachealer CCL2-Instillation ist. Kontrastierend zu den Befunden einer differenziellen alveolären Monozytenrekrutierung nach CCL2-Applikation in Wildtyp- bzw. CCR2-defizienten Mäusen sowie chimären Wildtyp- und chimären CCR2-defizienten Mäusen zeigte die intratracheale Instillation von LPS alleine keine Unterschiede hinsichtlich der alveolären Neutrophilenrekrutierung in den verschiedenen Behandlungsgruppen, wodurch deutlich wird, dass die alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach alleiniger LPS-Gaben per se unabhängig von der CCR2-Expression auf Zellen des hämatopoetischen Systems (Monozyten, Lymphozyten) ist. Frühere Untersuchungen von Maus et al. konnten demgegenüber zeigen, dass die alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Provokation in CCR2-defizienten Mäusen ähnlich wie die alveoläre Monozytenrekrutierung signifikant reduziert war (098).

Die vorliegende Arbeit zeigt darüberhinaus, dass zirkulierende CCR2-positive Monozyten in der CCL2 plus LPS-induzierten pulmonalen Inflammation der Maus eine Regulatorfunktion für die alveoläre Neutrophilenrekrutierung haben: chimäre Wildtypmäuse, welche charakterisiert sind durch eine CCR2-positive Peripherie (CCR2-positive residente Alveolarmakrophagen), aber ein CCR2-defizientes hämatopoetisches System, zeigten neben einer attenuierten Monozytenrekrutierung auch eine im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant reduzierte alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation. Demgegenüber war in chimären CCR2-defizienten Mäusen mit einer CCR2-defizienten Peripherie (CCR2-defiziente Alveolarmakrophagen) jedoch einem CCR2-positiven hämatopoetischen System, sowohl die alveoläre Monozytenrekrutierung auf CCL2 plus LPS-Applikation als auch insbesondere die alveoläre Neutrophilenrekrutierung in signifikantem Umfang rekonstituiert. Diese Daten belegen deutlich, dass zirkulierende CCR2-exprimierende Zellen des hämatopoetischen Systems in die Regulation der alveolären Neutrophilenrekrutierung involviert sind.

4.2 Relevanz der CCR2- Expression residenter Alveolarmakrophagen für die alveoläre Neutrophilen- und Monozytenrekrutierung in der akuten pulmonalen Inflammation der Maus

Residente Alveolarmakrophagen, welche als Bestandteile des mononukleär-phagozytären Systems (MPS) aus zirkulierenden Monozyten hervorgehen (069; 099; 108), weisen ebenso wie zirkulierende Blutmonozyten eine homogene CCR2-Expression auf, welche aber, vermutlich im Rahmen des Differenzierungsprozesses residenter Alveolarmakrophagen, schwächer ausgeprägt ist als die CCR2-Expression zirkulierender Blutmonozyten (073). Es ist seit langem bekannt, dass residente Alveolarmakrophagen sensitive Erkennungsstrukturen für pathogenassoziierte molekulare Mustermoleküle (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) besitzen und aufgrund ihrer Fähigkeit zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, proteolytischer Enzyme, sowie pro- und antiinflammatorischer Zytokine und Chemokine als Initiatoren der Frühphase der akuten pulmonalen Inflammation fungieren (064, 072; 099; 109). Bis dato ist hingegen unklar, welche Funktion die CCR2-Expression residenter Alveolarmakrophagen im Kontext der CCL2 plus LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation der Maus hat. Um diese Frage zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit chimäre CCR2-defiziente Mäuse, welche einen CCR2-defizienten Alveolarmakrophagenpool (*siehe auch Tabelle I, Seite 27*), jedoch ein CCR2-positives hämatopoetisches System aufweisen, mit liposomalem Clodronate behandelt. Dies führt zu einer selektiven, etwa 85%igen Depletion des Alveolarmakrophagenpools, welcher durch Phagozytose des in Liposomen verpackten Clodronates durch Blockade des ATP-Stoffwechsels der Zelle apoptotisch wird (073). Mit Hilfe dieses Werkzeugs war es möglich, in chimären CCR2-defizienten Mäusen mit CCR2-defizientem Makrophagenpool nach Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools durch Clodronate eine beschleunigte Repopulierung des alveolären Kompartimentes mit CCR2-positiven Monozyten zu induzieren. Somit standen in der vorliegenden Arbeit sowohl chimäre CCR2-defiziente Mäuse mit CCR2-defizientem Alveolarmakrophagenpool (ohne Clodronate-Vorbehandlung) als auch chimäre CCR2-defiziente Mäuse mit CCR2-positivem Alveolarmakrophagenpool (nach

Clodronate-Vorbehandlung) zur Verfügung. Die Daten aus diesen Experimenten zeigen, dass das Ausmaß der Neutrophilenrekutierung nach intratrachealer Instillation von CCL2 plus LPS in beiden Behandlungsgruppen keine Unterschiede aufwies. Hieraus kann geschlossen werden, dass die CCR2-Expression residenter Alveolarmakrophagen für die alveoläre Neutrophilenrekutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation keine signifikante Rolle spielt. Darüberhinaus wird durch diese Daten verdeutlicht, dass nicht die aus CCR2-positiven Monozyten hervorgehenden CCR2-positiven Alveolarmakrophagen, sondern ihre zirkulierenden Progenitor-Zellen (Blutmonozyten) für die gesteigerte alveoläre Neutrophilenrekutierung in der CCL2 plus LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation in der Maus verantwortlich zu sein scheinen.

4.3 Effekt der Transfusion mononukleärer Leukozyten auf die CCL2 plus LPS induzierte Neutrophilen-Alveolitis CCR2-defizienter Mäuse

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Generierung chimärer Mäuse erlaubt die differentielle Betrachtung von zirkulierenden versus residenten Leukozytenpopulationen, welche sich genotypisch in ihrem Markerprofil unterscheiden. Bezogen auf die beschriebenen Experimente war dies in der vorliegenden Arbeit die differentielle Evaluierung der CCR2-Expression auf zirkulierenden Monozyten versus residenten Alveolarmakrophagen in der akuten pulmonalen Inflammation. Vergleichende Experimente genotypisch unterschiedlicher zirkulierender versus residenter Leukozytenpopulationen wurden bereits von Forlow et al beschrieben, welcher in CD18-defizienten Mäusen eine partielle CD18-Rekonstitution im hämatopoetischen System durch Knochenmarktransplantationen induzierte (110). Auch in der vorliegenden Arbeit gelang die Etablierung von partiell chimären Mäusen, welche durch gemischte Knochenmarktransplantation, bestehend aus verschiedenen Verhältnissen von CCR2-defizienten zu CCR2-exprimierenden Knochenmarkstammzellgemischen partiell hinsichtlich der CCR2 Expression rekonstituiert wurden. Diese gemischten Knochenmarktransplantationen erlaubten

schliesslich eine Aussage darüber, welches Ausmaß CCR2-positiver Zellen des hämatopoetischen Systems erforderlich ist, um die alveoläre Neutrophilen-Rekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation zu induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass die per durchflußzytometrischer Analyse dokumentierte partielle Rekonstitution von lediglich 25% CCR2-positiven zirkulierenden Blutmonozyten voll ausreichend war, um die alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation in chimären CCR2-defizienten Mäusen auf Wildtypniveau anzuheben. Demgegenüber war das Ausmaß der alveolären Monozytenrekrutierung unter akuten Entzündungsbedingungen dem Anteil CCR2-positiver zirkulierender Monozyten in chimären CCR2-defizienten Mäusen nach gemischter Knochenmarktransplantation direkt proportional. Da in diesen Experimenten ähnlich wie in solchen, bei denen ein hundertprozentiger Austausch des Empfänger Knochenmarks durch Spenderknochenmark nach myeloablativer Bestrahlung erreicht wurde, Knochenmarkstammzellen, die die gesamte Hämatopoese rekonstituierten, transplantiert wurden, konnte in diesen Untersuchungen die CCR2-positive Effektorzelle, welche für die rekonstituierte alveoläre Neutrophilenrekrutierung in den entsprechenden Mausbehandlungsgruppen verantwortlich war, nicht identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden parallel zu den Experimenten mit gemischten Knochenmarktransplantationen Transfusionsexperimente durchgeführt, in welchen CCR2-defiziente Mäuse mononukleäre Zelltransfusionen von Wildtypmäusen erhielten. Mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes sollte die Frage evaluiert werden, ob die CCR2-exprimierende Effektorzelle, welche die alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach intratrachealer CCL2 plus LPS-Applikation reguliert, in der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes enthalten ist. Auf eine weitere Aufreinigung der zirkulierenden Monozyten wurde verzichtet, da die hochgradige Aufreinigung signifikanter Mengen zirkulierender Blutmonozyten aus dem peripheren Blut von Mäusen kaum erreichbar ist und in der internationalen Literatur bis dato noch nicht in überzeugender Weise kommuniziert wurde. Selbst Untersuchungen, in welchen die durchflußzytometrische Aufreinigung zirkulierender Blutmonozyten aus dem peripheren Blut von Mäusen berichtet wurde, besitzen den klaren experimentellen Nachteil, dass die Identifikation der zirkulierenden Blutmonozyten über Antikörpermarkierungen erfolgen muß, welche wiederum mit einer Veränderung des Aktivierungszustandes der zirkulierenden Blutmonozyten einhergehen könnte, was die experimentellen Systeme beeinflusst. Aus

diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit mononukleäre Zelltransfusionen von Wildtypmäusen auf CCR2-defiziente Mäuse vorgenommen und untersucht, ob die in CCR2-defizienten Mäusen beobachtete Attenuierung sowohl der Monozyten- als auch der Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation durch die Transfusion CCR2-exprimierender mononukleärer Zellen von Wildtypspendermäusen revertiert werden kann. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die alveoläre Neutrophilenrekrutierung in CCR2-defizienten Mäusen durch Transfusion von CCR2-exprimierenden mononukleären Zellen von Wildtyp-Spendermäusen auf das in Wildtypmäusen beobachtete Niveau revertiert werden konnte. Da umgekehrt die Transfusion von Kontroll-mononukleären Zellen CCR2-defizienter Mäuse auf CCR2-defiziente Tiere die durch CCL2 plus LPS-induzierte alveoläre Neutrophilenrekrutierung nicht revertieren konnte, belegt dies, dass die postulierte Schrittmacherzelle für die Regulation der alveolären Neutrophilenrekrutierung in der mononukleären Zellfraktion des hämatopoetischen Systems enthalten sein muß. Da zugleich im Verlauf der CCL2 plus LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation von Wildtypmäusen Lymphozyten, die ebenfalls in der mononukleären Zellfraktion enthalten sind, nicht im signifikanten Ausmaß alveolär rekrutiert wurden, legen diese Daten den Schluß nahe, dass CCR2-positive zirkulierende Blutmonozyten diejenige Schrittmacherzellen sind, welche die alveoläre Neutrophilen-Rekrutierung im Mausmodell der CCL2 plus LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation bewirken.

Monozyten spielen auch als Schrittmacherzellen in anderen experimentellen Systemen eine wichtige Rolle: jüngste Untersuchungen von Vozzelli et al. konnten zeigen, dass die systemische Applikation neutralisierender anti-CCL2-Antikörper in Hyperoxie-exponierten neugeborenen Ratten das Ausmaß der alveolären Neutrophilenrekrutierung sowie das Ausmass der akuten Lungenschädigung signifikant attenuiert (111). Da CCL2 als CC-Chemokin das Haupt-Monozytenchemokin ist und keine chemotaktischen Eigenschaft auf neutrophile Granulozyten hat, wird auch in diesem Modell deutlich, dass offensichtlich Monozyten das Ausmaß der Neutrophilenrekrutierung in der Hyperoxy-induzierten neugeborenen Ratte regulieren. Blease et al. beobachteten bei CCR2-defizienten Mäusen nach Stimulation mit *Aspergillus fumigatus* conidia einen im Verlgleich zu Wildtypmäusen verminderten alveolären Neutrophileninflux (112),

Gonzalo et al. beschrieben in einem Mausmodell eine 80%ige Attenuierung der alveolären Neutrophilenakkumulation durch CCL2 (MCP1)-Blockade (113).

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit mangels hochaufgereinigter CCR2-exprimierender peripherer Blutmonozyten der letzte Beweis für die Funktion CCR2-exprimierender Blutmonozyten als Regulatorzellen für die alveoläre Neutrophilenrekrutierung in der akuten pulmonalen Inflammation der Maus noch aussteht, so weist doch die Synopsis der Befunde vor dem Hintergrund der Literatur darauf hin, dass Monozyten eine Schrittmacherzellfunktion in der Regulation der Neutrophilenalveolitis der Maus übernehmen können.

4.4 Die Bedeutung der CCL2/CCR2-Achse in anderen Modellen der akuten versus chronischen Lungenentzündung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erweitern die bisher in der Literatur etablierte Einschätzung über die Beteiligung von gewebständigen Monozyten im akuten Entzündungsgeschehen. Allerdings ist die Rolle mononukleärer Phagozyten für Inflammation und Abwehr noch nicht umfassend geklärt. Beispielsweise zeigten Untersuchungen in Influenza-infizierten CCR2-defizienten Mäusen, dass eine fehlende alveoläre Monozytenrekrutierung zu einem signifikant gesteigerten Überleben dieser Tiere trotz signifikant erhöhter Virustiter in der Lunge führte (114). Demgegenüber zeigten Untersuchungen in CCR2-defizienten Mäusen nach *Mycobacterium tuberculosis* Infektion, eine signifikante Reduktion der Überlebensrate infizierter Mäuse (115). Es ist bis dato nicht hinreichend geklärt, ob in diesen Modellen der akuten versus chronischen pulmonalen Infektion in Abwesenheit alveolär rekrutierter Monozyten möglicherweise auch Lymphozytenpopulationen in ihrem Verteilungsmuster bzw. ihrer Rekrutierungskinetik durch die fehlende alveoläre Monozytenrekrutierung beeinflusst werden. Somit bleibt bisher unbeantwortet, ob möglicherweise zirkulierende Blutmonozyten nicht nur in die Regulation der alveolären Neutrophilenrekrutierung in der akuten pulmonalen Inflammation, sondern möglicherweise auch in die Regulation alveolärer Lymphozytenrekrutierung involviert

sind. Jedenfalls ist bis dato eine mögliche therapeutische Nutzung dieser Beeinflussung der CCL2-CCR2-Achse noch nicht hinreichend untersucht. Da zirkulierende Blutmonozyten Progenitor-Zellen residenter Alveolarmakrophagen sind, welche eine kritische Bedeutung für die first-line Wirtsabwehr gegen mikrobielle alveoläre Besiedelung darstellen, könnte eine anti-CCL2-Therapie von ARDS-Patienten zur Attenuierung der alveolären Neutrophilenrekrutierung in eine lebensbedrohliche Indifferenz residenter „host-defence“-Mechanismen münden. So konnte beispielsweise in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die Neutralisierung von endogenem CCL2 die pulmonale *Cryptococcus neoformans*-Infektion in der Maus dramatisch verschlechterte (116).

4.5 Ausblick

Die Rekrutierung von peripheren Blutmonozyten in das alveoläre Kompartiment der Lunge ist abhängig von einem CCL2-Konzentrationsgradienten, die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten wird bei alleiniger Deposition von Endotoxin durch andere Mediatoren vermittelt wie beispielsweise das makrophage-inflammatory-protein 2 (MIP-2) (117). In der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass unter akut entzündlichen Bedingungen CCR2-positive mononukleäre Zellen als Schrittmacherzellen für eine adäquate Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten fungieren können (*Abbildung 11*).

Weiterführende Studien müssen nun klären, ob die CCR2-positiven mononukleären Zellen ihre Schrittmacher-Funktion von der intravasalen Seite der Blut-Luft-Schranke vermitteln, oder ob eine Comigration von Monozyten mit Neutrophilen nötig ist, bzw ob die Translokation der zirkulierenden Monozyten in die Mauslunge im Sinne einer Inter-kompartimentellen Kommunikation assoziiert ist mit einer erhöhten Induktion chemotaktischer Mediatoren für neutrophile Granulozyten (*Abbildung 11*).

Schlussendlich muss geklärt werden, welcher molekulare Mechanismus dieser monozytären Triggerfunktion zugrunde liegt. Desweiteren bleibt aufzuklären, inwieweit der Monozyten/Neutrophilen „cross talk“ zur Organschädigung bzw. Krankheitsabwehr beiträgt.

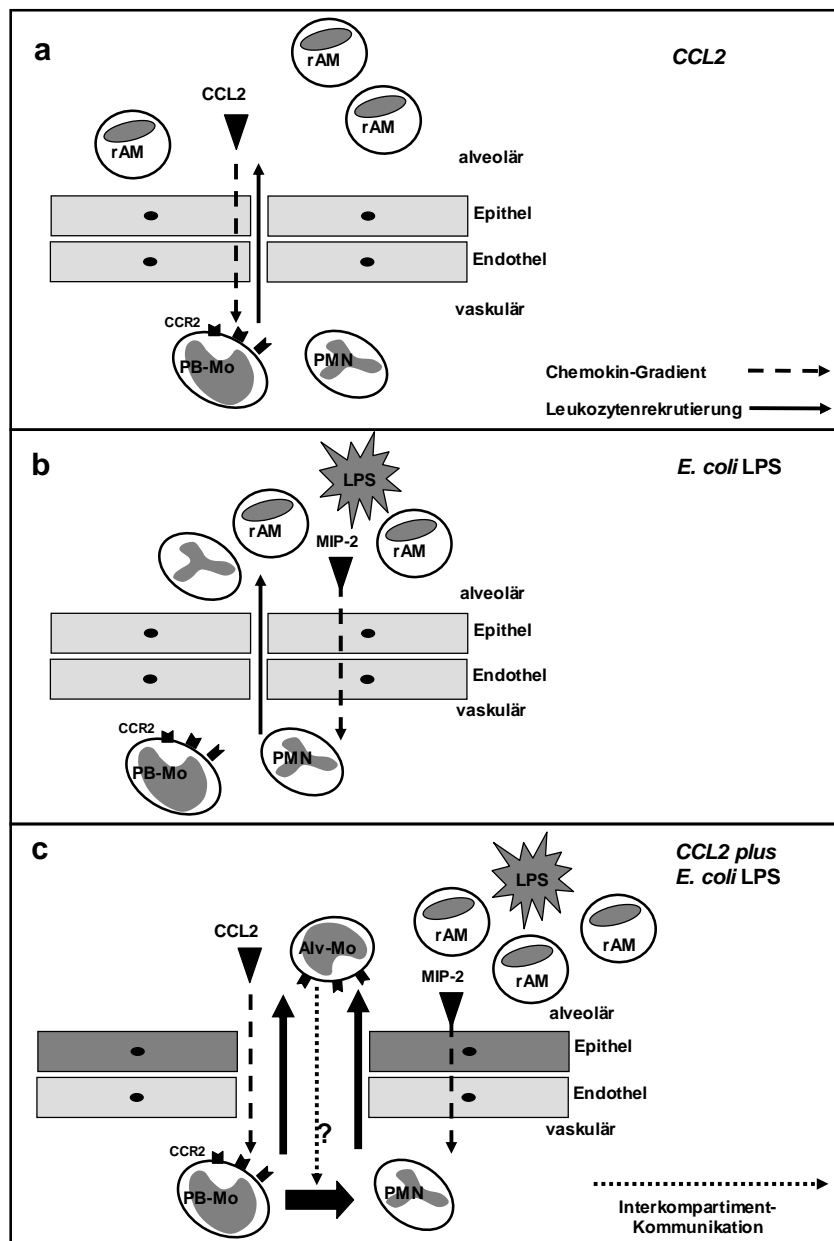


Abbildung 11: Szenario der Funktion zirkulierender Blutmonozyten in der Regulation der alveolären Neutrophilenrekrutierung bei akuter pulmonaler Inflammation. a) alveoläre Monozytenrekrutierung nach CCL2-Applikation. b) Rekrutierung neutrophiler Granulozyten nach LPS-Applikation. c) mögliche Beteiligung alveolär rekrutierter Monozyten in der Regulation der durch CCL2 plus *E. coli* LPS induzierten Neutrophilenrekrutierung in die Lunge.

5 Zusammenfassung

Charakteristikum der akuten pulmonalen Inflammation ist die frühe massive Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das alveoläre Kompartiment, welche regelhaft gefolgt wird von einer verzögerten alveolären Monozytenrekrutierung. Untersuchungen der vergangenen Jahre konnten zeigen, dass es bei der schweren Verlaufsform der akuten pulmonalen Inflammation, klinisch repräsentiert durch das septische akute Atemnotsyndrom (ARDS), neben einer frühen Neutrophilenrekrutierung zu einer massiven, verzögerten alveolären Monozytenrekrutierung mit konsekutiver Expansion des residenten Alveolarmakrophagen-Pools kommt. Gesteigerte Monozytenrekrutierung in die Lungen von ARDS-Patienten korreliert mit einer massiv gesteigerten alveoläre Liberierung des Monozyten-rekrutierenden Chemokins CCL2 (MCP1) und mit dem „lung-injury-score“. Diese Daten deuteten auf eine proinflammatorische Steuerfunktion alveolär rekrutierter Monozyten in der akuten pulmonalen Inflammation hin. In der vorliegenden Arbeit wurde gezielt die Rolle zirkulierender Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen in einem Mausmodell der akuten pulmonalen Inflammation untersucht. Sowohl Wildtypmäusen als auch CCR2-defizienten Mäusen, sowie Wildtypmäusen und CCR2-defizienten Mäusen nach letaler Bestrahlung und reziproker Knochenmarktransplantation (sogenannte chimäre Wildtypmäuse bzw chimäre CCR2-defiziente Mäuse) wurde intratracheal CCL2 in Anwesenheit bzw Abwesenheit von *E. coli* Endotoxin appliziert. Die Analyse des alveolären Leukozytenrekrutierungsmusters in den verschiedenen Behandlungsgruppen zeigte, dass die CCR2-Expression zirkulierender Blutmonozyten eine essentielle Voraussetzung für die alveoläre Monozytenrekrutierung sowohl unter nicht-entzündlichen Bedingungen (alleinige CCL2-Applikation), wie auch unter akut entzündlichen Bedingungen (CCL2 plus LPS-Applikation) ist. Demzufolge zeigten CCR2-defiziente Mäuse gegenüber Wildtypmäusen eine vollständig attenuierte alveoläre Monozytenrekrutierung unter nicht entzündlichen und akut entzündlichen Bedingungen. Diese Schlussfolgerung konnte maßgeblich durch die Verwendung chimärer Wildtypmäuse bzw chimärer CCR2-defizienter Mäuse erhärtet werden. Chimäre Wildtypmäuse zeigten nach

Rekonstitution mit CCR2-defizientem Knochenmark gegenüber Wildtypmäusen eine nahezu vollständig attenuierte alveoläre Monozytenrekrutierung unter nicht-entzündlichen wie auch unter akut-entzündlichen Bedingungen. Demgegenüber zeigten chimäre CCR2-defiziente Mäuse, welche nach letaler Bestrahlung mit Wildtypknochenmark rekonstituiert wurden, eine mit Wildtypmäusen vergleichbar ausgeprägte alveoläre Monozytenrekrutierung. Interessanterweise war sowohl in CCR2-defizienten Mäusen als auch in chimären Wildtypmäusen mit CCR2-defizientem hämatopoetischen System neben der erwarteten Attenuierung der alveolären Monozytenrekrutierung auch eine hochsignifikante Reduktion der alveolären Neutrophilenrekrutierung zu beobachten, obwohl zirkulierende und alveolär rekrutierte neutrophile Granulozyten kein CCR2 exprimierten. Diese Daten weisen auf eine Interdependenz der alveolären Neutrophilen- und Monozytenrekrutierung im Kontext pulmonaler Inflammation hin. Weiterführende Experimente mit CCR2-defizienten Mäusen, welche mit gemischten Knochenmarkstransplantationen rekonstituiert wurden (50:50 bzw 75:25 CCR2-defiziente versus Wildtyp-Knochenmarkstammzellen) konnten klar belegen, dass die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems CCR2-defizienter Mäuse mit lediglich 25% Wildtyp-Knochenmarkzellen ausreichend war, um die in CCR2-defizienten Mäusen vollständig attenuierte alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation auf das in Wildtypmäusen beobachtete Ausmaß der alveolären Neutrophilenrekrutierung zu revertieren. Parallel hierzu konnte gezeigt werden, dass die alveoläre Monozytenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation proportional mit dem Anteil CCR2-positiver Zellen im hämatopoetischen System von CCR2-defizienten Mäusen nach Rekonstitution mit gemischten Knochenmarkzellen anstieg. Schließlich bestätigten Untersuchungen mit CCR2-defizienten Mäusen, welche eine Transfusion von hochaufgereinigten Wildtyp-mononukleären Zellen erhielten, die Rolle zirkulierender CCR2-exprimierender Zellen für die alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation: die Transfusion mononukleärer Zellen von Wildtypmäusen in CCR2-defiziente Mäuse war ausreichend, um die alveoläre Neutrophilenrekrutierung nach CCL2 plus LPS-Applikation, welche in CCR2-defizienten Mäusen per se vollständig fehlt, auf das in Wildtypmäusen beobachtete Niveau zu steigern. Aus diesen Daten kann klar abgeleitet werden, dass CCR2-positive Zellen der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes eine wichtige Regulatorfunktion für die alveoläre Neutrophilenrekrutierung in der akuten

pulmonalen Inflammation der Maus haben. Demgegenüber konnte residenten Alveolarmakrophagen keine über CCR2 vermittelte Funktion in der Regulation der alveolären Neutrophilenrekrutierung zugeordnet werden. Da die ebenfalls in der mononukleären Zellfraktion enthaltenen Lymphozyten kaum CCR2 exprimieren und nach CCL2/LPS-Gabe nicht alveolär rekrutiert werden, erscheint es wahrscheinlich, dass CCR2-positive zirkulierende Blutmonozyten das Ausmaß der alveolären Neutrophilenrekrutierung in der akuten pulmonalen Inflammation der Maus aktiv regulieren. Weiterführende Untersuchungen sind erforderlich, um die molekularen Mechanismen zu klären, welche diese Regulatorfunktion zirkulierender Blutmonozyten für den alveolären Leukozytenverkehr vermitteln.

6 Summary

Local tissue inflammatory responses to microbial challenge are characterized by early neutrophil attraction and subsequent prolonged monocyte accumulation. Although chemokine release and cell surface display of complementary leukocyte and endothelial/epithelial adhesion molecules are centrally involved in these processes, the underlying mechanisms that shape the kinetics and extent of neutrophil and monocyte recruitment is unclear. In recent investigations, in which a mouse model of acute lung inflammation provoked by intratracheal application of combined LPS and CCL2 was used to mimic elevated intra-alveolar levels of CCL2 observed in septic adult respiratory distress syndrome patients, the successive waves of early alveolar neutrophil and delayed alveolar monocyte recruitment were resolved in detail. It was not surprising that induced monocyte recruitment to the lungs would be blocked by treatment with Abs against CCR2, the major receptor for the potent monocyte chemoattractant CCL2, or in mice deficient in CCR2. However, it was completely unexpected that the accumulation of neutrophils, which do not express CCR2, is depended on the activity of CCR2. To define the CCR2-bearing cells that promote the neutrophil accumulation in mouse lungs challenged by CCL2 and LPS, bone marrow transplantation and adoptive transfer of mononuclear cells was used to generate chimeric mice with disparate expression of CCR2 on circulating cells versus sessile lung cells. The ability to distinguish between CCR2-bearing monocytes and alveolar macrophages allowed to assemble additional evidence that blood-borne monocytes are the facilitators of neutrophil recruitment in this model of inflammation. The strong synergistic contribution of monocytes to the burst of neutrophil emigration broadens the scope of cellular communication that underlies pulmonary inflammatory responses and has implications for anti-inflammatory therapeutic strategies aimed at interfering with the CCL2-CCR2 axis.

7 Literaturverzeichnis

- 001 **Seeger W.** ARDS. *Pneumologie*. 50: 615-617, 1996.
- 002 **Walmrath D, Grimminger F, Seeger W.** Schwere Sepsis – neue Therapieverfahren. *Internist*. 42: 1619-1630, 2001.
- 003 **Vincent JL, Sakr Y, Ranieri VM.** Epidemiology and outcome of acute respiratory failure in intensive care unit patients. *Crit. Care Med*. 31(4Suppl): S296-S299, 2003.
- 004 **Yamamoto T, Kajikawa O, Martin TR, Sharar SR, Harlan JM, 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.
- 005 **Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Walmrath H, Schütte H, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J.** Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol*. 279: L25-L35, 2000.
- 006 **Miller EJ, Cohen AB, Nagao S, Griffith D, Maunder RJ, Martin TR, Weiner-Kronish JP, Sticherling M, Christophers E, Matthay MA.** Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspace of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am. Rev. Respir. Dis*. 146: 427-432, 1992.
- 007 **Weiland JE, Davis WB, Holter JF, Mohammed JR, Dorinsky PM, Gadek JE.** Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *Am. Rev. Respir. Dis*. 133: 218-225, 1986.

-
- 008 **Robson RL, McLoughlin RM, Witowski J, Loetscher P, Wilkinson TS, Jones SA, 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.
- 009 **Maus U, Huwe J, Ermert L, Ermert M, Seeger W, Lohmeyer J.** Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 1-7, 2001.
- 010 **Issekutz A, Chuluyan E, Lopes N.** CD11/CD18-independent transendothelial migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes: involvement of distinct and unique mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 57: 553-561, 1995.
- 011 **Li XC, Miyasaka M, 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.
- 012 **Rosseau S, Selhorst J, Wiechmann K, Leissner K, Maus U, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J.** Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J. Immunol.* 164: 427-435, 2000.
- 013 **Doerschuk CM, Mizgerd JP, Kubo H, Qin L., Kumasaka T.** Adhesion molecules and cellular biomechanical changes in acute lung injury. *Chest.* 116: 37S-43S, 1999.
- 014 **Baggiolini M.** Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 392: 565-568, 1998.
- 015 **Rollins BJ.** Chemokines. *Blood.* 90: 909-928, 1997.

- 016 **Wells TNC, Power CA, Proudfoot AEI.** Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors. *Trends in Pharm. Sci.* 19: 376-380, 1998.
- 017 **Mizgerd JP, Horwitz BH, Quillen HC, Scott ML, Doerschuk CM.** Effects of CD18 deficiency on the emigration of murine neutrophils during pneumonia. *J. Immunol.* 163: 995-999, 1999.
- 018 **Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR.** Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 602-611, 1996.
- 019 **Baier RJ, Majid A, Parupia H, Loggins J, Kruger TE.** CC chemokine concentrations increase in respiratory distress syndrome and correlate with development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr. Pulmonol.* 37: 137-148, 2004.
- 020 **Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni-Grassi G, 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.
- 021 **Iyonaga K, Takeya M, Saita N, Sakamoto O, Yoshimura T, Ando M, Takahashi K.** Monocyte chemoattractant protein-1 in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases. *Hum. Pathol.* 25: 455-463, 1994.
- 022 **Chung KF.** Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J. Suppl.* 34: 50s-59s, 2001.

- 023 **Sugiyama Y, Kasahara T, Mukaida N, Matsushima K, Kitamura S.** Chemokines in bronchoalveolar lavage fluid in summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Eur. Respir. J.* 8: 1084-1090, 1995.
- 024 **Sozzani S, Molino M, Locati M, Luini W, Cerletti C, Vecchi A, Mantovani A.** Receptor-activated calcium influx in human monocytes exposed to monocyte chemoattractant protein-1 and related cytokines. *J. Immunol.* 150: 1544-1553, 1993.
- 025 **Antoniades HN, Neville-Golden J, Galanopoulos T, Kradin RL, Valente AJ, Graves DT.** Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5371-5375, 1992.
- 026 **Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL.** Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J. Immunol.* 157: 4602-4608, 1996.
- 027 **Flory CM, Jones ML, Warren JS.** Pulmonary granuloma formation in the rat is partially dependent on monocyte chemoattractant protein 1. *Lab. Invest.* 69: 396-404, 1993.
- 028 **Jones M, Warren J.** Monocyte chemoattractant protein 1 in a rat model of pulmonary granulomatosis. *Lab. Invest.* 66: 498-503, 1992.
- 029 **Chiu BC, Chensue SW.** Chemokine responses in schistosomal antigen-elicited granuloma formation. *Parasite Immunol.* 24: 285-294, 2002.
- 030 **Ichiyasu H, Suga M, Iyonaga K, Ando M.** Role of monocyte chemoattractant protein-1 in *Propionibacterium acnes*-induced pulmonary granulomatosis. *Microsc. Res. Tech.* 53: 288-297, 2001.

- 031 **Holgate ST, Bodey KS, Janezic A, Frew AJ, Kaplan AP, Teran LM.** Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156: 1377-1383, 1997.
- 032 **Kim Y, Sung S, Kuziel WA, Feldman S, Fu SM, Rose CE.** Enhanced airway Th2 response after allergen challenge in mice deficient in CC chemokine receptor-2 (CCR2). *J. Immunol.* 166: 5183-5192, 2001.
- 033 **Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszko A, Krikovzky D, Szabo T, Falus A.** Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 375-381, 2001.
- 034 **Bossink A, Paemen L, Jansen P, Hack E, Thijs L, Van Damme J.** Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood.* 86: 3841-3847, 1995.
- 035 **Jansen PM, van Damme J, Put W, de Jong IW, Taylor FB, Hack CE.** Monocyte chemoattractant protein 1 is released during lethal and sublethal bacteremia in baboons. *J. Infect. Dis.* 171: 1640-1642, 1995.
- 036 **Sylvester I, Suffredini AF, Boujoukos AJ, Martich GD, Danner RL, Yoshimura T, Leonard EJ.** Neutrophil attractant protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human serum. *J. Immunol.* 151: 3292-3298, 1993.
- 037 **Akahoshi T, Wada C, Endo H, Hirota K, Hosaka S, Takagishi K, Kondo H, Kashiwazaki S, Matsushima K.** Expression of monocyte chemoattractant and activating factor in rheumatoid arthritis. Regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum.* 36: 762-771, 1993.

- 038 **Harigai M, Hara M, Yoshimura T, Leonard EJ, Inoue K, Kashiwazaki S.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 69: 83-91, 1993.
- 039 **Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM.** Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *Clin. Invest.* 90: 772-779, 1992.
- 040 **Gong JH, Ratkay LG, Waterfield JD, Clark-Lewis I.** An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J. Exp. Med.* 186: 131-137, 1997.
- 041 **Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ.** Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell.* 2: 275-281, 1998.
- 042 **Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN.** Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.* 88: 1121-1127, 1991.
- 043 **Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K.** Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum. Pathol.* 24: 534-539, 1993.
- 044 **Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D.** Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5252-5256, 1991.

- 045 **Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo I.** Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 394: 894-897, 1998.
- 046 **Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N.** Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 143: 205-211, 1999.
- 047 **Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF.** MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin. Invest.* 103: 773-778, 1999.
- 048 **Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, Takeshita A.** Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-Knockout mice. *Circulation*. 106: 2700-2706, 2002.
- 049 **Kitamoto S, Egashira K.** Gene therapy targeting monocyte chemoattractant protein-1 for vascular disease. *Atheroscler. Thromb.* 9: 261-265, 2002.
- 050 **Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, Mantovani A.** Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab. Invest.* 73: 804-809, 1995.
- 051 **Rovin BH, Doe N, Tan LC.** Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. *Am. J. Kidney Dis.* 27: 640-646, 1996.

- 052 **Chen S, Bacon KB, Li L, Garcia GE, Xia Y, Lo D, Thompson DA, Siani MA, Yamamoto T, Harrison JK, Feng L.** In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by MIP-II. *J. Exp. Med.* 188: 193-198, 1998.
- 053 **Fujinaka H, Yamamoto T, Takeya M, Feng L, Kawasaki K, Yaoita E, Kondo D, Wilson CB, Uchiyama M, Kihara I.** Suppression of anti-glomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WKY rats. *Am. Soc. Nephrol.* 8: 1174-1178, 1997.
- 054 **Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC.** RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J. Exp. Med.* 185: 1371-1380, 1997.
- 055 **Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, Inoue A, Ito MR, Terada M, Hieshima K, Maruyama H, Miyazaki J, Yoshie O, Nose M, Fujita S.** Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 48: 2555-2566, 2003.
- 056 **Izikson I, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD.** Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J. Exp. Med.* 192: 1075-1080, 2000.
- 057 **Kennedy KJ, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW, Karpus WJ.** Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Neuroimmunol.* 92: 98-108, 1998.

- 058 **Nakamura K, Williams IR, 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.
- 059 **Kaneko H, Ogasawara H, Naito T, Akimoto H, Lee S, Hishikawa T, Sekigawa I, Tokano Y, Takasaki Y, Hirose SI, Hashimoto H.** Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 26: 568-573, 1999.
- 060 **Eriksson C, Eneslatt K, Ivanoff J, Rantapaa-Dahlqvist S, Sundqvist KG.** Abnormal expression of chemokine receptors on T-cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 12: 766-774, 2003.
- 061 **Herfarth H, Goke M, Hellerbrand C, Muhlbauer M, Vogl D, Scholmerich J, Rogler G.** Polymorphism of monocyte chemoattractant protein 1 in Crohn's disease. *Int. J. Colorectal Dis.* 18: 401-405, 2003.
- 062 **Brieland JK, Jones ML, Clarke SJ, Baker JB, Warren JS, Fantone JC.** Effect of acute inflammatory 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.
- 063 **Brieland JK, Jones ML, Flory CM, Miller GR, Warren JS, Phan SH, Fantone JC.** Expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by rat alveolar macrophages during chronic lung injury. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 9: 300-305, 1993.

- 064 **Brieland JK, Flory CM, Jones ML, Miller GR, Remick DG, Warren JS, Fantone JC.** Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 12: 104-109, 1995.
- 065 **Colotta F, Borre A, Wang JM, Tattanelli M, Maddalena F, Polentarutti N, Peri G, Mantovani A.** Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 148: 760-765, 1992.
- 066 **Paine R, Rolfe MW, Standiford TJ, Burdick MD, Rollins BJ, Strieter RM.** MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J. Immunol.* 150: 4561-4570, 1993.
- 067 **Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Nagai S, Izumi T.** Type II pneumocytes release chemoattractant activity for monocytes constitutively. *Am. J. Physiol.* 272: L830-837, 1997.
- 068 **Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS.** Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol.* 136: 1229-1233, 1990.
- 069 **Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, 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.
- 070 **VanDamme J, Proost P, Put W, Arens S, Lenaerts J-P, Conings R, Opdenakker G, Heremans H, 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.

- 071 **Yoshimura T, Leonard EJ.** Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of gene JE. *J. Immunol.* 144: 2377-2383, 1990.
- 072 **Ben-Baruch A, Michiel D, Oppenheim J.** Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* 270: 11703-11706, 1995.
- 073 **Maus UA, Koay MA, Delbeck T, Mack M, Ermert M, Ermert L, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Seeger W, 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.
- 074 **Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M.** Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 25: 64-68, 1995.
- 075 **Rollins BJ.** Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today.* 2: 198-204; 1996.
- 076 **Yoshimura T, Leonard EJ.** Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J. Immunol.* 145: 292-297, 1990.
- 077 **Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ.** Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 187: 601-608, 1998.

- 078 **Muller WA.** New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J. Exp. Med. Commentary.* 194: F47-F51, 2001.
- 079 **Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA.** Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3652-3656, *Immunology*, 1994.
- 080 **Proudfoot A.** Chemokine receptors: Multifaceted therapeutic targets. *Nature Reviews. Immunology.* 2: 106-115, 2002.
- 081 **Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot A, Plachý J, Brühl H, Frink M, Anders H, Vielhauer V, Pfirstinger J, Stangassinger M, Schlöndorff D.** Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J. Immunol.* 166: 4697-4704, 2001.
- 082 **Gunn MD, Nelken NA, Liao X, 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.
- 083 **Fuentes ME, Durham SK, Swerdel MR, Lewin AC, Barton DS, Megill JR, Bravo R, 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.
- 084 **Grewal IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, Rollins BJ.** Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulitis without diabetes. *J. Immunol.* 159: 401-408, 1997.
- 085 **Locati M, Zhou D, Luini W, Evangelista V, Mantovani A, Sozzani S.** Rapid induction of arachidonic acid release by monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. *J. Biol. Chemistry.* 269: 4746-4753, 1994.

- 086 **Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M.** Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78: 1112-1116, 1991.
- 087 **Warren JS, Jones ML, Flory CM.** Analysis of monocyte chemoattractant protein 1-mediated lung injury using rat lung organ cultures. *Am. J. Pathol.* 143: 894-906, 1993.
- 088 **Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT.** Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 148: 2423-2428, 1992.
- 089 **Vaddi K, Newton RC.** Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J. Immunol.* 153: 4721-4732, 1994.
- 090 **Allavena P, Bianchi G, Zhou D, Van Damme J, Jilek P, Sozzani S, Mantovani A.** Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur. J. Immunol.* 24: 3233-3236, 1994.
- 091 **Kuziel W, Morgan S, Dawson T, Griffin S, Smithies O, Ley K, 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, *Immunology*, 1997.
- 092 **Boring L, Gosling J, Monteclaro F, Lulis J, Tsou CL, Charo I.** Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein 1) and murine macrophage inflammatory protein 1 α receptors: evidence for two closely linked C-C chemokine receptors on chromosome 9. *J. Biol. Chem.* 271: 7551-7558, 1996.

- 093 **Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, 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.
- 094 **Baggiolini M, Dewald B, Moser B.** Human chemokines: An Update. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 675-705, 1997.
- 095 **Sica A, Saccani A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A.** Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J. Exp. Med.* 185: 969-974, 1997.
- 096 **Penton-Rol G, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Mancinelli R, Sica A, Sozzani S, Mantovani A.** Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN- γ . *J. Immunol.* 160: 3869-3873, 1998.
- 097 **Xu L, Rahimpour R, Ran L, Kong C, Biragyn A, Andrews J, Devries M, Wang JM, Kelvin DJ.** Regulation of CCR2 chemokine receptor mRNA stability. *J. Leukoc. Biol.* 62: 653-660, 1997.
- 098 **Maus U, von Grote K, Kuziel WA, Mack M, Miller EJ, Cihak J, Stangassinger M, Maus R, Schlöndorff D, Seeger W, 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.
- 099 **Lewis CE, McGee JO'D.** The Macrophage. The natural immune system. *IRL Press at Oxford university press*, 1992.

- 100 **Maus U, Herold S, Muth H, Maus R, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rosseau S, Seeger W, Grimminger F, Lohmeyer J.** Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280: L58-L68, 2001.
- 101 **Maus U, Huwe J, Maus R, Seeger W, 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.
- 102 **Patterson AM, Schmutz C, Davis S, Gardner L, Ashton BA, Middleton J.** Differential binding of chemokines to macrophages and neutrophils in the human inflamed synovium. *Arthritis Res.* 4: 209-214, 2002.
- 103 **Chignard M, Balloy V.** Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: L1083-1090, 2000.
- 104 **Wagner JG, Roth RA.** REVIEW: Neutrophil migration during endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology.* 66: 10-24, 1999.
- 105 **Maus UA, Waelsch K, Kuziel WA, Delbeck T, Mack M, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Seeger W, 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.
- 106 **Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R.** Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* 186: 1757-1762, 1997.

-
- 107 **Boring L, Gosling J, Chensue S, Kunkel S, Farese R, Broxmeyer H, Charo I.** Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 100: 2552-2561, 1997.
- 108 **Fantuzzi L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F, Gessani S.** Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood.* 94: 875-83, 1999.
- 109 **Sibille Y, Reynolds HJ.** Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 471-501, 1990.
- 110 **Forlow SB, Schurr JR, Kolls JK, Bagby GJ, Schwarzenberger PO, Ley K.** Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood.* 98:3309-3314, 2001.
- 111 **Vozzelli MA, Mason SN, Whorton MH, Auten Jr RL.** Antimacrophage chemokine treatment prevents neutrophil and macrophage influx in hyperoxia-exposed newborn rat lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286: L488-493, 2004.
- 112 **Blease K, Mehrad B, Standiford T, Lukacs N, Gosling J, Boring L, Charo I, Kunkel S, Hogaboam C.** Enhanced pulmonary allergic responses to aspergillus in CCR2 $-/-$ Mice. *J. Immunol.* 165: 2603-2611, 2000.
- 113 **Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, Martinez-A C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC.** The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 188: 157-167, 1998.

- 114 **Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda N.** Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am. J. Pathol.* 156, 1951-1959, 2000.
- 115 **Peters W, Scott H, Chambers H, Flynn J, Charo I, Ernst J.** Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 7958-7963, 2001.
- 116 **Huffnagle G, Strieter R, Standiford T, McDonald R, Burdick M, Kunkel S, Toews G.** The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4⁺ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol.* 155: 4790-4797, 1995.
- 117 **Gupta S, Feng L, Yoshimura T, Redick J, Fu S, Rose C.** Intra-alveolar macrophage-inflammatory peptide 2 induces rapid neutrophil localization in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 656-663, 1996.

8 Anhang

8.1 Verwendete Lösungen

PBS 1-fach (-/-)	PBS 1: 10 verdünnt mit Aqua. dest.	10 fach (-/-)
PBS/ EDTA als Spülflüssigkeit bei bronchoalveolärer Lavage	PBS EDTA-Versen pH	1-fach (-/-) 5 mM 7,2
Waschpuffer für Immunfluoreszenz/ FACS	PBS Mausserum	1-fach (-/-) 5 %
Verdünnung für Antikörper	PBS Mausserum	1-fach (-/-) 10 %

8.2 Materialien und Bezugsquellen

Abbocath 26 G Venenverweilkatheter	Abbott, D-Wiesbaden
Ammoniumchlorid	Sigma, D-München
anti-CCR2-Antikörper	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Matthias Mack, D- Universität Regensburg
anti-F4/80 Antikörper; purified oder FITC-konjugiert (Ratte-anti- Maus-Antikörper)	Serotec, D-München
anti-Gr-1-Antikörper (Ratte-anti-Maus- Antikörper)	Pharmingen, BD Biosciences, D- Heidelberg
Aqua destillata	Pharmacia & Upjohn, D- Erlangen
BALB/c Wildtypmäuse	Charles River, D-Sulzfeld
Bepanthen Augensalbe	Hoffmann-LaRoche, D- Grenzach-Whylen
Blutprobenröhrchen mit EDTA	KABE Labortechnik, D- Nürnberg
Calibrite Beads	BD Biosciences, D-Heidelberg
CCL2 (murin, rekombinant)	R&D Systems, D-Wiesbaden

Clodronate	Sigma, D-München
EDTA-Versen	Biochrom AG, D-Berlin
Einwegmaterial aus Polypropylen, Polyethylen, Polystyren	Eppendorf, D-Hamburg; Falcon, BD Biosciences, D- Heidelberg; Costar, D-Bodenheim
Ethanol 100%	Riedel-deHaen, D-Seelze
Ethanol, 70%	Fischer, D-Saarbrücken
F(ab) ₂ -Fragment, PE-markiert; Ziege-anti-Ratte IgG: RPE	Serotec, D-München
F(ab') ₂ -Fragment, biotinyliert; Kaninchen-anti-Ratte IgG (H+L)	Dianova, D-Hamburg
Faden, Vicryl, 4.0 und 6.0	Johnson & Johnson Intl, Belgien
Fc-Block (CD16/CD32)	Pharmingen, BD Biosciences, D- Heidelberg
FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco, D-Karlsruhe
Forene® (Isofluran)	Abbott, D-Wiesbaden
Giemsa-Lösung	Merck, D-Darmstadt
Kanülen, steril	BD-Biosciences, D-Heidelberg

Ketavet® (Ketaminhydrochlorid, 100mg/ml)	Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen
Leibovitz L15-Medium	Gibco, D-Karlsruhe
LPS	Sigma, D-München
Maus TNF- α ELISA-Kit	R&D Systems, D-Wiesbaden
Mausserum	Serotec, D-München
May-Grünwald-Lösung	Merck, D-Darmstadt
Mikrotiterplatten, flexibel	Falcon, BD-Biosciences, D-Heidelberg
Natriumchloridlösung (0,9%)	Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen, Braun, D-Melsungen
Omnican 30 Spritze (300 μ l, 29 G Kanüle)	Braun, D-Melsungen
Omnifix 100 Spritze (1 ml)	Braun, D-Melsungen
PBS -/- (ohne Ca/ ohne Mg) 10%	PAA, D-Cölbe
PKH26-PCL mit Verdünnungslösung (100% Ethanol, Diluent B)	Sigma, D-München
Rompun® (Xylazinhydrochlorid)	Bayer, D-Leverkusen
RPMI 1640 mit GlutaMAX	Gibco, D-Karlsruhe

Skalpelle, steril	PFM, D-Köln
Softasept® Desinfektionslösung	Braun, D-Melsungen
Streptavidin (PE-konjugiert)	BD Biosciences, D-Heidelberg
Zellsieb, Nylon, 40 µm und 70 µm	BD Biosciences, D-Heidelberg
PBS -/- 10 fach	PAA, D-Cölbe

8.3 Geräte und Herstellernachweis verwendeter Geräte

ELISA-Washer	Tecan, D-Crailsheim
FACStar ^{PLUS} Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA
Lichtmikroskop Leitz Dialux 20	Leitz, D-Wetzlar
Mikropräparierbesteck	Hammacher, D-Solingen; Aesculap, D-Tuttlingen
pH-Meter	Schott, D-Hofheim
Pipetten	Eppendorf, D-Hamburg; Abimed, D-Langenfeld
Plattenphotometer	Molecular Devices, D-Ismaning
Stereomikroskop Leica MS 5	Leica, D-Wetzlar
Vortex	Janke & Kunkel, D-Staufen
Zentrifuge	Heraeus, D-Hanau
Zytozentrifuge	Shandon, D-Frankfurt

8.4 Danksagung

Herrn Dr. Ulrich Maus möchte ich ganz besonders für die experimentelle Betreuung der vorliegenden Arbeit danken. Seine umfassende Einarbeitung, fachliches Wissen, Interesse am Fortschreiten der Arbeit und seine stete Bereitschaft zur Diskussion waren für die Fertigstellung dieser Arbeit unerlässlich.

Herrn Prof. Dr. J. Lohmeyer möchte ich meinen Dank für die Überlassung des interessanten Themas in einer ansprechenden und effektiven Arbeitsgruppe aussprechen.

Frau R. Maus möchte ich sehr herzlich für ihre Hilfe bei der Durchführung der labortechnischen und tierexperimentellen Methoden sowie für das angenehme Arbeitsklima danken.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken für die moralische und computertechnische Unterstützung.

8.5 Veröffentlichungen

Maus UA, Waelsch K, Kuziel WA, Delbeck T, Mack M, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Seeger W, Lohmeyer J. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation. Role of the CCL2-CCR2 Axis. *The Journal of Immunology*. 170: 3273-3278, 2003.

8.6 Lebenslauf

13.11.1976	Geburt in Essen
Eltern:	Dr. med. Martin Waelsch *18.02.1949 Facharzt für Psychiatrie und Psychotherapie
	Irena Waelsch *14.04.1950 Fachärztin für Radiologie
1983 – 1987	Grundschule in Nürtingen und Beuren
1987 – 1996	Max-Planck-Gymnasium Nürtingen
Juni 1996	Abitur
Oktober 1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
September 1998	Physikum
August 1999	Staatsexamen; erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
September 1999 bis März 2000	Auslandssemester an der Universität von Padua, Italien
Juni 2001 bis Herbst 2002	Beginn der experimentellen Doktorarbeit im Sonderforschungsbereich 547 (Sprecher: Prof. Dr. Werner Seeger) der Justus-Liebig Universität Gießen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Lohmeyer/ Dr. U. Maus.
September 2002	Staatsexamen; zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 2003 bis September 2003	Praktisches Jahr am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen und am Bürgerspital Solothurn, Schweiz.
27. November 2003	Staatsexamen; dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
November 2003 bis April 2004	Arbeit an der Dissertation

April 2004	Beginn des Arzt-im-Praktikum in der Abteilung Kardiologie des Sankt-Katharinen-Krankenhauses, Frankfurt am Main (Leiter: Prof. Dr. med. Horst Sievert)
1. Oktober 2004	Approbation
seit Oktober 2004	Assistenzärztin in der Abteilung Gastroenterologie des Sankt-Katharinen-Krankenhauses, Frankfurt am Main (Chefarzt: Dr. med. Klaus Strobel)

8.7 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.“

Katharina Waelsch

Dezember 2005