ENDOTOXIN-VERMITTELTE REGULATION DER EXPRESSION VON CHEMOKINEN IN ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLUNGEN IM VERGLEICH ZUR BASALEXPRESSION IN VERSCHIEDENEN ORGANSYSTEMEN IN RATTE UND MENSCH

MAHYAR LAVAE-MOKHTARI

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Endotoxin-vermittelte Regulation der Expression von Chemokinen in isoliert perfundierten Rattenlungen im Vergleich zur Basalexpression in verschiedenen Organsystemen in Ratte und Mensch

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

vorgelegt von

Lavae-Mokhtari, Mahyar
aus Teheran

Gießen 2006

Aus dem medizinischen Zentrum für Pathologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. A. Schulz

Gutachter: PD Dr. L. Ermert

Gutachter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Tag der Disputation: 05.04.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Material und Methoden 8
   2.1. Material 8
      2.1.1. Probengewinnung und Aufbereitung 8
      2.1.2. Probenverarbeitung 9
   2.2. Methoden 9
      2.2.1. Reagenzien 9
      2.2.2. Immunhistologie 10
      2.2.3. Auswertung (Mikroskopie, digitale Bilddokumentation, Analysen und Statistik) 11
      2.2.4. Abkürzungen 13
3. Ergebnisse 14
   3.1. C-C-Chemokine (MIP-1 alpha, MIP-1 beta, RANTES, MCP-1, EOTAXIN) 14
      3.1.1. Immunlokalisation der Chemokine unter physiologischen Bedingungen in Rattenlungen und humanen Lungen 14
      3.1.2. Chemokinexpression unter LPS-Einwirkung 16
      3.1.3. Immunlokalisation der Chemokine in weiteren Rattenorganen und humanen Organen unter physiologischen Bedingungen 22
   3.2. C-C-Chemokinrezeptoren (CCR-1, CCR-2B, CCR-3, CCR-4, CCR-5) 26
      3.2.1. Immunlokalisation der Chemokinrezeptoren unter physiologischen Bedingungen in Rattenlungen und humanen Lungen 26
      3.2.2. Chemokinrezeptorexpression unter LPS-Einwirkung 28
      3.2.3. Immunlokalisation der Chemokinrezeptoren in weiteren Rattenorganen und humanen Organen unter physiologischen Bedingungen 32
4. Diskussion 36
   4.1. Verteilung von Chemokinen und Rezeptoren in Lungen von Ratte und Mensch 36
   4.2. Regulation und Verteilung der Chemokine und Rezeptoren unter Endotoxinwirkung 41
   4.3. Verteilung von Chemokinen und Rezeptoren in Organsystemen von Ratte und Mensch 47
5. Zusammenfassung und Ausblick 50
6. Mögliche Therapiekonzepte der Blockade von Chemokinen und/oder ihrer Rezeptoren – Erste erfolgversprechende Ansätze 54
7. Literaturverzeichnis 58
8. Bildtafeln 69
9. Anhang 72
10. Nachwort und Danksagung 92
11. Lebenslauf 93

1. Einleitung

Die akute respiratorische Insuffizienz (ARDS) ist ein häufiges letales Krankheitsbild auf Intensivstationen. Das akute Lungenversagen entsteht nach Einwirkung unterschiedlicher Noxen. Am häufigsten entwickelt es sich nach einer Sepsis und geht mit einem nicht kardiogenen Lungenödem einher. In den USA erkranken etwa 150.000 Personen jährlich an ARDS. Die Letalität liegt bei 50 % (Schettler und Greten, 1998).

Bakterielle Pathogenitätsfaktoren sind unter anderem Toxine, zum Beispiel Endo- und Exotoxine. Dabei scheinen in der Immunregulation proinflammatorische Mediatoren, unter anderem Chemokine, eine wesentliche Bedeutung zu haben. Chemokine gelten als Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 10 kDa (Wells et al., 1996) und bilden als proinflammatorische Proteine eine Untergruppe der Zytokine.

Als kleine basische Proteine setzen sie sich aus 70-100 Aminosäuren zusammen. Sie enthalten vier konservierte Cysteine, die zwei Disulfidbrücken bilden, wodurch sie eine hohe Stabilität erhalten (Baggiolini et al., 2000). Der für die biologische Aktivität wichtige N-Terminus ist kurz und flexibel, während der C-Terminus aus einer alpha-Helix besteht.

Die Chemokine werden aufgrund der Sequenzhomologie in vier Untergruppen unterteilt. Entscheidend ist dabei die Lage der vier konservierten Cysteine. Bei Alpha- oder CXC-Chemokinen sind die ersten Cysteinreste durch eine Aminosäure getrennt, während bei den CC- oder Beta-Chemokinen die beiden ersten Cysteinreste miteinander direkt benachbart sind. Beim C-Chemokin fehlen zwei der vier Cysteinreste und schließlich besitzen CX3C-Chemokine drei Aminosäuren zwischen den ersten zwei Cysteinresten (Luster et al., 1997 und Lee et al., 1999).

Chemokine spielen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle in der Regulation der Leukozytenmigration (Proost et al., 1996). Es ist bekannt, dass sie chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten,

natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten wirken (Proost et al., 1996).

Während CC-Chemokine wie MIP-1 alpha, MIP-1 beta, RANTES, MCP-1 und EOTAXIN chemotaktisch auf Makrophagen, Monozyten, T- und B-Lymphozyten, basophile und eosinophile Granulozyten wirken, entfalten CXC-Chemokine wie IL-8, GRO-alpha, IP-10, MIG und PF-4 ihre Wirkung mehr auf neutrophile Granulozyten (Berkman et al., 1996, Bazan et al., 1997 und Pan et al., 1997). Weiterhin ist das C-Chemokin Lymphoactin auf die Lymphozyten chemotaktisch wirksam, während das CX3C-Chemokin Fractalkine für die Adhäsion von T-Zellen und Monozyten verantwortlich ist (Bazan et al., 1997 und Pan et al., 1997).

Da Chemokine die Leukozytenmigration unter physiologischen und pathologischen Bedingungen regulieren, übernehmen sie somit auch eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen (Proost et al., 1996). In verschiedenen Studien wurde eine Schlüsselrolle der Chemokine bei der Apoptose, Hämatopoese und Angiogenese beschrieben (Proost et al., 1996). Zudem wurde bei Krankheiten wie HIV, Rheuma, Arthritis, Allergie, kardiovaskuläre Erkrankungen (Arteriosklerose), bakterielle und virale Entzündungen ein durch Chemokine regulierter Pathomechanismus vermutet (Proost et al., 1996).

Aktuelle Forschungen beschäftigen sich mit der Therapie des Bronchialkarzinoms und anderen Krebserkrankungen durch inhibierende Wirkung der CXC-Chemokine, wie IP-10, MIG und PF-4 auf die Neovaskularisierung, welche im Gegensatz zum angiogenetischen Effekt von IL-8 und GRO-alpha steht (Baggiolini et al., 1994 und Keane et al., 2004). MCP-1 scheint in der Pathogenese von Lungenfibrose und Sarkoidose eine Rolle zu spielen und wirkt als potentieller Aktivator von Monozyten und Makrophagen (Paine et al., 1993). Im Rattenmodell zeigte sich bei einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose sowohl immunhistochemisch als auch molekularbiologisch eine erhöhte MCP-1-Expression der Granulozyten und der Alveolarmakrophagen (Zhang et al., 1994 und Sakanashi et al., 1994).

Als eine chronische Erkrankung ist Asthma charakterisiert durch eine Erhöhung der Migration von T-Lymphozyten, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten zum Bronchialepithel. Bei Asthma-Patienten zeigte die immunhistologische Untersuchung von Biopsien eine intensive MCP-1-Sekretion im Bronchialepithel. Auch Makrophagen, Blutgefäße und glatte Muskelzellen produzieren MCP-1 (Sousa et al., 1994, Poston et al., 1992 und Lane et al., 1992). Zusätzlich wurde eine Erhöhung von MCP-1 und MIP-1 beta in bronchoalveolärer Lavage von Patienten mit chronischer Bronchitis beobachtet (Capelli et al., 1999). Außerdem kristallisierte sich eine Rolle von MCP-1 bei rheumatoider Arthritis (Koch et al., 1992) und Psoriasis (Gillitzer et al., 1993) heraus.

MIP-1 alpha wurde als Inhibitor der Hämatopoese in-vitro als auch in-vivo beschrieben (Cook et al., 1996). MIP-1 alpha und MIP-1 beta schienen zusätzlich zu MCP-1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Lungenfibrose zu spielen (Smith et al., 1995). In der Pathogenese der akuten Lungenerkrankung nach intratrachealer LPS-Applikation zeigte sich eine Zunahme der mRNA von MIP-1 alpha in der Lunge mit einer maximalen Generation nach 6 h (Shanley et al., 1995). Bei septischen Patienten ergab sich eine Steigerung von MIP-1 alpha und MIP-1 beta (O'Grady et al., 1999).

Bei einer durch Pneumocystis carinii entstandenen Lungenentzündung wurde im Mausmodell eine erhöhte Transkription von MIP-1 alpha, MIP-1 beta, RANTES und MCP-1 beobachtet. Immunhistochemische Analysen transbronchialer Biopsien von Patienten mit Sarkoidose und idiopathischer Lungenfibrose zeigten eine MIP-1-alpha-Expression bei BALT, den Alveolarmakrophagen und den Fibroblasten (Standiford et al., 1993). Andere Studien wiesen eine Expression von RANTES durch Alveolarmakrophagen bei der Sarkoidose und durch eosinophile Granulozyten und Alveolarmakrophagen bei fibrosierender Alveolitis nach (Petrek et al., 1997).

Ein anderes Chemokin, EOTAXIN, wirkt selektiv auf eosinophile Granulozyten, da diese einen spezifischen Rezeptor für dieses Chemokin besitzen (Harrington et al., 1999). Es stellte sich heraus, dass EOTAXIN und MCP-1

bei der Rekrutierung und Aktivierung von Zellen bei allergischen Reaktionen involviert sind (Luster et al., 1997).

Die Leukozyten erkennen die Chemokine durch Chemokinrezeptoren. Dabei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte 7-Transmembrandomänen-rezeptoren (Baggiolini et al., 2000)**.** Es gibt mehr als 100 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Chemokinrezeptoren sind mit durchschnittlich 350 Aminosäuren eine kleine Untergruppe dieser Rezeptorgruppe (Newton et al., 1997).

Bei den Chemokinrezeptoren ragt der C-Terminus (Carboxylgruppe) ins Zytoplasma und ist für die intrazelluläre Signalübermittlung wichtig, während die N-terminale Domäne (NH2-Gruppe) sich im extrazellulären Raum befindet und die Chemokinbindungsstelle bildet (Luster, 1998 und Charo et al., 2006). Insgesamt sind 10 CC-Chemokin- und 5 CXC-Chemokinrezeptoren bekannt. An den Monozyten wurde der erste CC-Chemokinrezeptor, nämlich CKR-1, entdeckt, welcher nach der neuen Nomenklatur CCR-1 genannt wird.

Als Ligand können sich MIP-1 alpha und RANTES an CCR-1 anlagern. Mittels CCR-2 kann sich MCP-1 selektiv auf Monozyten anlagern. Weiterhin können sich MIP-1 alpha, RANTES und MCP-1 mittels CCR-4 an die Monozyten binden (Chvatchko et al., 2000).

Schließlich fanden sich außer CCR-1, CCR-2, CCR-4 auch CCR-5 auf den Monozyten. An CCR-5 können sich MIP-1 alpha, MIP-1 beta und RANTES binden. Weiterhin fand man heraus, dass basophile Granulozyten den CCR-4 Rezeptor auf der Membran aufweisen. Dies ist der Grund, warum RANTES, MIP-1 alpha und MCP-1 als Ligand für CCR-4 auf diese Zellen wirken können. Die eosinophilen Granulozyten besitzen CCR-1 und den CCR-3-Rezeptor. Dies erklärt die Chemotaxis durch EOTAXIN, ein CC-Chemokin, welches sich selektiv an CCR-3 anlagert (Neote et al., 1993, Murphy et al., 1994, Ben-Baruch et al., 1995, Combadiere et al., 1995, Charo et al., 1994 und Power et al., 1995).

Eine erhöhte Transkription von EOTAXIN und CCR-3 zeigte sich in Hautläsionen der atopischen Dermatitis (Yawalkar et al., 1999). Auch beim

atopischen Asthma fand sich molekularbiologisch und immunhistochemisch eine Steigerung von EOTAXIN und CCR-3. Dabei waren die Endothelzellen eine wesentliche Quelle von EOTAXIN, während die eosinophilen Granulozyten den zugehörigen Chemokinrezeptor, CCR-3, exprimierten (Sun et al., 1997 und Ying et al., 1997). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die CC-Chemokine MIP-1 alpha, MIP-1 beta und RANTES in-vitro suppressiv auf makrophag-tropische HI-Viren wirken. Als Rezeptor für den HI-Virus dient das CD4-Molekül. Als Co-Rezeptor fungiert der Chemokinrezeptor CCR-5 (Cocch et al., 1995, Alkhatib et al., 1996, Deng et al., 1996, Dragic et al., 1996, Rottman et al., 1997, Wu et al., 1997 und Lee et al., 1999).

Weiterhin zeigt sich bei Patienten mit ARDS bei Sepsis eine signifikante Bildung von IL-8 in der bronchoalveolären Lavage. Dabei kann C-X-CR1 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten mit hoher Affinität IL-8 binden. Eine Blockade dieses Rezeptors reduziert die Migration neutrophiler Granulozyten in-vitro (Cummings et al., 1999).

Die klassische „infektiöse“ Definition der Sepsis von Schottmüller 1914 ging von einer systemischen Einschwemmung von Mikroben (Bakterien, Pilzen, Viren, Protozoen) oder von mikrobiellen Produkten (Endo- und Exotoxinen) aus einem oder mehreren Foci aus. Dies zieht eine Aktivierung einer Vielzahl körpereigener Mediatorsysteme (zirkulierend und ortständig, humoral und zellulär) nach sich, mit der Folge inadäquater Gewebsperfusion und diffuser inflammatorischer Prozesse in großen Bereichen der Mikrozirkulation. Typisch sind Perfusionsfehlverteilung, Mikrothrombosierung und „capillary leakage“ mit Flüssigkeitsextravasation in diesen Arealen. Aufgrund dieser lokalen mikrozirkulatorischen Störungen resultiert trotz aufrechterhaltener Makrozirkulation eine Sauerstoffschuld der abhängigen organtypischen Zellen. Das Endstadium stellt das septische Multiorganversagen dar. Dabei haben Zytokine eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der Sepsis. Sie werden von Leukozyten, Endothelzellen und anderen immunologisch kompetenten Zellen synthetisiert und sezerniert. Außerdem besitzen die Zytokine eine para- und autokrine Wirksamkeit. So gehören Zell-Zell-Kommunikation bei immunologischen/inflammatorischen Prozessen, die Steuerung der Proliferation und

die Differenzierung von Leukozyten zu ihrer Funktion. Zytokine können sowohl ein proinflammatorisches als auch ein antiinflammatorisches Wirkungsprofil besitzen. Sie sind Teil eines hochkomplexen Netzwerkes, das bisher nur bruchstückhaft verstanden wird (Walmrath et al., 1994 und 2001 und Schütte et al., 1997). Es wird angenommen, dass eine Chemokinexpression durch verschiedene Zelltypen in der physiologischen normalen Lunge und der LPS-stimulierten Lunge existiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von Endotoxin-Stimulation auf die Expression von Chemokinen und ihrer zugehörigen Rezeptoren in isolierten Rattenlungen untersucht. Dazu wurde die konstitutive Expression und Verteilung in der Lunge und weiteren Organsystemen von Ratte und – soweit verfügbar – Mensch untersucht.

Die komplette chemische Struktur von LPS war bereits vor 20 Jahren definiert. Lipopolysaccharid(LPS)-Endotoxin ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. Wichtig ist vor allem der Lipid-A-Anteil des LPS für die Aktivierung der Immunreaktion. Anders als die bakteriellen Exotoxine fungiert LPS als ein Warnsignal für den Wirtorganismus, welcher die Synthese proinflammatorischer Substanzen anregt und so die Immunreaktion als Antwort auf eine Infektion auslöst (Ulevitch, 1999). Dabei kann LPS erst an ein Lipidtransferprotein im Plasma (LBP) gebunden werden, welches die LPS-Monomere von der Bakterienmembran zur Bindungsstelle von CD-14 transportiert. CD-14 ist ein Protein, welches sowohl gelöst im Plasma als auch als ein Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-gekoppeltes Protein auf der Oberfläche von Leukozyten existiert (Wright, 1999). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung einer Endotoxin-Stimulation auf die Expression von Chemokinen und ihrer zugehörigen Rezeptoren in isolierten Rattenlungen mit und ohne Plasmazugabe zum Perfusat untersucht.

Speziellen LPS-Rezeptoren, den Toll-Like-Rezeptoren, ist es weiterhin möglich, als spezifische Bindungsstelle der zellulären Membran zwischen LPS und wirtseigenen Lipiden zu differenzieren. LPS verursacht dann über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-kappaB eine Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1, IL-6, IL-8 und Adhäsions-

molekülen wie ICAM-1. Dabei ist TLR4 die spezifische Hauptbindungsstelle für LPS (Wright, 1999). Weitere Studien an TLR4-Knockout Mäusen zeigten zudem eine fehlende Reaktion der Makrophagen und der B-Lymphozyten auf LPS (Hoshino et al., 1999). TLR4 ist der erste beschriebene LPS-Rezeptor, der ein Signal intrazellulär vermitteln kann.

TLR2 scheint andererseits als Schlüsselbindungsstelle auf eine Infektion durch andere pathogene Keime (grampositive Bakterien) zu fungieren (Ulevitch, 1999). Bei Säugetieren wurden zehn TLR-Proteine identifiziert, welche unterschiedliche Aufgaben bei der Immunabwehr aufweisen (Medhitov, 2001). Weiterhin ließ sich das Gen für den TLR4-Rezeptor auf Chromosom 4 lokalisieren (Quershi et al., 1999). Es ist bekannt, dass eine LPS-induzierte Atemwegsobstruktion mit einer bronchoepithelialen Aktivierung und einer Aktivierung der Makrophagen einhergeht, die eine Produktion proinflammatorischer Zytokine und eine Chemotaxis neutrophiler Granulozyten zur Folge hat (Arbour et al., 2000). Toll-Like-Rezeptoren sind transmembrane Rezeptoren mit einem Leucin-reichen extrazellulären Anteil und einer intrazellulären Toll/IL-1-Rezeptordomäne (Medhitov, 2001). Es zeigte sich, dass eine Mutation der extrazellulären Domäne von TLR4 mit einer abgeschwächten humanen Reaktion auf LPS assoziiert ist (Arbour et al., 2000).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Probengewinnung und Aufbereitung

Es wurden 65 männliche CD-Ratten (Charles River, D-Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 350-400 g verwendet. Es erfolgte eine perkutane intraperitoneale Applikation von Pentobarbital-Na. Nach lokaler Anästhesie mit 2 % Xylocain folgte eine mediane Thorakotomie mit Entnahme der Lunge für Versuche im Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge. Zusätzlich wurden Thymus und die Herzspitze entfernt. Nach medianer Laparatomie wurden dann Magen und Darm, Milz, Leber, Pankreas und Niere entnommen. Zusätzlich wurden die Schilddrüse, Speicheldrüsen und Anteile der Trachea entfernt sowie Hautstücke aus dem Abdominalbereich reserziert.

Die Lungen wurden im Rahmen parallel durchgeführter Dissertationsarbeiten im isolierten Organmodell über maximal 2 h perfundiert. In verschiedenen Versuchsgruppen (je n=5 pro Gruppe) wurden jeweils unterschiedliche Mengen LPS (50, 1.000, 10.000 ng/ml) in das Perfusat appliziert. Die Versuche wurden jeweils mit und ohne Zugabe von 1,5 % Plasma in das Perfusat durchgeführt. Die Perfusion und Ventilation der Lungen wurde entweder 1 h oder 2 h nach LPS-Applikation beendet und die Lungen wurden anschließend für die histologische Weiterbearbeitung asserviert.

Humanes Lungengewebe sowie weitere humane Gewebsproben aus anderen Organsystemen wurden soweit möglich entsprechend den bei Ratten entnommenen Organen von Sektionsmaterial und nativen Gewebsproben nach operativen Eingriffen gewonnen.

Das entnommene Gewebe wurde zunächst bei -20°C aufbewahrt. Zur weiteren Verarbeitung wurden 10 µm-Schnitte angefertigt, die dann bei -80°C gelagert wurden. Vor der immunhistologischen Untersuchung erfolgte eine Überprüfung der morphologischen Intaktheit der Kryoschnitte nach einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung.

2.1.2. Probenverarbeitung

Rattenlungen wurden nach Versuchsende mit OCT/TissueTek instilliert und in N_2 eingefroren. Gewebeproben von Ratten und humanen Organen wurden in OCT/TissueTek eingebettet und eingefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert. Es wurde eine Präparation der Rattenlungen in Gewebeblöcke von allen Lungenlappen durchgeführt. Bei -20°C erfolgte die Mikrotomie mit einem Kryostat (Leica CM 3050, Leica Instruments GmbH und Bright Instruments Company LTD, Huntingdon England). Die Schnittdicke betrug 10 µm. In Abständen erfolgte eine morphologische Begutachtung des Präparates auf dem Objektträger unter einem Mikroskop (Ortholux, Ernst Leitz GmbH, Wetzlar). Die Objektträger waren zuvor zur Steigerung der Gewebsadhäsion auf dem Objektträger mit einer Poly-Lysin- (Sigma Immuno Chemicals, P 8920) und Aqua-Bidest-Mischung beschichtet worden. Durch diese Methode erreicht man eine Steigerung der Gewebsanheftung durch elektrostatische Kräfte. Zur mikroskopischen Begutachtung der Gewebestrukturen wurde eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung (Hämatoxilin: Shandon USA, Cat. No. 9990107, Eosin Aqueous: Sigma Immuno Chemicals HT-110-2-80) oder eine Kernechtrot-Färbung (Merck 115. 939) nach Standardtechnik durchgeführt.

2.2. Methoden

2.2.1. Reagenzien

Alle verwendeten Primärantikörper gegen MIP-1 alpha, MIP-1 beta, RANTES, MCP-1, EOTAXIN, CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-4 und CCR-5 wurden von der Firma Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) erworben. Die polyklonalen IgG-Antikörper aus der Ziege oder dem Kaninchen waren nicht kreuzreagierend und erkannten jeweils ein spezifisches Epitop des Zielproteins. Alle Primärantikörper waren kreuzreagierend mit humanem Gewebe und Rattengewebe. Die Sekundärantikörper wurden als F(ab)2-Fragmente von der Firma Biotrend (Köln, Deutschland) bezogen.

Zudem wurden von der Firma Camon (Wiesbaden, Deutschland) das VectorRed-Färbekit und das TMB-Färbekit bestellt. Alle weiteren Farbstoffe und Laborchemikalien wurden über die Firmen Sigma (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.2.2. Immunhistologie

Die Schnitte wurden für 5 min in 3 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS 0,01 M + 150 mM NaCL, pH 7,6) für dreimal 5 min gespült. Anschließend erfolgte über 15 min eine Behandlung in Triton-1%-(Triton X 100, Sigma USA)-Lösung. Damit erreicht man eine höhere Membrandurchlässigkeit. Die Schnitte wurden nun mit einem Blockiermedium beschichtet, welches ein unspezifisches Serum (Tierspezies je nach Antikörper), 1 % BSA (Rinderserumalbumin) und 0,05 % Tween-20 enthielt. Mit dem Blockiermedium wird eine unspezifische Anlagerung des Primärantikörpers verhindert.

Nach Beschichtung mit dem Primärantikörper in einem Verdünnungsmedium aus PBS 0,01 M, 1 % BSA und 0,05 % Tween-20 (Konzentrationen für MIP-1 alpha 1:100, MIP-1 beta 1:50, RANTES 1:100, MCP-1 1:50, EOTAXIN 1:50 und CCR-1/2/3/4/5 jeweils 1:50) wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Spülen der Schnitte in Pufferlösung wurden diese mit alkalischer-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpern in den jeweiligen Konzentrationen (anti-Ziege 1:2.000, anti-Kaninchen 1:4.000) beschichtet und wiederum bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in PBS 0,01 M gespült. Es erfolgte nun eine Inkubation mit der Substratlösung VectorRed und 25 mM Levamisollösung zur Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase in den Gewebsproben, bis die Färbereaktion deutlich positiv wurde. Beim Nachweis der CC-Chemokinrezeptoren wurde eine 50 mM Levamisollösung benutzt.

Die Gegenfärbung erfolgte für 20 min mit Methylgrün. Während die Zellkerne unter dem Lichtmikroskop grün erschienen, zeigte das Zytoplasma bei positiver Immunreaktion eine rote Färbung.

Es wurden Kontrollen jeweils ohne Inkubation des Primärantikörpers und ohne Primär- und Sekundärantikörper bei allen Färbungen mitgeführt. Damit konnte jeweils die spezifische Anlagerung des Sekundärantikörpers und die erfolgreiche Blockade der endogenen Phosphatase durch die Levamisol-lösung gesichert werden.

In Duodenum und Ileum finden sich große Mengen endogener Phosphatase, so dass bei diesen Organen eine Peroxidasefärbung durchgeführt wurde. Die Niere wurde wahlweise mit VectorRed oder mit der TMB-Lösung gefärbt.

Bei der immunhistologischen Färbung über eine Peroxidasereaktion wurden die Schnitte zusätzlich vor Inkubation mit dem Blockiermedium für 30 min in 1,5 % H_2O_2-Lösung inkubiert. Die Konzentrationen und Inkubations-bedingungen mit Primärantikörpern entsprachen der bereits beschriebenen Methode. Die Färbereaktion wurde mit der Substratlösung TMB durchgeführt. Die Gegenfärbung erfolgte hierbei mit Kernechtrot. Bei jeder Färbereihe wurden wie bei VectorRed-Färbung zwei Kontrollschnitte mitgeführt. Die Zellkerne erschienen rot, das Zytoplasma bei positiver Immunreaktion blau-violett.

2.2.3. Auswertung (Mikroskopie, digitale Bilddokumentation, Analysen und Statistik)

Die Auswertung erfolgte semiquantitativ anhand einer 5-Punkteskala (0 = keine, 1 = sehr schwache, 2 = schwache, 3 = mäßige, 4 = starke, 5 = sehr starke Färbung) mit einem Lichtmikroskop (Ortholux) der Firma Leitz Wetzlar. Es wurden komplette Querschnitte der Rattenlungen (n = 5) pro experimenteller Gruppe untersucht. Die Dokumentation der Daten erfolgte rechnergestützt. Die Ergebnisse wurden tabellarisch zusammengefasst. Je nach der Applikationsmenge von LPS (50, 1.000 und 10.000 ng/ml), von Plasma 1,5 % (+/- Plasma) und der Versuchsdauer (2 h oder1 h) ergaben sich elf Versuchsgruppen. Die semiquantitativen Daten wurden in Abhängigkeit von der Versuchsdauer, der LPS-Dosierung und der Plasmazugabe analysiert und graphisch dargestellt.

Eine Gesamttabelle für einzelne Kompartimente der untersuchten Rattenlungen und der humanen Lunge ermöglichte eine Gesamtaussage über Lokalisationen von Chemokinen und Chemokinrezeptoren. Eine vergleichbare Gesamttabelle verdeutlicht zudem die zellulären Lokalisationen der Chemokine und ihrer zugehörigen Rezeptoren in den untersuchten Rattenorganen und humanen Organen.

Die digitale Bilddokumentation erfolgte mit einem Leitz Orthoplan Lichtmikroskop. An diesem war eine Leaf Microlumina Kamera mit einem Orthoplan Microlumina 2,5x Kameraadapter angebracht. Die Auflösung der Microlumina Kamera betrug 2496x1665 Pixel. Die Bildarchivierung erfolgte in einer Bilddatenbank, in der alle wesentlichen Informationen zu den entsprechenden Bildern dokumentiert wurden. Eine Sortierung erfolgte nach Antikörper oder Rezeptor, der Spezies und dem Organ.

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Studenten-T-Test für ungleiche Paare. Die Signifikanzwerte wurden nach $p<0,05$ (*) als signifikant, $p<0,01$ (**) als hoch-signifikant und $p<0,001$ (***) als höchst-signifikant eingeteilt. Die graphische Darstellung erfolgte mit der Software Microsoft Excel.

2.2.4. Abkürzungen

ARDS:	Acute respiratory distress syndrome
AIDS:	Acquired immune deficiency syndrome
BALT:	Bronchus-associated lymphoid tissue
BAL:	Bronchoalveolare Lavage
B-Lymphocyte:	Bursa-derived lymphocyte
BSA:	Bovine serum albumine
COPD:	Chronic obstructive pulmonary disease
Chemokine:	Chemotactic cytokine
CD-Ratten:	Charles River-, D-Sulzfeld-Ratten
CCR:	Chemokinrezeptor
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F.:	Färbung
HE:	Hämatoxilin-Eosin
IL:	Interleukin
IHC:	Immunhistochemie
IPF:	Idiopathische Lungenfibrose
ISH:	In-situ-Hybridisierung
IgG:	Immunglobulin
IL-8:	Interleukin-8
LPS:	Lipopolysaccharide
LBP:	LPS-bindendes Protein
MIP-1 alpha:	Macrophage inflammatory Protein alpha
MIP-1 beta:	Macrophage inflammatory Protein beta
MCP-1:	Monocyte chemotactic Protein eins
mRNA:	Messenger Ribonukleinsäure
NF-kappaB:	Nuclear-factor protein B
RANTES:	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RT-PCR:	Real-time polymerase chain reaction
PBS:	Phosphate-buffered saline
PF4:	Platelet factor 4
PFA:	Paraformaldehyd
TLR:	Toll-like-receptor
TNF:	Tumor necrosis factor
T-Lymphocyte:	Thymus derived lymphocyte

3. Ergebnisse

3.1. C-C-Chemokine (MIP-1 alpha, MIP-1 beta, RANTES, MCP-1, EOTAXIN)

3.1.1. Immunlokalisation der Chemokine unter physiologischen Bedingungen in Rattenlungen und humanen Lungen

Unter physiologischen Bedingungen ließen sich die untersuchten C-C-Chemokine und ihre zugehörigen Rezeptoren immunhistologisch sowohl in der Rattenlunge als auch in der humanen Lunge nachweisen. Dabei ließ sich die Proteinexpression zunächst qualitativ in beiden Spezies bestimmten Zellkompartimenten zuordnen. Innerhalb einer Färbung erfolgte eine semi-quantitative Auswertung der rechnerischen Mittelwerte.

Vor allem zeigte sich eine mäßige bis sehr starke bronchoepitheliale Chemokinexpression bei beiden Spezies unter physiologischen Bedingungen (siehe dazu Tabelle 1 und 2 und Bildtafel). Auch das Trachealepithel zeigte bei beiden Spezies eine mäßige bis sehr starke Chemokinexpression (siehe dazu Anhang Tabelle 1 und 3). Begleitet wurde dies in beiden Spezies von einer mäßig bis sehr starken Chemokinexpression peribronchialer Chondrozyten des hyalinen Knorpels und der peribronchialen seromucösen Drüsen (siehe dazu Tabelle 1 und 2). Eine Ausnahme bildete eine schwache MIP-1-alpha-Expression der peribronchialen Chondrozyten.

Bei der Betrachtung des pulmonalen Gefäßsystems zeigte sich mit Ausnahme von MIP-1 alpha eine mäßig bis starke endotheliale Chemokinexpression bei beiden Spezies (siehe dazu Tabelle 1 und 2 und Bildtafel). Weiterhin wiesen speziesüberlappend Lymphozyten und Alveolarmakrophagen eine mäßig bis sehr starke Chemokinexpression auf (siehe dazu Tabelle 1 und 2 und Bildtafel). Eine Ausnahme bildete eine schwache bis fehlende MIP-1-alpha-Expression bei den Lymphozyten. Schließlich zeigten auch die peribronchialen peripheren Nerven bei beiden Spezies überwiegend eine mäßige bis starke Chemokinexpression auf (siehe Anhang Tabelle 1 und 3).

Tabelle 1

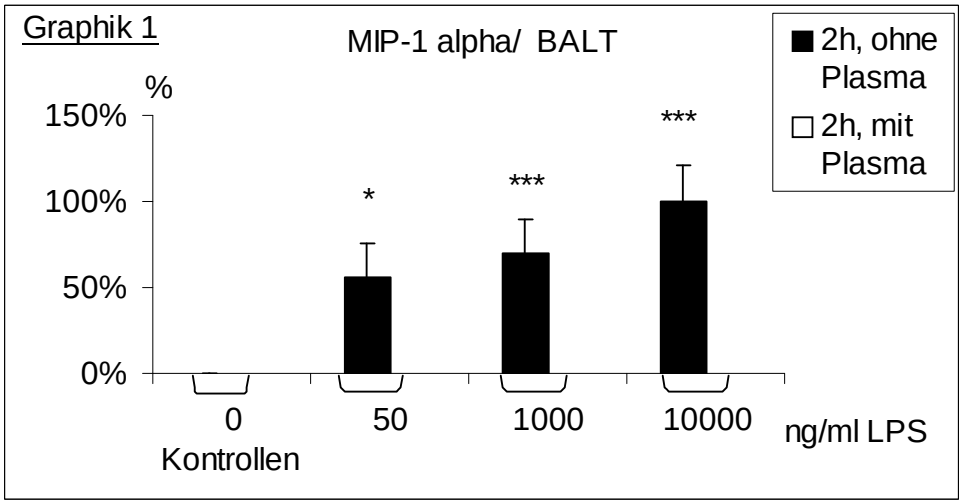
Struktur bei der Ratte	MIP-1 alpha	MIP-1 beta	RANTES	MCP-1	EOTAXIN
proximales Bronchial-epithel	sehr stark	stark	stark	stark	stark
distales Bronchial-epithel	sehr stark	stark	mäßig	stark	mäßig
peribron-chiale Chondro-zyten	schwach	mäßig	stark	stark	sehr stark
peribron-chiale Drüsen	stark	stark	stark	mäßig	sehr stark
Lympho-zyten	keine Färbung	mäßig	stark	sehr stark	stark
Alveolar-makro-phagen	mäßig	stark	stark	sehr stark	stark
Endothel	keine Färbung	stark	mäßig	mäßig	stark

Tabelle 2

Humane Struktur	MIP-1 alpha	MIP-1 beta	RANTES	MCP-1	EOTAXIN
proximales Bronchial-epithel	stark	mäßig	mäßig	mäßig	sehr stark
distales Bronchial-epithel	stark	mäßig	mäßig	mäßig	stark
peribron-chiale Chondro-zyten	schwach	stark	stark	sehr stark	sehr stark
peribron-chiale Drüsen	mäßig	stark	stark	stark	stark
Lympho-zyten	schwach	mäßig	stark	stark	stark
Alveolar-makro-phagen	mäßig	mäßig	stark	stark	stark
Endothel	keine Färbung	stark	mäßig	mäßig	stark

3.1.2. Chemokinexpression unter LPS-Einwirkung

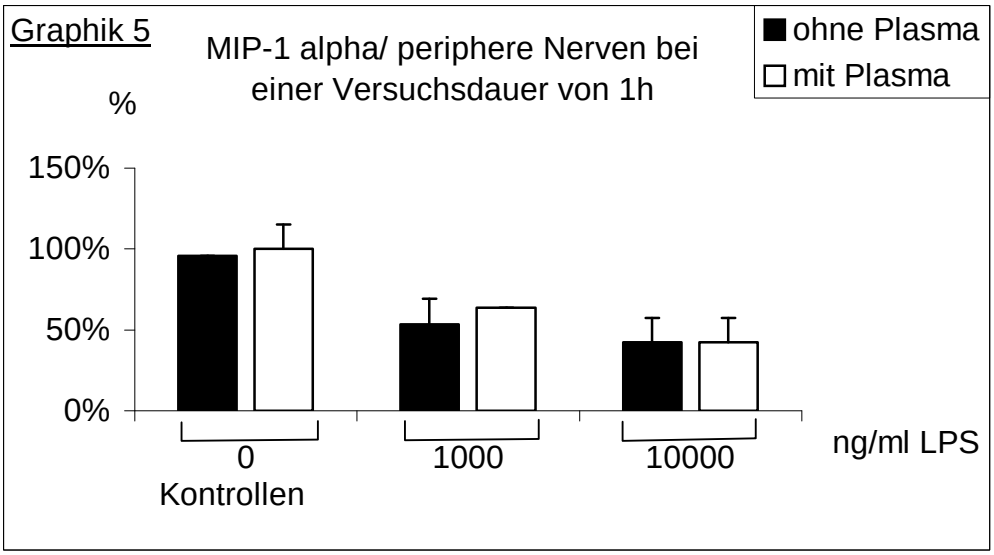
Unter einer Endotoxinstimulation mit LPS kam es bei bestimmten Zelltypen der Rattenlunge zu einer Veränderung der CC-Chemokin-Expression. LPS (50, 1.000, 10.000 ng/ml) wurde jeweils mit oder ohne Plasma 1,5 % bei einer Versuchsdauer von jeweils 1 h oder 2 h in das Perfusat der isolierten Rattenlunge appliziert. Die BALT-Lymphozyten zeigten ohne Plasmazusatz erst unter einer Endotoxinstimulation mit 10.000 ng/ml LPS und nach einer Versuchsdauer von 2 h eine mäßige MIP-1-alpha-Expression (siehe Graphik 1).



Die Alveolarmakrophagen zeigten unter einer Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS eine starke MIP-1-alpha-Färbeintensität, während sie unter physiologischen Bedingungen eine mäßige MIP-1-alpha-Expression zeigten. Dabei wurde die Stimulation unter Plasmazusatz abgeschwächt (siehe Graphik 2 im Anhang). Zudem begünstigte eine längere Versuchsdauer von 2 h die Steigerung der MIP-1-alpha-Expression der Alveolarmakrophagen (siehe Graphik 3 im Anhang).

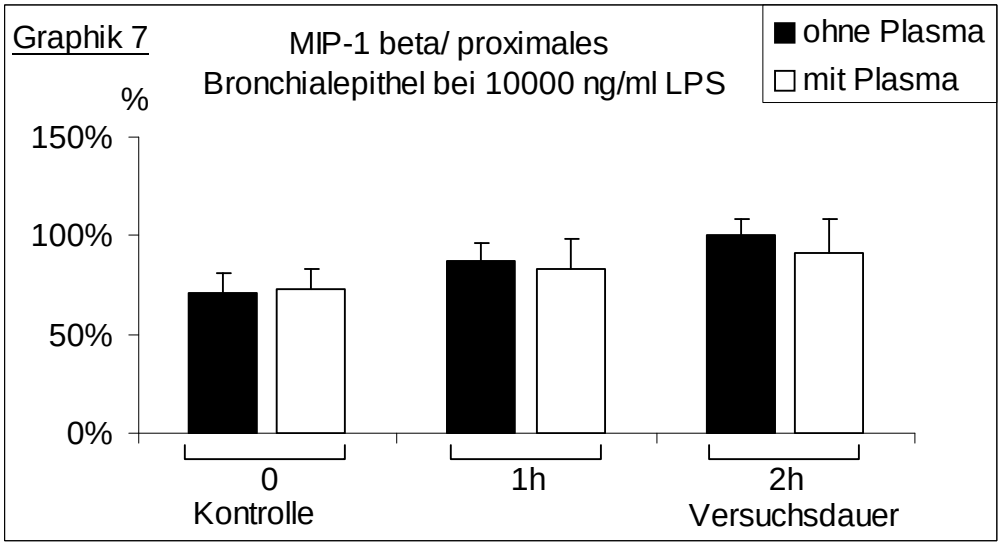
Die Endotoxinstimulation zeigte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die MIP-1-alpha-Expression des proximalen und des distalen Bronchialepithels der Rattenlunge (siehe Graphik 4 im Anhang).

Peribronchiale periphere Nerven zeigten ohne LPS-Stimulation eine mäßige MIP-1-alpha-Färbeintensität. Nach einer Endotoxinstimulation wiesen die peripheren Nerven lediglich eine schwache MIP-1-alpha-Expression auf. Unter Plasmazusatz kam es zu keiner wesentlichen Veränderung (siehe Graphik 5).

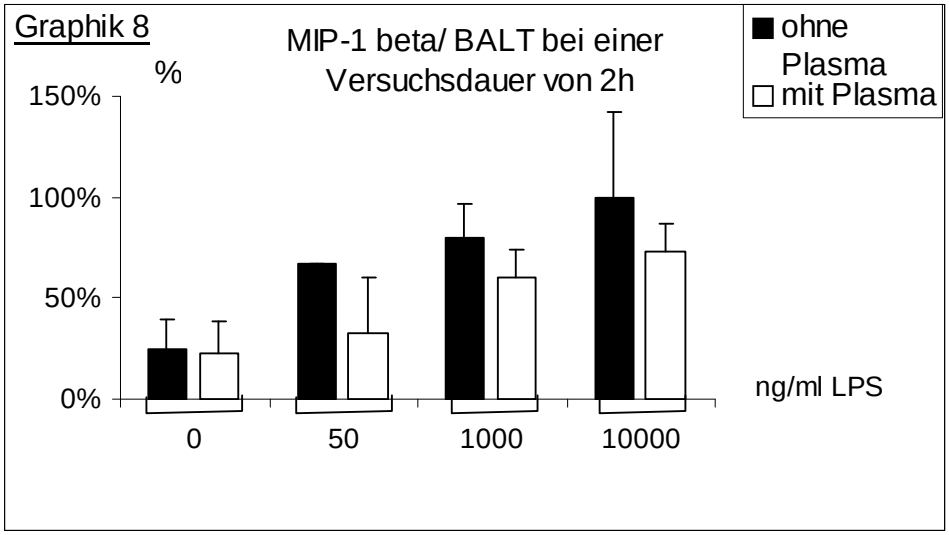


Das proximale Bronchialepithel zeigte unter LPS-Einfluss eine starke MIP-1-beta-Expression (siehe Graphik 6 im Anhang).

Unter einer Endotoxinstimulation mit 10.000 ng/ml LPS zeigte sich nach einer Versuchsdauer von 2 h eine höhere MIP-1-beta-Expression des proximalen Bronchialepithels (siehe Graphik 7).



Die BALT-Lymphozyten, die in der normalen Rattenlunge keine MIP-1-beta-Expression zeigten, wiesen unter LPS-Einfluss eine mäßige MIP-1-beta-Färbeintensität auf.

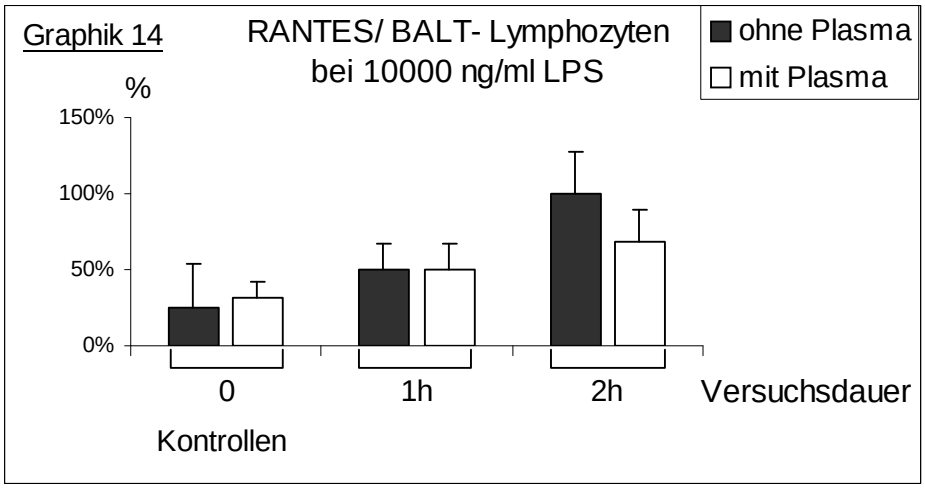


Ohne Plasmazusatz zeigte sich dabei eine höhere MIP-1-beta-Expression (siehe Graphik 8). Die Gewebslymphozyten zeigten nach einer LPS-Stimulation mit einer Versuchsdauer von 2 h eine sehr starke MIP-1-beta-Färbeintensität. Dabei reagierten die Lymphozyten ohne Plasmazugabe stärker (siehe Graphik 9 im Anhang). Bei den Alveolarmakrophagen sank die MIP-1-beta-Expression mit zunehmender Versuchsdauer und steigender LPS-Applikation. Ohne Plasmazugabe war die Abnahme der MIP-1-beta-Expression stärker (siehe Graphik 10 im Anhang). Bei gleicher LPS-Applikation zeigte sich nach einer Versuchsdauer von 2 h eine stärkere Abnahme der MIP-1-beta-Expression der Alveolarmakrophagen (siehe Graphik 11 im Anhang).

Die Endothelzellen zeigten in der normalen Rattenlunge eine mäßige MIP-1-beta-Färbeintensität. Bei einer Endotoxinstimulation mit 1.000 ng/ml LPS zeigten die Endothelzellen der Rattenlunge eine starke MIP-1-beta-Expression. Dabei wirkte die Plasmazugabe hemmend auf die MIP-1-beta-Expression (siehe Graphik 12 im Anhang).

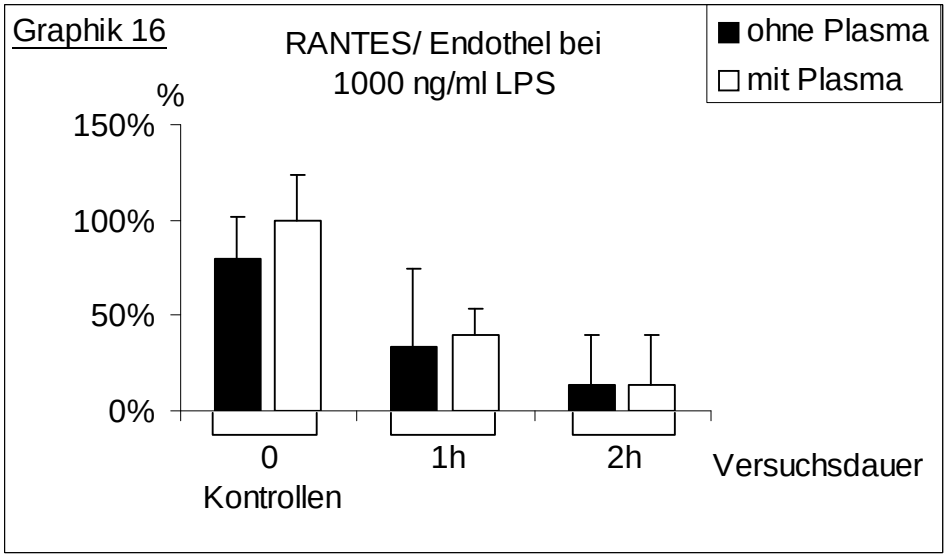
Das Bronchialepithel zeigte nach der LPS-Applikation einen Zuwachs der RANTES-Expression. Dabei verstärkte eine längere Versuchsdauer die

RANTES-Expression. Das proximale und das distale Bronchialepithel der Rattenlunge wiesen nach der Endotoxinstimulation eine sehr starke RANTES-Expression auf (siehe Graphik 13 im Anhang). Eine Endotoxinstimulation steigerte zudem die RANTES-Expression der BALT-Lymphozyten.

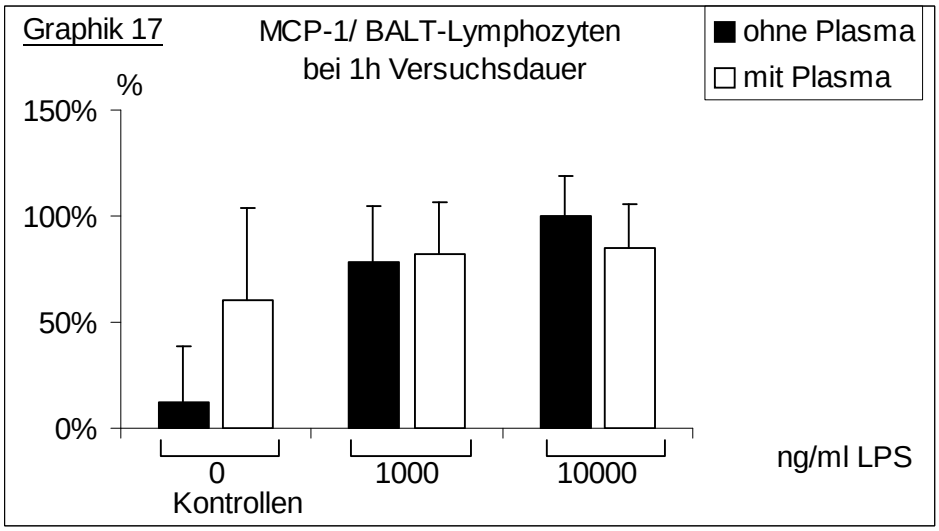


Dies zeigte sich vor allem nach einer Versuchsdauer von 2 h bei der Applikation von 10.000 ng/ml LPS. Dabei wirkte sich 1,5 % Plasma hemmend auf die gestiegene RANTES-Färbeintensität unter Endotoxinstimulation aus (siehe Graphik 14). Weiterhin zeigten die Alveolarmakrophagen nach LPS-Applikation eine sehr starke RANTES-Expression. Dies zeigte sich vor allem nach einer Endotoxinstimulation mit 10.000 ng/ml LPS nach einer Versuchsdauer von 2 h. Plasma 1,5 % hatte dabei keinen wesentlichen Einfluss auf die Steigerung der RANTES-Expression (siehe Graphik 15 im Anhang).

Im Gegensatz zu den BALT-Lymphozyten und den Alveolarmakrophagen nahm die RANTES-Färbeintensität der Endothelzellen unter einer Endotoxin-stimulation deutlich ab. Dies zeigte sich bei einer LPS-Applikation von 1.000 ng/ml und bei einer Versuchsdauer von 2 h. Dabei hatte Plasma 1,5 % keinen wesentlichen Einfluss auf die Abnahme der RANTES-Expression (siehe Graphik 16).



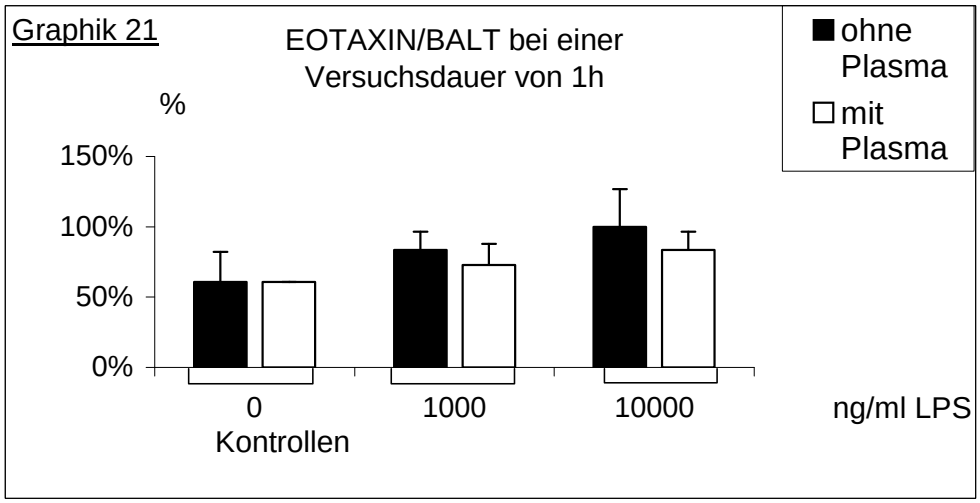
Eine zunehmende Endotoxinstimulation bewirkte weiterhin eine Steigerung der MCP-1-Expression der BALT-Lymphozyten, so dass diese bei Applikation von 10.000 ng/ml LPS nach einer Versuchsdauer von 1 h eine sehr starke MCP-1-Färbeintensität zeigten. Unter Zusatz von Plasma 1,5 % konnte dagegen keine wesentliche stimulierende Wirkung von LPS beobachtet werden (siehe Graphik 17).



Die Endotoxinstimulation mit 10.000 ng/ml LPS verminderte die MCP-1-Expression der glatten Muskulatur teilmuskularisierter Gefäße nach einer Versuchsdauer von 1 h. Diese Abnahme der MCP-1-Expression zeigte sich

sowohl mit als auch ohne Zusatz von Plasma 1,5 % (siehe Graphik 18 im Anhang).

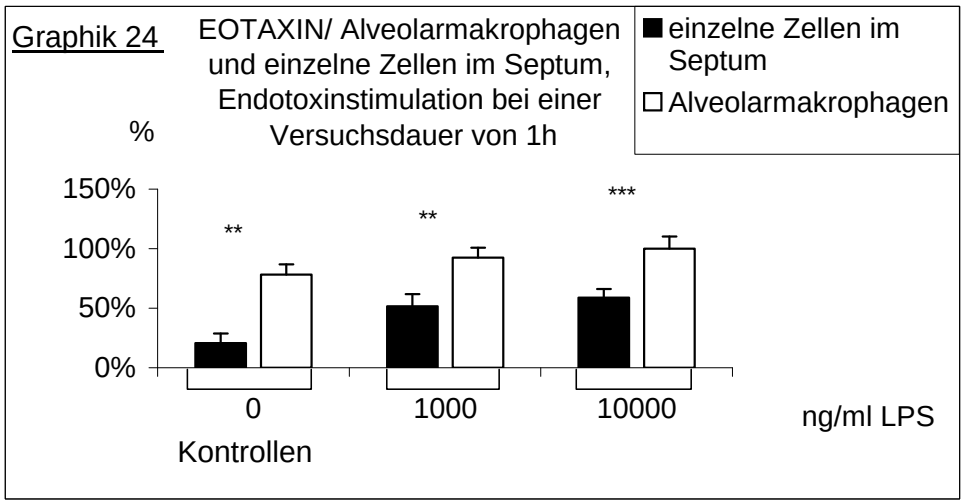
Bei einer Stimulation mit 10.000 ng/ml LPS zeigte sich zudem unter Plasma-Einfluss sowohl bei den Endothelzellen teilmuskularisierter Gefäße als auch bei den Lymphozyten nach einer Versuchsdauer von 2 h eine Abnahme der MCP-1-Expression. Ohne Plasmazusatz ließ sich semiquantitativ keine signifikante Expressionsänderung von MCP-1 nachweisen (siehe Graphik 19 im Anhang). Weiterhin zeigte sich eine Steigerung der EOTAXIN-Färbeintensität des proximalen und des distalen Bronchialepithels der Rattenlunge unter zunehmender Endotoxinstimulation bei einer Versuchsdauer von 1 h. Dabei bewirkte Plasma 1,5 % semiquantitativ keine signifikante Expressionsänderung (siehe Graphik 20 im Anhang). Weiterhin zeigten die BALT-Lymphozyten nach einer Endotoxinstimulation eine Steigerung der EOTAXIN-Expression. Unter Plasma-Einfluss zeigte sich diese Steigerung abgeschwächt (siehe Graphik 21).



Die Endothelzellen großer Hilusgefäße zeigten ebenfalls eine Steigerung der EOTAXIN-Expression nach einer Endotoxinstimulation. Nach einer LPS-Stimulation mit 1.000 ng/ml LPS und einer Versuchsdauer von 2 h zeigte sich eine sehr starke EOTAXIN-Expression. Dabei spielte der Plasma-Einfluss keine wesentliche Rolle (siehe Graphik 22 im Anhang).

Auch die Lymphozyten reagierten auf eine LPS-Stimulation mit vermehrter Expression von EOTAXIN. Nach Applikation von 10.000 ng/ml LPS zeigte sich nach einer Versuchsdauer von 1 h eine sehr starke EOTAXIN-Färbeintensität. Dabei zeigte sich keine wesentliche Veränderung unter Plasma-Einfluss (siehe Graphik 23 im Anhang).

Zudem bewirkte die LPS-Applikation eine gesteigerte EOTAXIN-Bildung der Alveolarmakrophagen und einzelner Zellen im Septum. Dabei kam es unter Plasma-Einfluss zu keiner wesentlichen Änderung (siehe Graphik 24).



3.1.3. Immunlokalisation der Chemokine in weiteren Rattenorganen und humanen Organen unter physiologischen Bedingungen

Immunhistologisch wurden 5 CC-Chemokine in 13 Organen von Ratte und Mensch untersucht. Im Gastrointestinaltrakt der Ratte zeigte sich eine Chemokinexpression der Oberflächenzellen. So zeigten diese bei der Speiseröhre eine schwache bis mäßige, im Rattenmagen überwiegend eine mäßig bis starke, im Rattenduodenum eine schwach bis mäßige und im Ileum und Dickdarm eine mäßig bis starke CC-Chemokin-Expression.

Dabei war die Chemokin-Expression am stärksten im Dickdarm. Die RANTES-Expression imponierte im Gastrointestinaltrakt der Ratte mit einer mäßigen bis starken Expression. Zudem zeigten weitere Organkompartimente eine Chemokinbildung. Dazu gehörten die Belegzellen des Rattenmagens mit

einer mäßig bis starken MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Färbeintensität und die Hauptzellen des Magens mit einer mäßig bis starken MIP-1-beta-, RANTES- und EOTAXIN-Expression (siehe Anhang Tabelle 6).

Bei der Rattenleber wiesen vor allem die Kupfferschen Sternzellen eine starke bis sehr starke MIP-1-alpha-, MIP-1-beta-, RANTES- und MCP-1-Expression auf. Zusätzlich zeigten die Hepatozyten eine mäßig bis starke Chemokin-expression (siehe Anhang Tabelle 5). Im Pankreas fand sich neben einer sehr starken MIP-1-beta-Färbeintensität der Langerhansschen Insel-Zellen eine mäßig bis starke MIP-1-alpha-, MIP-1-beta-, RANTES- und MCP-1-Expression der serösen Drüsen (siehe Anhang Tabelle 5).

Weiterhin zeigte sich in der Schilddrüse eine sehr starke EOTAXIN-Expression des Follikelepithels, während in der Speicheldrüse eine mäßige RANTES-Expression der serösen und der mucösen Drüsen und eine starke RANTES-Expression des Drüsenganges imponierte (siehe Anhang Tabelle 5). Im Rattenherz zeigte sich eine mäßige RANTES-Proteinbildung der Kardiomyozyten und eine sehr starke EOTAXIN-Expression der Endothelzellen (siehe Anhang Tabelle 5).

Die Rattenniere wies eine mäßige MIP-1-alpha- und RANTES-Expression der proximalen Tubuli des Cortex und zusätzlich der Macula Densa auf. Beim Urothel fand sich eine mäßige RANTES- und MCP-1-Expression (siehe Anhang Tabelle 5).

Bei den lymphatischen Rattenorganen zeigte sich bei der Milz eine mäßig bis starke MIP-1-alpha-, MIP-1-beta-, RANTES- und EOTAXIN-Expression der Retikulumzellen und der weißen Pulpa, während die Sinusoide der roten Pulpa der Rattenmilz eine mäßige MIP-1 beta-, RANTES- und MCP-1-Färbeintensität aufwiesen. In Rattenthymus zeigten die Retikulumzellen eine mäßig bis starke MIP-1-beta-, RANTES- und EOTAXIN-Expression (siehe Anhang Tabelle 6).

In der Rattenhaut fand sich eine mäßig bis sehr starke CC-Chemokin-Expression der Talgdrüsen, eine mäßige RANTES- und EOTAXIN-Färbeintensität der Haarfollikel und eine mäßig bis starke MIP-1-beta-, RANTES-,

MCP-1- und EOTAXIN-Expression der peripheren Nerven (siehe Anhang Tabelle 6).

Weiterhin ließen sich die 5 CC-Chemokine immunhistochemisch in einzelnen humanen Organkompartimenten lokalisieren (siehe Anhang Tabelle 7 und 8). Im humanen Gastrointestinaltrakt zeigten die Belegzellen des Magens eine mäßige MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Expression. Zudem präsentierten die Oberflächenzellen des humanen Dickdarms eine mäßige bis starke MIP-1-alpha-, MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Expression (siehe Anhang Tabelle 8).

In der humanen Leber zeigten die Kupfferschen Sternzellen eine starke MCP-1-Expression, während das Gallengangepithel eine mäßige RANTES-, EOTAXIN- und MCP-1-Färbeintensität aufwies (siehe Anhang Tabelle 7). Im exokrinen Anteil des humanen Pankreas fand sich eine mäßig bis starke MIP-1-beta, RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Expression des Drüsengangepithels (siehe Anhang Tabelle 7). Zudem zeigten die proximalen Tubuli der humanen Nierenrinde eine mäßige MCP-1 und EOTAXIN-Expression (siehe Anhang Tabelle 7).

Bei den lymphatischen humanen Organen fand sich in der Milz eine mäßige MCP-1-Expression der weißen Pulpa und der Retikulumzellen. Zusätzlich bestand eine starke MCP-1-Expression der Sinusoide der roten Pulpa der Milz. Die Retikulumzellen zeigten zudem eine mäßige EOTAXIN-Expression (siehe Anhang Tabelle 8). Schließlich zeigte die humane Haut eine starke MIP-1-beta- und eine mäßige RANTES- und EOTAXIN-Färbeintensität der Talgdrüsen. Die Haarfollikel zeigten eine mäßige RANTES- und MCP-1-Expression und die peripheren Nerven der Haut eine mäßige MCP-1-Färbeintensität (siehe Anhang Tabelle 8).

Vergleicht man die Chemokinexpression in beiden Spezies, dann ließen sich die fünf untersuchten CC-Chemokine außerhalb der Lunge im Wesentlichen nur in der Leber, der Milz, der Haut, im Magen und im Dickdarm lokalisieren (siehe Tabelle 5 und 6).

Bei der Rattenleber und humanen Leber fand sich eine mäßige RANTES-Färbeintensität des Gallengangepithels und eine starke bis sehr starke MCP-1-Expression der Kupfferschen Sternzellen. Im Gastrointestinaltrakt zeigten die Belegzellen des Magens eine mäßig bis starke MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Expression. Dickdarmoberflächenzellen wiesen eine mäßig bis starke MIP-1-alpha-, MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Expression auf, während die Intestinaldrüsen des Dickdarms eine mäßige MCP-1-Färbeintensität zeigten.

Bei der Haut fand sich zudem eine mäßig bis sehr starke Expression von MIP-1 beta, RANTES und EOTAXIN durch die Talgdrüsen, eine mäßige RANTES-Expression der Haarfollikel und eine mäßige MCP-1-Färbeintensität der peripheren Nerven (siehe Tabelle 5).

Bei der physiologischen Rattenmilz und der humanen Milz zeigten die Retikulumzellen eine mäßige EOTAXIN-Bildung und die Sinusoide der roten Pulpa eine mäßig bis starke MCP-1-Generation (siehe Tabelle 6).

Tabelle 5

Organ	MIP-1 alpha		MIP-1 beta		RANTES	
	Ratte	**Human**	**Ratte**	**Human**	**Ratte**	**Human**
I. Leber						
Gallengang	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	schwach	mäßig	mäßig
II. Magen						
Belegzellen	schwach	schwach	mäßig	mäßig	stark	mäßig
III. Dickdarm						
Oberflächen-zellen	mäßig	mäßig	stark	stark	stark	mäßig
IV. Haut						
Talgdrüsen	mäßig	schwach	stark	stark	stark	mäßig
Haarfollikel	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	schwach	mäßig	mäßig

Tabelle 6

Organ	MCP-1		EOTAXIN	
	Ratte	**Human**	**Ratte**	**Human**
I. Leber				
Kupffersche Sternzellen	sehr stark	stark	keine Färbung	keine Färbung
II. Milz				
Retikulumzellen	schwach	mäßig	stark	mäßig
rote Pulpa	mäßig	mäßig	schwach	schwach
III. Magen				
Belegzellen	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig
IV. Dickdarm				
Oberflächenzellen	stark	mäßig	stark	mäßig
Intestinaldrüsen	mäßig	mäßig	schwach	schwach
V. Haut				
Talgdrüsen	schwach	schwach	sehr stark	mäßig
Nerven	mäßig	mäßig	mäßig	schwach

3.2. C-C-Chemokinrezeptoren (CCR-1, CCR-2B, CCR-3, CCR-4, CCR-5)

3.2.1. Immunlokalisation der Chemokinrezeptoren unter physiologischen Bedingungen in Rattenlungen und humanen Lungen

Unter physiologischen Bedingungen ließen sich die Chemokinrezeptoren immunhistologisch sowohl in der Rattenlunge als auch in der humanen Lunge nachweisen. Es zeigte sich überwiegend eine mäßig bis sehr starke bronchoepitheliale Chemokinrezeptor-Expression bei beiden Spezies in normalen Lungen unter physiologischen Bedingungen (siehe Tabelle 3 und 4 und Bildtafel). Das Trachealepithel der unbehandelten Rattenlunge und der humanen Lunge zeigte zudem eine mäßige bis sehr starke Expression der Rezeptoren CCR-1-4 (siehe Anhang Tabelle 2 und 4).

Eine Ausnahme bildete die starke CCR-5-Expression des proximalen Bronchialepithels und der Alveolarmakrophagen sowie eine mäßige bis sehr starke CCR-5-Expression der peribronchialen Drüsen und der Chondrozyten der humanen Lunge im Vergleich zur Rattenlunge (siehe dazu Tabelle 3 und 4).

Weiterhin bestand bei beiden Spezies eine mäßige bis sehr starke Expression der Rezeptoren CCR-1-3 bei peribronchialen Chondrozyten und peribronchialen Drüsen. Die Alveolarmakrophagen und Lymphozyten zeigten in beiden Spezies eine mäßig bis starke CCR-1-3-Expression. Endothelzellen zeigten eine schwache bis mäßige CCR-1- und CCR-2-Generation (siehe dazu Tabelle 3 und 4 und Bildtafel).

Zuletzt bestand ausschließlich in der Rattenlunge eine sehr starke CCR-1-Expression der BALT-Lymphozyten und eine mäßige CCR-1- und CCR-3-Expression durch peribronchiale periphere Nerven (siehe Anhang Tabelle 2).

Tabelle 3

Struktur bei der Ratte	**CCR-1**	**CCR-2**	**CCR-3**	**CCR-4**	**CCR-5**
proximales Bronchialepithel	mäßig	stark	sehr stark	mäßig	keine Färbung
distales Bronchialepithel	schwach	mäßig	stark	schwach	keine Färbung
peribronchiale Chondrozyten	mäßig	stark	mäßig	schwach	schwach
peribronchiale Drüsen	sehr stark	sehr stark	mäßig	schwach	schwach
Lymphozyten	sehr stark	mäßig	stark	schwach	schwach
Alveolarmakrophagen	stark	mäßig	stark	schwach	keine Färbung
Endothel	mäßig	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung

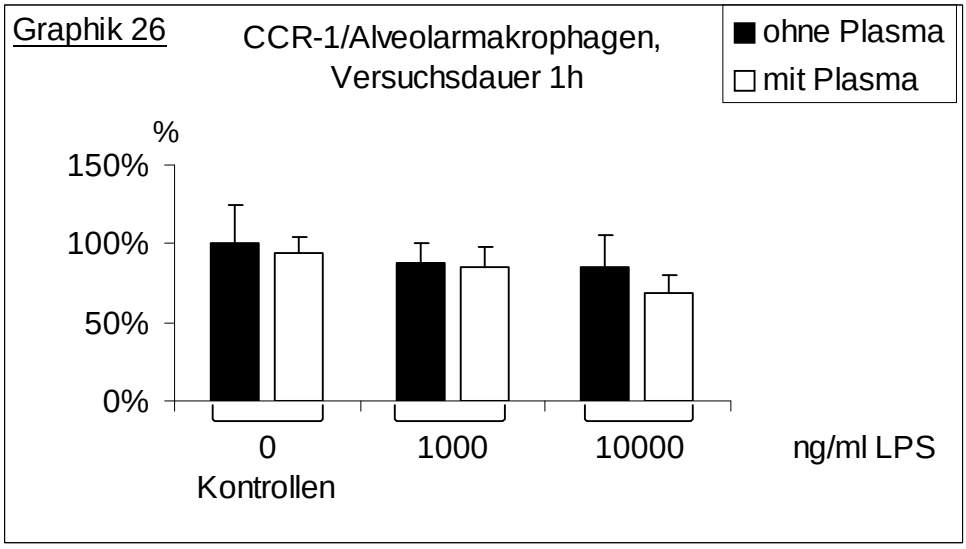
Tabelle 4

Humane Struktur	CCR-1	CCR-2	CCR-3	CCR-4	CCR-5
proximales Bronchial-epithel	mäßig	sehr stark	stark	stark	stark
distales Bronchial-epithel	mäßig	mäßig	mäßig	schwach	keine Färbung
peribron-chiale Chondro-zyten	sehr stark	stark	stark	keine Färbung	sehr stark
peribron-chiale Drüsen	stark	stark	stark	stark	mäßig
Lympho-zyten	mäßig	sehr stark	stark	mäßig	keine Färbung
Alveolar-makro-phagen	stark	stark	mäßig	schwach	stark
Endothel	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung

3.2.2. Chemokinrezeptorexpression unter LPS-Einwirkung

Als Einziger der Chemokinrezeptoren zeigte sich bei CCR-5 immunhistologisch weder in der physiologischen Rattenlunge noch in der Rattenlunge nach LPS-Stimulation eine signifikante Proteinexpression. Lediglich im Bereich des mehrreihigen Trachealepithels war eine schwache Expression zu beobachten. Im Unterschied zu den anderen Chemokinrezeptoren war CCR-5 im Bronchialepithel der unbehandelten sowie der LPS-behandelten Rattenlungen nicht nachweisbar. Weiterhin zeigten das proximale und distale Bronchialepithel semiquantitativ keine signifikante CCR-1-Expressionsänderung unter LPS-Stimulation. Unter Plasmaeinfluss zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung (siehe Graphik 25 im Anhang).

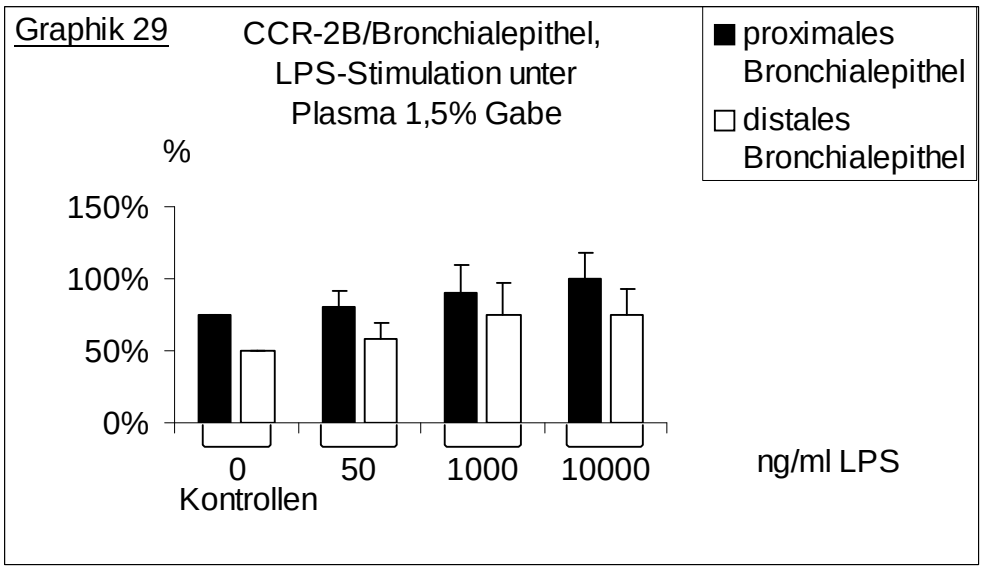
Die Alveolarmakrophagen zeigten mit zunehmender Endotoxinstimulation eine reduzierte Expression von CCR-1. Dabei sank die CCR-1-Färbeintensität nach Plasmagabe deutlicher (siehe Graphik 26).



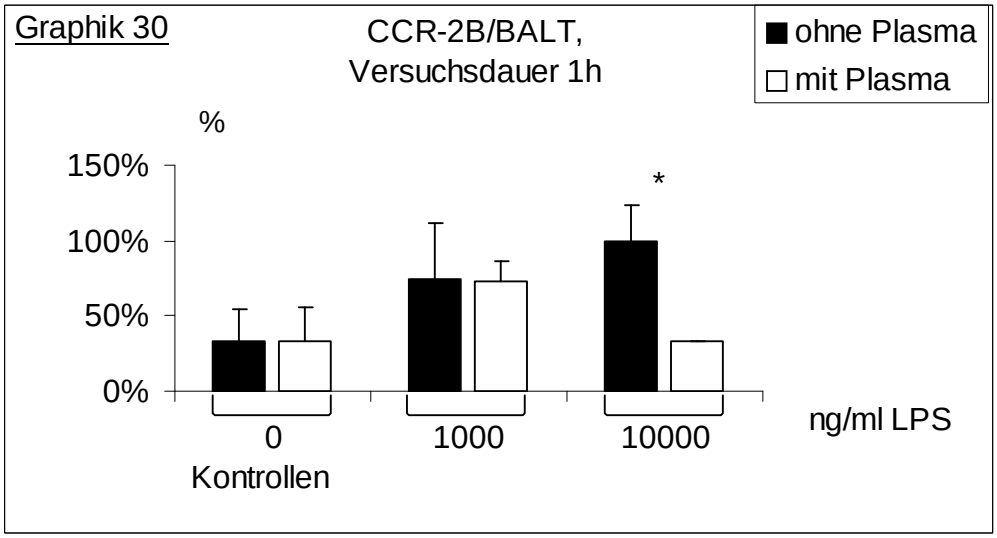
Die Lymphozyten zeigten ebenfalls bei zunehmender LPS-Applikation eine Abnahme der CCR-1 Bildung. Unter Plasmaeinfluss zeigte sich kein signifikanter Unterschied (siehe Graphik 27 im Anhang).

Auch die Endothelzellen zeigten unter LPS-Stimulation nach einer 1 h Versuchsdauer eine CCR-1-Expressionsabnahme. Nach Zugabe von Plasma 1,5 % bewirkte die Endotoxinstimulation eine stärkere Abnahme der CCR-1-Expression (siehe Graphik 28 im Anhang).

Unter LPS-Stimulation kam es nach Gabe von Plasma 1,5 % zu einem Anstieg der CCR-2B-Expression des proximalen und des distalen Bronchialepithels (siehe Graphik 29).



Die BALT-Lymphozyten zeigten dagegen ohne Plasmagabe eine signifikante Steigerung der CCR-2B-Färbeintensität unter LPS-Stimulation (siehe Graphik 30).

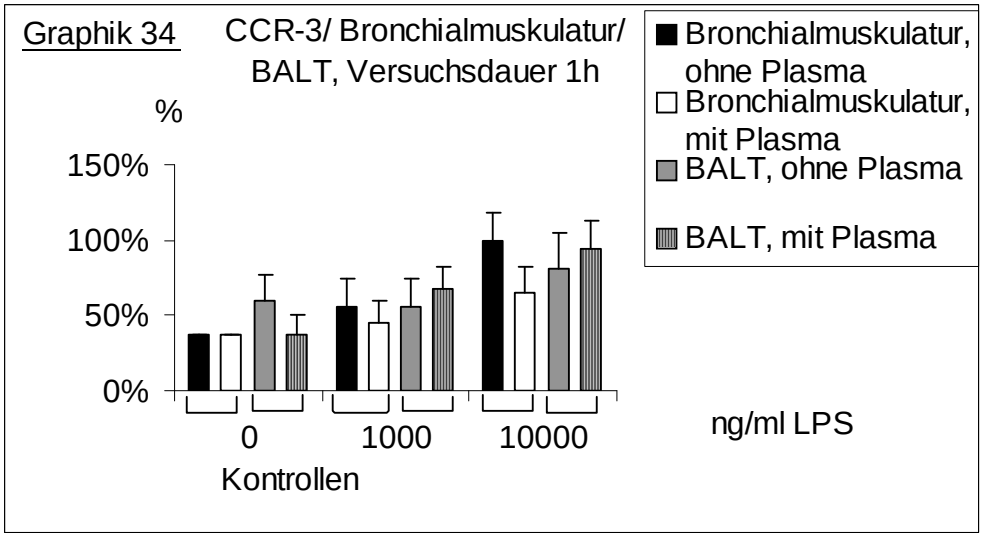


Abhängig von der Versuchsdauer fand sich unter Endotoxin-Stimulation ebenfalls eine Steigerung der CCR-2B-Färbeintensität der Alveolarmakrophagen. Hierbei zeigte sich nach Plasmazugabe keine signifikante Veränderung (siehe Graphik 31 im Anhang).

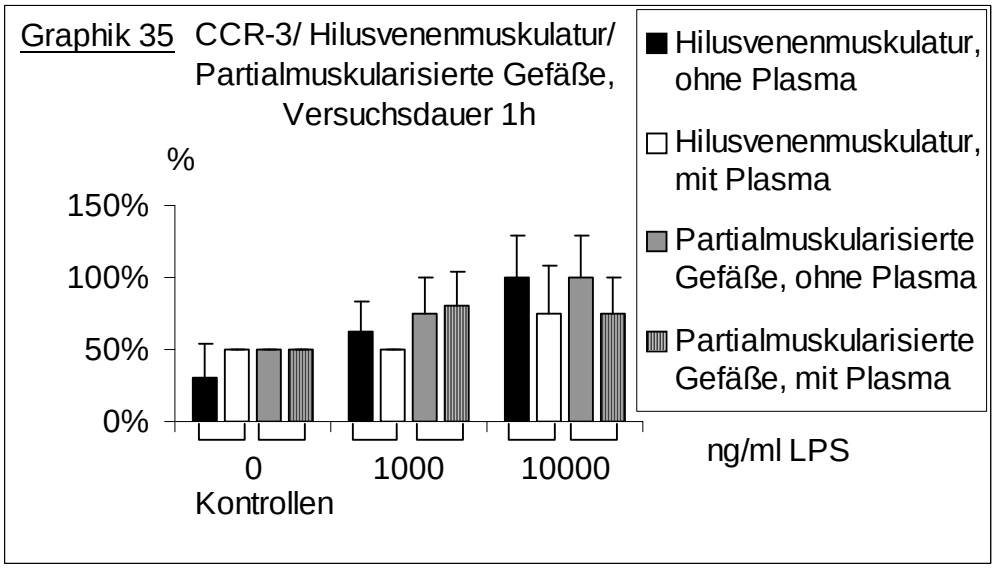
Nach Gabe von Plasma 1,5 % zeigte sich unter LPS-Stimulation eine leichte Zunahme der CCR-2B-Expression einzelner Zellen im Septum (siehe Graphik 32 im Anhang).

Dagegen zeigten die Lymphozyten ohne Plasmazugabe unter Endotoxinstimulation eine Zunahme der CCR-2B-Expression (siehe Graphik 33 im Anhang).

Nach Endotoxinstimulation zeigte sich vor allem ohne Plasmagabe eine Erhöhung der CCR-3-Bildung der glatten Bronchialmuskulatur. Die BALT-Lymphozyten zeigten dagegen unter LPS-Stimulation und Plasma-1,5%-Gabe eine Steigerung der CCR-3-Färbeintensität (siehe Graphik 34).



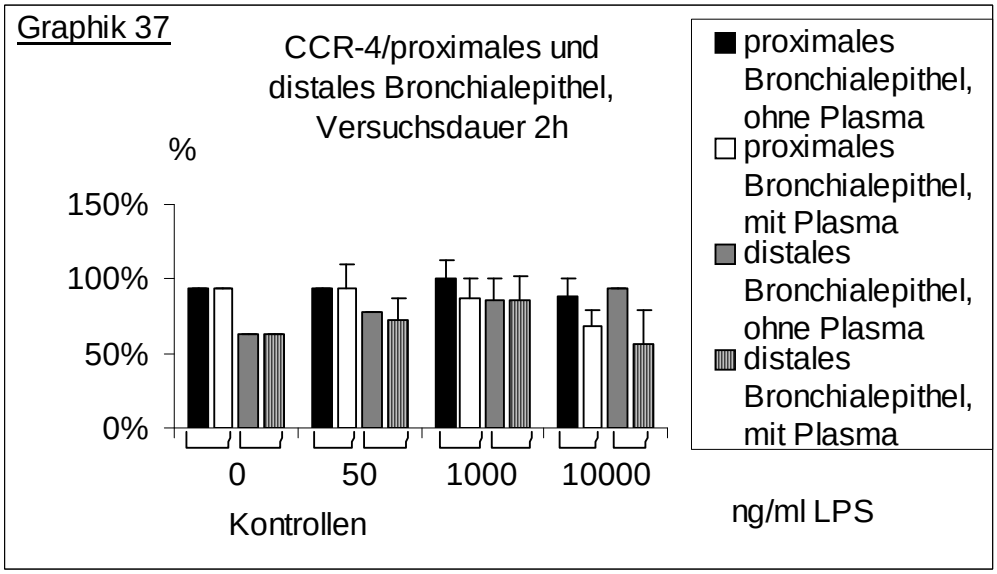
Ähnlich wie die Bronchialmuskulatur zeigten ohne Plasmazugabe die Muskelzellen der Hilusvene, die kardialen Myozyten entsprechen, und die Muskelzellen der partialmuskularisierten Gefäße unter einer Endotoxinstimulation eine Steigerung der CCR-3-Expression (siehe Graphik 35).



Bei einzelnen Zelltypen und Alveolarmakrophagen zeigte sich dagegen bei Zugabe von LPS zum Plasmaperfusat keine signifikante Stimulation der CCR-3-Expression gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Graphik 36 im Anhang).

Die Endotoxinstimulation bewirkte nach Plasma-1,5 %-Gabe eine Absenkung der CCR-4-Bildung des proximalen Bronchialepithels. Dagegen zeigte das

distale Bronchialepithel nach LPS-Stimulation vor allem ohne Plasmazugabe eine Steigerung der CCR-4-Bildung (siehe Graphik 37).



Nach LPS-Stimulation zeigten die Lymphozyten bis zu einer Dosis von 1.000 ng/ml LPS eine Steigerung der CCR-4-Expression. Nach Applikation von 10.000 ng/ml LPS zeigte sich sowohl mit Plasma 1,5 % als auch ohne Plasmazugabe ein Abfall der CCR-4-Expression (siehe Graphik 38 im Anhang).

Schließlich zeigten die Alveolarmakrophagen nach einer Endotoxinstimulation mit 10.000 ng/ml LPS zeitabhängig nach 2 h eine leichte Steigerung der CCR-4-Färbeintensität. Unter der zusätzlichen Plasma-1,5%-Gabe kam es zu keiner signifikanten Veränderung (siehe Graphik 39 im Anhang).

3.2.3. Immunlokalisation der Chemokinrezeptoren in weiteren Rattenorganen und humanen Organen unter physiologischen Bedingungen

Außerhalb der Lunge ließen sich die fünf untersuchten CC-Chemokin-rezeptoren in bestimmten Organkompartimenten beider Spezies lokalisieren. Bei der Auswertung der physiologischen Rattenorgane zeigte sich bei der Leber eine mäßige CCR-1-, CCR-3- und CCR-4-Expression der Hepatozyten, eine mäßige CCR-4-Expression der Kupfferschen Sternzellen und eine

mäßige CCR-3- und CCR-4-Expression des Gallengangepithels (siehe dazu Anhang Tabelle 9).

Im exokrinen Teil des Rattenpankreas fand sich zudem eine mäßige CCR-2- und CCR-4-Färbeintensität der serösen Drüsen. Das Follikelepithel der Schilddrüse zeigte eine mäßig bis starke CCR-2- und CCR-3-Expression. Weiterhin zeigten die serösen Drüsen der Rattenspeicheldrüse eine mäßige CCR-2- und CCR-4-Färbeintensität (siehe dazu Anhang Tabelle 9).

Bei der Rattenniere wiesen lediglich die proximalen Tubuli der Nierenrinde eine mäßige CCR-5-Expression auf (siehe dazu Anhang Tabelle 9).

Bei den lymphatischen Organen der Ratte wiesen die Retikulumzellen der Milz eine mäßige CCR-5- und eine sehr starke CCR-2-Expression auf, während die weiße Pulpa im Marginalbereich eine mäßige CCR-5-Expression zeigte. Die Retikulumzellen des Thymus zeigten zudem eine starke CCR-2- und CCR-4-Färbeintensität, während die Medulla eine mäßige CCR-1-Färbeintensität präsentierte (siehe dazu Anhang Tabelle 10).

Besonders im Vordergrund stand auch die Chemokinrezeptorlokalisation im Gastrointestinaltrakt der Ratte. Dabei zeigten die Oberflächenzellen des Magens eine mäßige CCR-2- und CCR-3-Expression, die Belegzellen eine mäßige CCR-1- und eine starke CCR-2-Expression und die Hauptzellen eine starke CCR-2-Färbeintensität.

Weiterhin fand sich im physiologischen Rattendickdarm eine mäßige CCR-1, CCR-2, CCR-4 und CCR-5-Expression der Oberflächenzellen, während diese zusätzlich eine starke CCR-3-Proteinexpression aufwiesen (siehe dazu Anhang Tabelle 10).

Schließlich zeigten die Talgdrüsen der Rattenhaut eine starke CCR-2- und CCR-4- und eine mäßige CCR-3-Färbeintensität, während die peripheren Nerven der Rattenhaut eine mäßige CCR-1-, CCR-2- und CCR-4-Expression aufwiesen (siehe dazu Anhang Tabelle 10).

Weiterhin konnten die fünf CC-Chemokinrezeptoren in bestimmten physiologischen humanen Organkompartimenten lokalisiert werden. Bei der humanen Leber bestand eine mäßige CCR-2- und CCR-3-Expression der Kupfferschen Sternzellen, während das humane Gallengangepithel eine mäßige CCR-3-Expression aufwies (siehe dazu Anhang Tabelle 11).

Das Drüsengangepithel der humanen Pankreas zeigte eine mäßige CCR-1-, CCR-2- und CCR-5-Expression (siehe dazu Anhang Tabelle 11).

Bei der humanen Niere bestand lediglich in der Nierenrinde eine mäßige CCR-1-, CCR-2- und CCR-3-Expression durch die proximalen Tubuli (siehe dazu Anhang Tabelle 11).

Bei den humanen lymphatischen Organen zeigten die Retikulumzellen eine mäßige CCR-1-Färbeintensität, während der Marginalbereich der weißen Pulpa eine mäßige CCR-1-, CCR-2-, CCR-3- und CCR-5-Expression aufwies und die rote Milzpulpa eine mäßige CCR-1-Expression zeigte (siehe dazu Anhang Tabelle 12).

Der humane Gastrointestinaltrakt zeigte wichtige Lokalisationen der humanen Chemokinrezeptorexpression. Die Oberflächenzellen des Magens zeigten eine mäßige CCR-2- und CCR-4-Expression, während die Belegzellen eine mäßige CCR-1-, CCR-3-, CCR-5- und eine starke CCR-2-Proteinexpression aufwiesen. Die Hauptzellen zeigten zusätzlich eine mäßige CCR-2-Färbeintensität. Im weiteren Verlauf des humanen Gastrointestinaltrakts zeigten die Oberflächenzellen des Duodenums eine mäßige CCR-3-Expression. Die stärkste Chemokinrezeptorexpression außerhalb der humanen Lunge zeigte sich im Dickdarm. Die Oberflächenzellen des physiologischen Dickdarms zeigten eine mäßige CCR-3-, eine starke CCR-2-, CCR-4- und CCR-5- und eine sehr starke CCR-1-Expression. Die Intestinaldrüsen wiesen zudem eine mäßige bis starke Chemokinrezeptorexpression auf (siehe dazu Anhang Tabelle 12). Schließlich zeigten die peripheren Nerven der humanen Haut eine mäßige CCR-1-Färbeintensität (siehe dazu Anhang Tabelle 12).

Tabelle 7

Organ	CCR-1		CCR-2		CCR-3	
	Ratte	**Human**	**Ratte**	**Human**	**Ratte**	**Human**
I. Leber						
Gallengang	keine Färbung	mäßig	keine Färbung	schwach	mäßig	mäßig
II. Magen						
Oberflächenzellen	schwach	keine Färbung	mäßig	mäßig	mäßig	keine Färbung
Belegzellen	mäßig	mäßig	stark	stark	schwach	mäßig
Hauptzellen	schwach	schwach	stark	mäßig	schwach	schwach
III. Dickdarm						
Oberflächenzellen	mäßig	sehr stark	mäßig	stark	stark	mäßig
Intestinaldrüsen	stark	stark	mäßig	stark	mäßig	mäßig
IV. Milz						
Retikulumzellen	mäßig	mäßig	sehr stark	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
V. Haut						
periphere Nerven	mäßig	mäßig	mäßig	schwach	keine Färbung	keine Färbung

Beim Vergleich der CC-Chemokinrezeptorlokalisation stand bei beiden Spezies der Gastrointestinaltrakt im Vordergrund. Dies zeigte sich vor allem bei den Oberflächenzellen des Dickdarms beider Spezies. Sowohl die humanen als auch die Rattenoberflächenzellen des Dickdarms zeigten eine mäßige bis sehr starke CC-Chemokinrezeptor-Expression (siehe Tabelle 7 und 8). Dagegen zeigten die Oberflächenzellen des Magens bei beiden Spezies lediglich eine mäßige CCR-2-Expression, während die Belegzellen eine mäßige CCR-1- und eine starke CCR-2-Expression und die Hauptzellen eine mäßig bis starke CCR-2-Färbeintensität aufwiesen (siehe Tabelle 7).

Schließlich fand sich zusätzlich bei beiden Spezies eine mäßige CCR-3-Expression des Gallengangepithels der Leber, eine mäßige CCR-1-Expression der Retikulumzellen der Milz und eine mäßige CCR-1-Proteinexpression der peripheren Nerven der Haut (siehe Tabelle 7).

Tabelle 8

Organ	CCR-4		CCR-5	
	Ratte	**Human**	**Ratte**	**Human**
III. Dickdarm				
Oberflächenzellen	mäßig	stark	mäßig	stark
Intestinaldrüsen	mäßig	mäßig	schwach	mäßig

4. Diskussion

4.1. Verteilung von Chemokinen und Rezeptoren in Lungen von Ratte und Mensch

Unter normalen physiologischen Bedingungen lässt sich immunhistochemisch eine Expression der CC-Chemokine und ihrer zugehörigen Rezeptoren in der Lunge und in der Luftröhre nachweisen. Dabei lassen sich die CC-Chemokine und ihre Rezeptoren im Bereich des Bronchialbaums, des Gefäßsystems und der Leukozyten beider Spezies nachweisen. Eine Chemokinexpression des Bronchialepithels, der peribronchialen Drüsen und der Chondrozyten des hyalinen Knorpels kann neben einer Mitwirkung bei der Bronchotonus-regulation und Gefäßtonusregulation die Transmigration von Leukozyten durch das Endothel und damit die Rekrutierung der Leukozyten in das interstitielle Lungengewebe unter physiologischen Bedingungen steuern. Eine Gegenüberstellung der zellulären Lokalisationen, wo das Chemokin gebildet wird und wo sich die rezeptorexprimierenden Zellen, also die Zielzellen, immunhistochemisch lokalisieren lassen, kann helfen, diese Steuerungs-mechanismen zu veranschaulichen. Im Bereich des Bronchialbaums zeigt sich unter physiologischen Bedingungen eine starke bis sehr starke Protein-expression von MIP-1 alpha und RANTES beider Spezies. Immunhisto-chemisch konnte eine RANTES-Bildung des humanen Bronchialepithels bereits gezeigt werden (Berkman et al., 1996).

MIP-1 alpha wurde zunächst von Wolpe durch Zellkulturexperimente entdeckt (Wolpe et al., 1988). Die proximalen und distalen Bronchialepithelzellen weisen aber auch als Zielzellen eine mäßig bis starke CCR-1-Expression auf. CCR-1 ist der gemeinsame Rezeptor von MIP-1 alpha und RANTES und der erste entdeckte CC-Chemokinrezeptor (Neote et al., 1993 und Murphy et al., 1994). Weiterhin zeigen die Bronchialepithelzellen beider Spezies eine starke MCP-1-Expression. Der gemeinsame Rezeptor von MCP-1, RANTES und MIP-1 alpha, CCR-4, kann ebenfalls im Bereich des Bronchialbaums beider Spezies mit einer mäßigen bis starken Expression nachgewiesen werden.

Der spezifische Rezeptor von MCP-1, CCR-2B, wird stark bis sehr stark von proximalen und distalen Bronchialepithelien der Ratte und des Menschen gebildet. Sousa und Yoshimura konnten eine MCP-1 Bildung des Bronchialepithels an einem Kollektiv von zwölf gesunden Menschen durch Bronchialbiopsien und anschließende Immunhistochemie nachweisen (Sousa et al., 1994). Capelli gelang es später, bronchoskopisch bei 15 Nichtrauchern Konzentrationen von MIP-1 beta und MCP-1 in der BAL nachzuweisen (Capelli et al., 1999).

Zudem zeigt sich sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen eine mäßig bis sehr starke EOTAXIN- und CCR-3-Expression des Bronchialepithels. EOTAXIN konnte bereits im Jahr 1999 im proximalen Bronchialepithel der Ratte immunhistochemisch nachgewiesen werden (Harrington et al., 1999). Zudem wurde die EOTAXIN- und CCR-3-Bildung des Bronchialepithels von Ying unter physiologischen Bedingungen durch die In-situ-Hybridisierung und mittels der Immunhistochemie nachgewiesen (Ying et al., 1997). Auch Mattoli konnte anhand von Bronchialbiopsien EOTAXIN-mRNA nachweisen (Mattoli et al., 1997). Zudem wurde in den oberen Luftwegen EOTAXIN-mRNA nachgewiesen (Minshall et al., 1997).

CCR-5 lässt sich immunhistochemisch nur beim Menschen im Bereich der proximalen Bronchien mit einer starken Generation nachweisen. Mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie konnte CCR-5 von Rottman bereits 1997 im Epithelbereich nachgewiesen werden (Rottman et al., 1997). Auch Jiang gelang es, CCR-2- und CCR-5-mRNA in der Rattenlunge nachzuweisen (Jiang et al., 1998). MIP-1 beta, welches von Bronchialepithelzellen mäßig bis stark gebildet wird, kann sich als Ligand gemeinsam mit MIP-1 alpha und RANTES an die proximalen Bronchialepithelzellen des Menschen, welche CCR-5 bilden und somit die Zielzellen darstellen, anlagern. Wenig war bislang über die Chemokinbildung der peribronchialen Chondrozyten und der seromucösen Drüsen bekannt. Neben der bronchoepithelialen Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression zeigt sich immunhistochemisch auch eine Chemokin- und Chemokinrezeptorbildung der peribronchialen Chondrozyten des hyalinen Knorpels und der peribronchialen seromucösen Drüsen.

Dies könnte sich entscheidend auf den Bronchotonus auswirken. Die Chondrozyten beider Spezies zeigen eine mäßig bis starke MIP-1-beta- und RANTES-Generation und zudem eine starke bis sehr starke MCP-1- und EOTAXIN-Expression unter physiologischen Bedingungen. Die Chondrozyten sind jedoch durch eine mäßig bis sehr starke CCR-1 bis 3-Expression auch Zielzellen. Ebenso wie die proximalen humanen Bronchialepithelzellen zeigen auch die humanen Chondrozyten eine sehr starke CCR-5-Expression.

Die seromucösen Drüsen zeigen ebenfalls eine Chemokin- und eine Chemokinrezeptorexpression. Diese zeigen in beiden untersuchten Spezies eine mäßig bis sehr starke MIP-1 beta-, RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Färbeintensität. Zudem zeigen die Drüsen eine mäßig bis sehr starke CCR-1-, CCR-2- und CCR-3-Expression. Die humanen Drüsenzellen zeigen zusätzlich eine mäßig bis starke CCR-4- und CCR-5-Expression. Die Interaktion zwischen den chemokinbildenden und rezeptorexprimierenden Zielzellen durch das Bronchialepithel und die peribronchialen Chondrozyten und Drüsen könnte unter physiologischen Bedingungen den Bronchotonus und chemotaktisch über endotheliale Transmigration die Leukozytenmigration in das Lungengewebe steuern.

Bei der Betrachtung des Gefäßsystems und der Gegenüberstellung der Chemokin- und der Chemokinrezeptorbildung zeigt sich anders als im Bronchialbaum, dass die Endothelzellen beider Spezies unter physiologischen Bedingungen eine Chemokinbildung aufweisen, nicht jedoch als Zielzellen fungieren. Die Endothelzellen beider Spezies zeigen immunhistochemisch unter physiologischen Bedingungen eine mäßige MIP-1-beta-, RANTES- und MCP-1-Proteinexpression und eine starke EOTAXIN-Färbeintensität. Sousa und Yoshimura konnten bereits 1994 bei zwölf gesunden Studienteilnehmern mittels Bronchialbiopsien und der Immunhistochemie eine MCP-1-Expression der Endothelzellen nachweisen (Sousa et al., 1994). Später gelang es Ichiyasu, immunhistochemisch in der Hasenlunge eine MCP-1-Proteinexpression der Endothelzellen nachzuweisen. Zudem fand er durch In-situ-Hybridisierung unter physiologischen Bedingungen eine MCP-1-mRNA-Bildung der Endothelzellen (Ichiyasu et al., 1999). Die Endothelzellen

der Ratte und des Menschen zeigen bei der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch eine mäßige bis starke CCR-2B-Proteinexpression. CCR-2B ist als ein spezifischer Rezeptor für MCP-1 bekannt. CCR-2B ließ sich bereits 1998 auch molekularbiologisch in der normalen Rattenlunge nachweisen. Zudem erbrachten Zellkulturexperimente bei normaler Rattenlunge den Nachweis von CCR-2B-mRNA (Jiang et al., 1998). Ein Jahr zuvor gelang es bereits Ying, anhand von Bronchialbiopsien gesunder Studienteilnehmer durch eine Doppelfärbung (Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung) der Endothelzellen eine EOTAXIN Protein- und mRNA-Expression nachzuweisen (Ying et al., 1997). Bei der vorliegenden Arbeit zeigen die Endothelzellen der Rattenlunge immunhistochemisch eine schwache und die humanen Endothelzellen keine Färbung für CCR-3, den spezifischen Rezeptor für EOTAXIN. Mit Ausnahme eines deutlichen MCP-1/CCR-2B-Nachweises bei beiden Spezies scheinen die Endothelzellen der Rattenlunge und der humanen Lunge unter physiologischen Bedingungen überwiegend nicht als Zielzellen zu fungieren. Die Chemokinbildung der Endothelzellen der Rattenlunge und der humanen Lunge könnte sich jedoch unter physiologischen Bedingungen chemotaktisch auf die zirkulierenden Leukozyten auswirken und somit den Einstrom von Leukozyten steuern.

Immunhistochemisch zeigt sich zudem eine starke CCR-1-, CCR-2- und CCR-3-Expression der Alveolarmakrophagen beider untersuchter Spezies. Die humanen Alveolarmakrophagen weisen zudem eine starke CCR-5-Färbeintensität auf. Somit könnte eine pulmonale Rekrutierung der Alveolarmakrophagen im Rahmen der Immunabwehr durch Chemokine gesteuert werden.

Diese Regulationsmöglichkeit scheint auch für die zirkulierenden Lymphozyten zu gelten. Die Lymphozyten beider Spezies zeigen nämlich unter physiologischen Bedingungen vor allem eine starke CCR-2B- und CCR-3-Expression. Die humanen Lymphozyten weisen zudem eine mäßige CCR-1- und CCR-4-Expression auf, während die Rattenlymphozyten eine sehr starke CCR-1-Proteinexpression aufweisen. Mittels Zellkulturexperimenten, PCR und Immunhistochemie konnte bereits eine CCR-3-Expression der humanen

eosinophilen Granulozyten und eine CCR-5-Expression der humanen T-Helferzellen gezeigt werden (Wu et al., 1997). Harrington zeigte immunhistochemisch auch in der Rattenlunge eine CCR-3-Expression der eosinophilen Granulozyten und eine schwache EOTAXIN-Bildung der Alveolarmakrophagen (Harrington, 1999). Weiterhin wurden CCR-2 und CCR-5 mittels Zellkultur und durch molekularbiologische Methoden in der Rattenlunge nachgewiesen (Jiang et al., 1998).

Zugleich zeigen sich die Alveolarmakrophagen und die Lymphozyten beider Spezies nicht nur als Zielzellen, sondern auch als chemokinbildende Zellen unter physiologischen Bedingungen. Die Chemokine könnten somit eine Interaktion zwischen den Alveolarmakrophagen und den Lymphozyten unter normalen Bedingungen ermöglichen und damit eine Regulation der Immunabwehrzellen mittels Chemotaxis unter physiologischen Bedingungen steuern. In diesem Zusammenhang zeigt sich immunhistochemisch bei beiden untersuchten Spezies eine mäßige MIP-1-alpha- und eine mäßig bis sehr starke MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Expression der Alveolarmakrophagen. Zudem zeigen die humanen Lymphozyten und die Rattenlymphozyten eine mäßige MIP-1-beta- und eine starke bis sehr starke RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Expression. Nachdem Wolpe 1988 durch Zellkulturexperimente zum ersten Mal eine MIP-1-alpha-Expression der Makrophagen nachwies, konnte Denthol auch eine MCP-1-Expression der Alveolarmakrophagen nachweisen (Denthol et al., 1989). Später zeigten Sousa und Yoshimura an Bronchialbiopsien von zwölf gesunden Studienteilnehmern eine MCP-1-Expression der Alveolarmakrophagen (Yoshimura et al., 1994). Mittels Northern-Blot-Analysen und Zellkultur konnte auch eine MCP-1-Bildung der Rattenalveolarmakrophagen nachgewiesen werden (Brieland et al., 1995). Zudem konnten MCP-1 und MIP-1 alpha in der BAL gesunder Studienteilnehmer nachgewiesen werden (Capelli, 1999). Weiterhin gelang es Berkman und Barnes, eine RANTES-Expression der T-Lymphozyten und der Alveolarmakrophagen immunhistochemisch nachzuweisen (Berkman et al., 1996). Ein Jahr später konnte durch eine Doppelfärbung mittels Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung nach Bronchialbiopsie gesunder Studienteilnehmer eine EOTAXIN-Bildung der humanen Alveolarmakrophagen und T-

Lymphozyten einerseits und eine CCR-3-Bildung der humanen eosinophilen Granulozyten andererseits nachgewiesen werden (Ying et al., 1997 und Mattoli et al., 1997).

Die überwiegende Übereinstimmung der beiden untersuchten Spezies in der Chemokinbildung und in der Expression der Rezeptoren der verschiedenen Zellen in der Lunge unter physiologischen Bedingungen zeigt, dass ein Rattenmodell geeignet ist, um durch eine dosierte LPS-Stimulation und somit Simulation pathophysiologischer Bedingungen neue Erkenntnisse über die Funktion der Immunabwehr zu erwerben.

4.2. Regulation und Verteilung der Chemokine und Rezeptoren unter Endotoxinwirkung

Die überwiegende Übereinstimmung der Befunde über die Verteilung von Chemokinen und Rezeptoren in der Rattenlunge und in der humanen Lunge zeigt, dass das Rattenmodell ein geeignetes Tiermodell zur Erforschung pathophysiologischer Grundlagen darstellt. Endotoxin-induzierte pathophysiologische Veränderungen scheinen unter septischen Bedingungen zur Störung der Mikrozirkulation und zum Multiorganversagen zu führen. Dies ist ein Krankheitsbild, welches bei Persistenz mit hoher Letalität der Patienten auf Intensivstationen einhergeht (Brigham et al., 1986, Kopydlowski et al., 1999 und Walmrath et al., 2001).

Die gramnegative Sepsis ist eine akute systemische Erkrankung, welche mit Fieber, Blutdruckabfall und disseminierter intravaskulärer Koagulation, Schock und Multiorganversagen einhergeht (Bone, 1993, Dellinger et al., 1997 und Kopydlowski et al., 1999). Endotoxin, ein Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, ist dafür bekannt, die Bildung proinflammatorischer Zytokine der Lunge anzuregen (Dellinger et al., 1997). Qui konnte bereits 1996 an einem Rattenmodell nach intraperitonealer LPS-Applikation einen Anstieg von TNF-alpha-, IL-1ß- und MIP-1-alpha-mRNA zeigen (Qui et al., 1996). Ein Jahr später konnte RANTES im humanen Bronchialepithel immunhistochemisch nachgewiesen werden (John et al., 1997). Zudem konnte

bereits eine Steigerung der RANTES-Bildung bestimmter pulmonaler Zelltypen nach einer Endotoxinstimulation beobachtet werden (Van Otteren et al., 1995). Nach LPS-Applikation zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der pulmonalen MIP-Bildung (Baggiolini et al., 1997, Rollins, 1997, Valente et al.,1988).

Septische Patienten zeigten zudem einen erhöhten MIP-1-beta-Spiegel (O'Grady et al., 1999). Die Entdeckung der Chemokinrezeptoren CCR-2 und CCR-5 in der Rattenlunge an Zellkulturen mit molekularbiologischen Methoden und Immunhistochemie erhärtete die Rolle der Chemokine in der Pathogenese der Sepsis und des ARDS (Jiang et al., 1998 und Rottman et al., 1997). LPS kann an LBP im Plasma gebunden werden, welches die LPS-Monomere zur Bindungsstelle von CD 14 transportiert (Wright et al., 1999, Pugin et al., 1993, Tobias et al., 1995 und Wright et al., 1990). Daher wurde die Auswirkung von Endotoxinstimulation auf die Expression von Chemokinen und ihrer zugehörigen Rezeptoren in der vorliegenden Arbeit in isolierten Rattenlungen mit und ohne Plasmazugabe untersucht.

Unter einer Endotoxinstimulation mit LPS kommt es bei bestimmten Zelltypen der Rattenlunge zu einer Veränderung der CC-Chemokin- und Chemokinrezeptor-Expression. Im Bereich des Bronchialbaums bewirkt eine LPS-Applikation eine Steigerung der MIP-1-beta, MCP-1-, RANTES- und EOTAXIN-Färbeintensität des Bronchialepithels. Gleichzeitig zeigt sich eine Steigerung der CCR-2- und CCR-4-Expression des Bronchialepithels und eine Erhöhung der CCR-3-Expression der Bronchialmuskulatur. Dabei zeigt sich besonders ohne Zusatz von Plasma 1,5 % mit zunehmender LPS-Applikation eine Steigerung der RANTES- und EOTAXIN-Expression des Bronchialepithels und eine Zunahme der CCR-3-Färbeintensität der Bronchialmuskulatur. Dies könnte für einen LPB-unabhängigen Weg der LPS-vermittelten Chemokin-Bildung sprechen.

Viele Effekte von LPS werden durch Plasmaprotein bzw. LPS-bindendes Protein (LBP) und CD 14 eingeleitet (Pugin et al., 1993, Tobias et al., 1995, Ulevitch, 1991, Wright et al., 1990). Doch zusätzlich zur bekannten LBP-CD-14-Achse ist ein CD-14- und Plasma-unabhängiger Signaltransduktionsweg für Endotoxin beschrieben, welcher aber noch nicht vollständig charakterisiert

worden ist (Wright et al., 1990, El Samalouti et al., 1999, Ingalls et al., 1995 und Lynn et al., 1993). Außerdem könnte die Zunahme der Chemokinsynthese infolge der Endotoxin-Gabe nicht durch LPS selbst, sondern über einen sekundären Signaltransduktionsweg durch LPS-aktivierte Zytokine wie TNF eingeleitet werden (Walmrath et al., 1994 und Pugin et al., 1993). Eine vermehrte Sekretion von TNF ist bereits bei LPS-perfundierten Lungen beobachtet worden (Martin et al., 1992, Schütte et al., 1997 und Walmrath et al., 1994). Dagegen zeigt sich immunhistochemisch eine Endotoxin-stimulierte Steigerung der CCR-2-Bildung des Bronchialepithels nach 1,5%igem Plasma-Zusatz, welche sich über den beschriebenen und bereits bekannten LPB-CD-14-Weg erklären lässt.

Eine Blockade von CCR-2B/MCP-1, CCR-3/EOTAXIN, CCR-4/RANTES und CCR-5/MIP-1 beta/RANTES könnte neue Therapiemöglichkeiten in der Behandlung von saisonaler allergischer Rhinitis, Asthma, chronischer Bronchitis und ARDS ermöglichen. Asthma ist durch eine vermehrte Chemokinbildung, mucöse Hypersekretion, Atemwegobstruktion und Eosinophilie charakterisiert. Chemokine scheinen durch Leukozytenrekrutierung, Stimulation von bestimmten pulmonalen Zelltypen und Histaminsekretion in der Pathogenese der allergischen Inflammation eine wichtige regulative Rolle zu spielen. Nach der Entdeckung von CCR-3 (Daugherty et al., 1996) zeigte sich CCR-3/EOTAXIN durch Wechselwirkung mit IL-13 als ein zentrales regulatives Chemokin von Asthma (Zimmermann et al., 2003).

Immunhistochemisch konnte eine EOTAXIN-Expression des Bronchialepithels und eine CCR-3-Expression der eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Harrington et al., 1999). Die vermehrte bronchoepitheliale EOTAXIN- und CCR-3-Bildung der Bronchialschleimhaut führt zur Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten. Eine anti-CCR-3/EOTAXIN-Behandlung könnte somit möglicherweise in der Zukunft bei der Behandlung von Asthma ergänzend zu anderen Therapien eingesetzt werden (Warrior et al., 2003). Bereits 1995 konnte eine allergisch induzierte mRNA-Bildung von EOTAXIN in der Meerschweinlunge nachgewiesen werden (Rothenberg et al., 1995). Im Jahr 1997 erfolgte in weiteren experimentellen Studien eine allergische Expo-

sition der Maus. Northern-Blot-Analysen zeigten daraufhin eine Erhöhung der EOTAXIN-mRNA in der Mauslunge, welche im Gegensatz zur EOTAXIN-Knockout-Maus mit einer Akkumulation der eosinophilen Granulozyten einherging (Luster et al., 1997). Im selben Jahr konnte dann eine vermehrte EOTAXIN-mRNA-Expression in der Nasenschleimhaut von Patienten mit saisonaler allergischen Rhinitis nachgewiesen werden (Minshall et al., 1997). Bronchialschleimhautbiopsien von Asthmatikern zeigten ebenfalls mittels Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung eine erhöhte EOTAXIN- und CCR-3-mRNA- und Protein-Expression (Ying et al., 1997 und Mattoli et al., 1997). Eine spezifische nasale Allergenprovokation bei 14 Kindern in Schweden zeigte als Reaktion eine EOTAXIN-induzierte eosinophile pulmonale Transmigration (Lonnkvist et al., 2002).

Bei der medikamentösen Behandlung zeigten Kortikosteroide eine ungezielte entzündungshemmende Wirkung und waren zudem bei längerfristiger Anwendung mit vielen Nebenwirkungen assoziiert. Nachdem klar wurde, dass auch RANTES für die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten bei Asthmatikern verantwortlich ist (Venge et al., 1996), gelang 1999 eine Hemmung der RANTES-mRNA-Bildung, indem bei Zellkulturen von TNF-alpha- und IL-1 beta-stimulierten humanen glatten Bronchialmuskulaturzellen Dexamethason hinzugegeben wurde (Pype et al., 1999). Weiterhin spielen bestimmte Chemokine eine regulative Rolle in der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), einer schleichend progressiven Erkrankung, die infolge einer chronischen Bronchitis mit zunehmender Obstruktion der peripheren Atemwege, vermehrter Bronchialschleimbildung und Emphysem einhergeht. Sputumuntersuchungen zeigten unter anderem eine Beteiligung von RANTES und MCP-1. Eine Antichemokinbehandlung könnte auch hier in Zukunft neue Behandlungsmöglichkeiten bieten (Chung et al., 2001 und Barnes et al., 2001). Weiterhin zeigte sich immunhistochemisch eine EOTAXIN- und CCR-3-Erhöhung der Lamina propria bei exazerbierter chronischer Bronchitis (Bocchino et al., 2002). Drei Jahre zuvor fand Capelli bereits eine vermehrte MIP-1-beta- und MCP-1-Bildung in der BAL von Rauchern mit chronischer Bronchitis im Vergleich zu Nichtrauchern (Capelli et al., 1999). Sputumanalyse und Untersuchung der Ausatemluft könnten

möglicherweise als nicht invasive risikoarme Methoden zur Verlaufs- und Erfolgskontrolle bei der Behandlung einer exazerbierten COPD im fortgeschrittenen Stadium eingesetzt werden.

Weiterhin gelten die pulmonalen Endothelzellen als Ursprungszellen für die Generation von Chemokinen, die die Migration von Leukozyten in die Lunge fördern. Mittels Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung zeigte sich bereits 2002, dass die humanen Endothelzellen die Ursprungszellen für die RANTES-Bildung bei Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie waren und somit die Migration von Monozyten regulierten. Damit zeigte sich, dass inflammatorische Mechanismen eine Rolle in der Entwicklung der pulmonal arteriellen Hypertonie spielen (Dorfmuller et al., 2002).

Immunhistochemisch zeigt sich in der vorliegenden Arbeit im isolierten Rattenmodell mit steigender Endotoxinstimulation eine vom Plasma unabhängige Zunahme der MIP-1-beta-Bildung und ein Anstieg der EOTAXIN-Bildung der pulmonalen Rattenendothelzellen, während die RANTES-, MCP-1- und CCR-1- Generation abnimmt. Dabei beschleunigt ein 1,5%iger Plasma-Zusatz vermutlich über den bekannten LPB-CD-14-Signaltransduktionsweg die Abnahme der MCP-1- und CCR-1-Bildung der Rattenendothelzellen. Ähnlich zeigte bereits Rollins in Zellkulturexperimenten eine Steigerung der MCP-1-mRNA-Bildung in humanen Endothelzellen nach einer dreistündigen Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF-alpha und IL1-beta (Rollins et al., 1990). Ein immunhistochemischer Nachweis von humanem MIP-1 beta unter physiologischen Bedingungen erfolgte bereits 1993 (Tanaka et al., 1993). Im selben Jahr zeigte Pugin eine Hochregulierung der Chemokinbildung der Endothelzellen nach LPS-Applikation (Pugin et al., 1993). 1997 fand sich an Biopsien der Bronchialschleimhaut von Asthmatikern und gesunden Teilnehmern mittels Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung eine höhere Expression von EOTAXIN und CCR-3-Bildung bei Asthmatikern (Ying et al., 1997).

Damit war ein weiterer Beweis erbracht, dass es sich hierbei um proinflammatorische Zytokine handelt. Zudem wurde die Bedeutung der Chemokine bei der Immunabwehr immer mehr erkannt. Im isolierten Rattenmodell zeigt sich

in der vorliegenden Arbeit mit zunehmender LPS-Dosis eine semiquantitativ von Plasmafaktoren unabhängige Steigerung der MIP-1-alpha-, MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1- und EOTAXIN-Expression der BALT-Lymphozyten, während sich zudem eine vom Plasma unabhängige Erhöhung der CCR-2B-Expression zeigt. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf einen von der LBP-CD-14-Achse unabhängigen Signaltransduktionsweg sein, welcher über einen sekundären Signaltransduktionsweg durch LPS-aktivierte Zytokine, wie TNF, induzierbar wäre und sich bei verschiedenen Erkrankungen entscheidend auf die Leukozytenmigration und damit die Immunabwehr auswirken könnte.

In der vorliegenden Arbeit reagieren neben Lymphozyten auch die Alveolarmakrophagen als wesentlicher Bestandteil der Immunabwehr im isolierten Rattenmodell mit einer Steigerung der proinflammatorischen Entzündungsmediatoren, wie MIP-1 alpha, RANTES und EOTAXIN, und zudem mit einer erhöhten Expression der Oberflächenproteine CCR-2B und CCR-4, welche die Leukozytenmigration einleiten und im Krankheitsfall für die Mobilisierung der Immunabwehr ausschlaggebend sind. Immunhistochemisch zeigt sich zudem eine starke CCR-5-Bildung der humanen Alveolarmakrophagen. CCR-5 scheint bei der HIV-Infektion als Co-Rezeptor beim Eintritt des HI-Virus in die Wirtzelle eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte bereits 1997 Verani in Zellkulturexperimenten durch PCR nach einer LPS-induzierten Chemokinbildung der humanen Makrophagen eine Unterdrückung der HIV-1-Infektion sowohl bei den T-Lymphozyten als auch in den Makrophagen nachweisen (Verani et al., 1997). Zudem erwies sich das Oberflächenprotein CCR-5 auf CD-4-positiven Lymphozyten als ein Co-Rezeptor bei HIV (Deng et al., 1996 und Alkhatib et al., 1996). Damit könnte eine Anti-CCR-5-Therapie eine mögliche Therapieoption der HIV-Infektion in der Zukunft sein. In-vitro-Studien von Wu zeigten bereits in diesem Zusammenhang erste Erfolge (Wu et al., 1997).

4.3. Verteilung von Chemokinen und Rezeptoren in Organsystemen von Ratte und Mensch

Im Rahmen eines Multiorganversagens bei Sepsis kommt es zu einer Änderung der Expression proinflammatorischer Chemokine, die nach einem Endotoxinreiz als Entzündungsmediatoren fungieren. Die immunhistochemische Lokalisation von Chemokinen und ihrer zugehörigen Rezeptoren in einzelnen Organsystemen unter physiologischen Bedingungen könnte zur weiteren Klärung der Pathogenese von septischem Multiorganversagen beitragen.

I. Leber

Als eingewanderte Makrophagen zeigen die Kupfferschen Sternzellen bei der Ratte eine MCP-1-, RANTES-, MIP-1-alpha-, MIP-1-beta- und eine CCR-4-Expression. Humane Kupffersche Sternzellen zeigen immunhistochemisch eine MCP-1-, CCR-2B- und CCR-1-Bildung. Damit wäre bei beiden Spezies eine autokrine Regulation unter normalen Bedingungen erklärbar. Zudem zeigt sich in beiden Spezies im Portalbereich eine RANTES- und CCR-3-Bildung des Gallengangepithels, so dass ein wechselseitiger Einfluss verschiedener Zelltypen der Leber mittels Chemokinen zur Immunregulation unter normalen Bedingungen denkbar erscheint. Doch nicht nur immunhistochemisch, sondern auch molekularbiologisch lassen sich die Chemokine in der humanen Leber nachweisen. So konnte Combadiere bereits 1995 mittels Northern Blot sowohl MIP-1-alpha/RANTES-Rezeptor-mRNA als auch MCP-1-Rezeptor-mRNA in der humanen Leber nachweisen (Combadiere et al., 1995). Die Rolle der Chemokine als Entzündungsmediatoren zur Mobilisierung der Immunabwehr konnte durch In-vivo- und In-vitro-Studien von Kopydlowski an der Mausleber noch einmal verdeutlicht werden. Nach einer LPS-Stimulation kam es zu einer Erhöhung von Chemokin-mRNA in der Mausleber (Kopydlowski et al., 1999).

II. Milz

Doch nicht nur in der Leber, sondern auch in der Milz beider Spezies zeigt sich ein immunhistochemischer Nachweis von Chemokinen. Die Sinusoide

der roten Pulpa und die Retikulumzellen als Teil der weißen Pulpa zeigen in beiden Spezies eine Proteinexpression von MCP-1, EOTAXIN und von dem Oberflächenprotein CCR-1. MCP-1-mRNA konnte von Yoshimura bereits 1991 in der Rattenmilz nachgewiesen werden (Yoshimura et al., 1991).

III. Gastrointestinaltrakt

Weiterhin zeigt sich im Gastrointestinaltrakt beider Spezies eine Chemokinbildung unter normalen Bedingungen. So zeigen die Belegzellen des Magens eine MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1-, EOTAXIN-, CCR-1- und CCR-2B-Expression, während die Oberflächenzellen und die Hauptzellen eine CCR-2B-Expression zeigen. Damit ist ähnlich wie in der Leber in beiden Spezies eine autokrine und eine wechselseitige Beeinflussung einzelner Magenzellen unter physiologischen Bedingungen gegeben. Im unteren Gastrointestinaltrakt zeigt sich bei beiden Spezies eine MIP-1-alpha-, MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1-, EOTAXIN- und CCR-1-5-Generation durch die Dickdarmoberflächenzellen. Die Intestinaldrüsen des Dickdarms zeigen eine MCP-1- und CCR-1-4-Expression. 1999 wurde bereits eine Proteinexpression und mRNA-Bildung von Chemokinrezeptoren im menschlichen Dickdarm durch Dwainell nachgewiesen (Dwainell et al., 1999). Die gleichzeitige Chemokin- und Chemokinrezeptorbildung ermöglicht neben einer systemischen Beeinflussung anderer Organe auch die Option einer Selbstregulation des Dickdarms.

Damit hat der Dickdarm neben der Lunge eine wesentliche immunologische Bedeutung. Dies wird vor allem im Falle der chronischen entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, deutlich. Grimm konnte in diesem Zusammenhang 1996 einen Anstieg von mehreren Chemokinen bei entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen (Grimm et al., 1996). Im selben Jahr wurde EOTAXIN in Darmbiopsien von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nachgewiesen (Garcia-Zepeda et al., 1996). Ein Anstieg dieser proinflammatorischen Entzündungsmediatoren korreliert mit der Mobilisierung der Immunabwehr im Erkrankungsfall.

IV. Haut

Auch in der Haut beider Spezies lassen sich immunhistochemisch Ursprungszellen für die Generation von Chemokinen lokalisieren, die die Migration von Leukozyten in die Haut fördern. Die Talgdrüsen, Haarfollikel und periphere Hautnerven zeigen eine MIP-1-beta-, RANTES-, MCP-1-, EOTAXIN- und CCR-1-Expression. Es ist bekannt, dass EOTAXIN selektiv auf eosinophile Granulozyten wirkt, die CCR-3 als Oberflächenrezeptor besitzen. Diese Tatsache könnte eine Involvierung von EOTAXIN bei allergischen Erkrankungen der Haut erklären. So fand 1999 Yawalkar immunhistochemisch und mittels rtPCR CCR-3- und EOTAXIN-mRNA und Protein in Biopsien gesunder menschlicher Haut, welche bei einer atopischen Dermatitis angestiegen waren (Yawalkar et al., 1999 und Garcia-Zepeda et al., 1996).

V. Niere

In der normalen humanen Niere zeigt das Tubulusepithel im Nierenrindenbereich eine MCP-1-, CCR-1- und CCR-3-Expression. Auch in der Rattenniere lassen sich immunhistochemisch Ursprungszellen von Chemokinen im Nierenrindenbereich lokalisieren. Jiang wies bereits 1998 durch Zellkulturexperimente und molekularbiologische Untersuchungen CCR-2- und CCR-5-mRNA in der Rattenniere nach (Jiang et al., 1998). Bei Patienten mit einer Glomerulonephritis zeigte sich ein Anstieg von MCP-1 im Urin, welcher mit zunehmender Proteinurie korrelierte (Rovin et al., 1996). Auch bei anderen Nierenerkrankungen konnte anhand von Biopsien immunhistochemisch ein Anstieg der MCP-1-Generation gezeigt werden (Prodjosudjadi et al., 1995). Beim akuten Nierenversagen im Rahmen eines septischen Schocks stellte dann Maier im Jahr 2000 einen Anstieg der Chemokingenexpression mit einem Maximum nach 12 h fest (Maier et al., 2000). Diese Daten bewiesen erneut die entscheidende Rolle der proinflammatorischen Zytokine als Entzündungsmediatoren bei der Immunabwehrregulation und Mobilisation im Rahmen einer Infektion bzw. Sepsis.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit der Endotoxin-vermittelten Regulation der Expression von Chemokinen und ihrer Rezeptoren in isoliert perfundierten Rattenlungen im Vergleich zur Basalexpression in verschiedenen Organsystemen in Ratte und Mensch. Die überwiegende Übereinstimmung der Daten über die Verteilung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in der Rattenlunge und in der humanen Lunge zeigt die grundlegende speziesübergreifende Bedeutung der zellulären Expression für ein Verständnis der Rolle der Chemokine und ihrer Rezeptoren bei der Pathogenese der Sepsis. Zudem bestätigen die Ergebnisse das Rattenmodell als geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Fragestellungen. In beiden Spezies ließen sich immunhistochemisch Ursprungszellen von Chemokinen und ihrer Rezeptoren unter normalen physiologischen Bedingungen lokalisieren. Bestimmte Zelltypen der Lunge, des Gastrointestinaltraktes, der Leber, der Haut, der Milz und der Niere ermöglichen durch gleichzeitige Chemokin- und Chemokinrezeptorbildung neben einer systemischen Beeinflussung auch die Option einer autokrinen Immunregulation mittels der Chemokine unter physiologischen Bedingungen. Daten aus der Literatur konnten die gewonnenen Ergebnisse einer Proteinexpression von Chemokinen und ihrer Rezeptoren sowohl im humanen Material als auch im Tiermodell in den zuvor genannten Organen unterstützen. In der vorliegenden Arbeit wurde Endotoxin, ein Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien eingesetzt, um die Regulation verschiedener Chemokine und ihrer Rezeptoren zu untersuchen. Immunhistochemisch zeigte sich in der Rattenlunge eine Steigerung der Chemokin- und Chemokinrezeptor-Expression innerhalb einer Versuchsdauer von 2 h nach einer LPS-Stimulation. Dabei zeigte sich eine Steigerung der Chemokinbildung auch unabhängig von 1,5%iger Plasmazugabe zum Pufferperfusat. Dies könnte für einen LPB-unabhängigen Weg der LPS-Stimulation sprechen. In diesem Fall scheinen die beobachteten Effekte von LPS nicht durch Plasma-Proteine bzw. LBP und CD 14 vermittelt zu werden.

Zusätzlich zu einer LBP-CD-14-Achse könnte somit zusätzlich ein CD-14- und Plasma-unabhängiger, sekundärer Signaltransduktionsweg durch LPS-aktivierte Zytokine wie z. B. TNF existieren. Eine vermehrte Sekretion von TNF war bei mehreren Studien mit LPS-perfundierten Lungen zuvor beobachtet worden. Die weitere Erforschung der LPS-induzierten Signaltransduktion der Chemokine über eine LBP-CD-14-Achse oder sekundär über TNF könnte als Teil eines hochkomplexen Netzwerkes der Immunregulation neue Aspekte der Pathogenese von Sepsis mit ARDS und Multiorganversagen aufzeigen und über neu entwickelte Therapiekonzepte die hohe Letalität auf der Intensivstation senken.

Hinweise aus der internationalen Literatur hinsichtlich allergischer oder entzündlicher Erkrankungen bestätigen sowohl anhand vom Biopsiematerial, BAL- und Urinuntersuchungen von Patienten als auch im tierexperimentellen Entzündungs- oder Allergiemodell einen nachweisbaren Anstieg von Chemokinen als proinflammatorische Entzündungsmediatoren, welche mit einer Mobilisierung der Immunabwehr mittels Chemotaxis und Leukozytenmigration im Erkrankungsfall korrelierte. Diese Daten bestätigen erneut die entscheidende Rolle der proinflammatorischen Chemokine als Entzündungsmediatoren bei der Immunabwehrregulation und Mobilisierung im Rahmen einer Infektion bzw. Sepsis und tragen zum Verständnis der Endotoxin-vermittelten pathophysiologischen Veränderungen unter septischen Bedingungen beim Multiorganversagen bei.

Summary and Conclusion

The present study compares the regulation of the endotoxin-mediated expression of chemokines and their receptors in isolated perfused rat lungs to the basal expression in various rat and human organ systems.

For the most part, the data on the distribution of chemokines and chemokine receptors correlate in the rat and human lung. To understand the role of chemokines and their receptors in the pathogenesis of sepsis is the cellular expression of fundamental importance. The results also confirm the rat model as a suitable animal model to investigate the objective of the present study. Cells expressing chemokines and their receptors were immunohistochemically located in both species under normal physiological conditions. Certain cell types in the lung, gastrointestinal tract, liver, skin, spleen, and kidney, which produce both chemokines and their receptors, exert not only a systemic effect but also have an autocrine immunoregulatory function via these chemokines. Data from the literature support the findings on protein expression of chemokines and their receptors in the aforementioned organ systems of humans as well as in animal models.

Endotoxin, a lipopolysaccharide (LPS) of gram negative bacteria, was used in this study to investigate the regulation of different chemokines and their receptors. An increase in chemokine and chemokine receptor expression was observed immunohistochemically in the rat lung within 2 h after LPS stimulation. This chemokine increase was seen independently of the addition of 1.5% plasma to the buffer perfusate. The LPS stimulation may be independent of the LBP pathway. In this case, the LPS effects observed here may not be caused by plasma proteins like LBP and CD 14.

On the other hand a CD 14 and plasma-independent secondary signal transduction pathway via LPS-induced cytokines such as TNF could exist. An enhanced secretion of TNF was previously observed in several studies with LPS-perfused lungs. The LPS-induced signal transduction of chemokines via a direct stimulation or secondarily via TNF may be part of a highly complex immunoregulatory network, which could reveal new aspects of the

pathogenesis of sepsis, ARDS and multiple organ failure. In addition, as a result the development of new therapy concepts may hopefully reduce the high lethality in intensive care units.

Data from the international literature on allergic and inflammatory diseases confirm a measurable increase in chemokines as proinflammatory mediators of inflammation in biopsy material, BAL and urine of patients as well as in inflammation and allergy models in animals. This correlates with a mobilization of the immune defense via chemotaxis and leukocyte migration in case of disease. These data confirm an essential role of proinflammatory chemokines as mediators of inflammation during immune defense regulation and mobilization during infection or sepsis. They add to the understanding of endotoxin-mediated pathophysiological changes under septic conditions during multiple organ failure.

6. Mögliche Therapiekonzepte der Blockade von Chemokinen und/oder ihrer Rezeptoren – Erste erfolgversprechende Ansätze

Seit der Entdeckung der Chemokine vor 20 Jahren sind ungefähr 40 Liganden und 20 Oberflächenrezeptoren bekannt. Eine Pubmed.-Literatursuche über Chemokine ergibt aktuell über 28.000 Artikel (Pease et al., 2006). Die Ergebnisse der Anfangsphase der Grundlagenforschung werden schrittweise nach Überprüfung im Tiermodell bereits in klinischen Studien der Phase 2 und 3 angewandt. Sie werden durch Blockade vor allem der Chemokinrezeptoren, die Schlüsselproteine zur Leukozyten-Migration, zu völlig neuen Therapie-Konzepten bei der Behandlung von HIV, Asthma Bronchiale, akutem Lungenversagen und Sepsis, Bronchialkarzinom, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und chronisch-progressiver interstitieller Nephritis beitragen.

Mittlerweile sind 20 Medikamente aus vier Substanzklassen zur antiretroviralen Behandlung von HIV bekannt. Langzeitnebenwirkungen schränken häufig die Therapie ein. Das Hüllprotein gp120 von HIV-1 dockt an den Rezeptor der CD-4-Zelle an. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung der beiden Proteine und gp120 kann an den CCR-5-Rezeptor binden. Das HI-Virus braucht somit außer dem CD-4-Rezeptor noch eine zusätzliche Andockstelle, einen Co-Rezeptor, um in die Immunzelle eindringen zu können. Diese Andockstellen sind die Chemokinrezeptoren CCR-5 und CXCR4. Als mögliche Therapie kann zum Ersten die Anbindung vom HI-Virus an die Wirtzellenoberfläche durch Inhibitoren wie Cyanovirin-N und Cyclotriazadisulfonamid Analoga PRO 2000, TNX 355 und PRO 542 blockiert werden. Zudem verhindert BMS 806 die CD-4-induzierte Konformationsänderung. Zweitens wird die Interaktion mit dem Co-Rezeptor durch die CCR-5-Antagonisten SCH-D, Maraviroc (UK 427857) und Aplaviroc (GW 873140) und durch den CXCR4-Antagonisten AMD-3100 blockiert, während die Fusion der viralen und der Zellmembran durch Peptide wie Enfuvirtide und Tifuvirtide (T 1249) inhibiert wird (Reeves et al., 2005). Eine doppel-blinde randomisierte Plazebo-kontrollierte klinische Phase-2-Studie mit 70 Patienten

scheint bezüglich der oral einnehmbaren CCR-5-Antagonisten vielversprechend und bis auf leichte gastrointestinale Beschwerden in der Anfangsphase der Einnahme gut verträglich zu sein (Adkison et al., 2005).

Zwischen 1980 und 1994 ist die Zahl der Asthma-Erkrankungen in den USA um 75 % gestiegen. Weltweit sind etwa 150 Millionen Menschen an Asthma erkrankt – und ihre Zahl nimmt weiter zu. Die Häufigkeit von Asthma bei Erwachsenen in Deutschland liegt bei 6.000 von 100.000 Einwohnern; insgesamt rechnet man mit vier Millionen Asthmakranken. Darunter sind eine Million Kinder in Deutschland betroffen. Ein neuer oral verfügbarer selektiver CCR-3-Antagonist kann die aktuelle Therapie ergänzen. Bei Affen bewirkt die intravenöse Gabe von 1 mg/kg YM-355179, ein CCR-3 Antagonist, eine Inhibition der eosinophilen Infiltration nach einer segmentalen Bronchoprovokation mit EOTAXIN (Morokata et al., 2005).

Die akute respiratorische Insuffizienz (ARDS) ist ein häufiges letales Krankheitsbild auf Intensivstationen. Das akute Lungenversagen entwickelt sich häufig unter Einwirkung verschiedener Noxen nach einer Sepsis. Es ist von einer schweren Hypoxie und diffusen bilateralen pulmonalen Infiltraten begleitet. Die Letalität liegt bei 50 %. HMBGX1 (High mobility group box 1) ist ein Spätmediator der Letalität bei der Sepsis. Bei der Maus bewirkt eine intratracheale Gabe von HMBGX1 eine Lungenentzündung begleitet von einer Akkumulation von MIP-2 und einer neutrophilen Leukozytose. In diesem Mausmodell der Sepsis kann mit einer subkutanen Gabe von 200 µg Antileukinate, ein Alpha-Chemokinrezeptor-Hemmer, die Letalität der septischen Mäuse von 89 % in der nicht behandelten Tiergruppe auf 58 % in der Gruppe der behandelten Mäuse gesenkt werden. Die Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage der Mauslunge verringert sich von 8,1 +/- 2,4 x 10(4) auf 2,9 +/- 3,2 x 10 (4) Zellen (Lin et al., 2005). Antileukinate bietet somit eine Therapieoption zur Behandlung der Sepsis.

Das Bronchialkarzinom tritt am häufigsten zwischen dem 65. und 70. Lebensjahr auf und ist in Deutschland die häufigste Krebsart bei Männern. Pro Jahr erkranken in Deutschland über 42.000 Menschen an Lungenkrebs. Eine Behandlung mit Anti-CXCR2, ein CXC-Chemokinrezeptor, kann möglicher-

weise zur Therapie des Bronchialkarzinoms beitragen. In einem Mausmodell zeigte sowohl die Depletion als auch die Neutralisierung von CXCR2 mittels Antikörpern eine Steigerung der Nekrose und eine Reduzierung der Vaskularisierung der Tumorzellen (Keane et al., 2004).

An Morbus Crohn leiden in Deutschland 170.000 Menschen, in den USA sind es zwischen 400.000 und 1 Million. Jährlich kommen dort 20.000 Neuerkrankungen hinzu. Der Altersgipfel wird mit 15-40 Jahren beschrieben. Eine vielversprechende Therapie mit einem Chemokinrezeptorantagonisten kann mittels TAK-779, ein Antagonist von CCR-2, CXCR3 und CCR-5, zur Behandlung chronischer Darmerkrankungen wie z. B. M. Crohn eingesetzt werden. Am Mausmodell einer Natriumdextransulfat-induzierten experimentellen Kolitis kann bereits mit TAK-779 eine signifikante Blockade der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in Lamina Propria der Kolonschleimhaut und eine deutliche Senkung der Expression von Kolon IL-1 beta IL-6 erreicht werden (Tokuyama et al., 2005).

Weiterhin beweist sich BX471, ein CCR-1 Antagonist, als eine neue therapeutische Strategie in einem Mausmodell der Adriamycin-induzierten fokalsegmentalen Glomerulosklerose mit nephrotischem Syndrom und progressiver interstitieller Entzündung und Fibrose. Bei einem Teil der Mäuse erfolgen zwei intravenöse Injektionen (13 mg/kg) am Tag 0 und Tag 14. Die Behandlung mit BX471 beginnt dann am Tag 14, wenn Proteinurie und interstitielle Entzündung sich bereits gebildet haben. In der 6. Woche zeigt sich bei nicht behandelten Mäusen eine tubulärinterstitielle Erkrankung mit tubulärer Atrophie und Dilatation, eine interstitielle Leukozytenansammlung und zuletzt eine Fibrose. m-RNA von CCR-1 und den zugehörigen Liganden MIP-1 alpha und RANTES steigt in den erkrankten Mäusenieren. Auffällig ist hierbei eine deutliche Steigerung der Expression von RANTES. Im Vergleich zu dieser erkrankten Gruppe der Mäuse zeigt sich in der BX471-behandelten Gruppe eine deutliche interstitielle Reduktion der Makrophagen um 51 % und der T-Lymphozyten um 22 %, der interstitiellen Fibroblasten um 48 % und des interstitiellen Volumens um 23 %. Dagegen zeigt sich das Ausmaß der glomerulären Sklerose und der Proteinurie unter BX471-Gabe unverändert.

Die Behandlung mit BX471 zur Reduzierung der interstitiellen Leukozyten-Akkumulation und der Fibrose bei progressiver Nephropathie stellt somit eine neue Therapiestrategie dar (Vielhauer et al., 2004).

HIV und Asthma Bronchiale und das Bronchialkarzinom haben eine zunehmende Inzidenz und Prävalenz. Das akute Lungenversagen nach einer Sepsis geht mit einer hohen Letalität auf Intensivstationen einher. Weitere Tiermodelle und klinische Studien sind dringend notwendig. Die ersten Medikamente mit Chemokinrezeptorantagonisierung werden vermutlich in naher Zukunft zugelassen und bedeuten einen erheblichen Therapiefortschritt.

7. Literaturverzeichnis

Adkison K.K., Shachoy-Clark A., Fang L., Lou Y., O'Mara K., Berrey M.M., Piscitelli S.C. Pharmacokinetics and short-term safety of 873140, a novel CCR5 antagonist, in healthy adult subjects. Antimicrob. Agents Chemother. 2005;49:2802-6

Alkhatib G., Combadiere C., Broder C.C., Feng Y., Kennedy P.E., Murphy P.M., Berger E.A. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. Science 1996;272:1955-8.

Andro T., Kusugami K., Ohusuga M., Ina K., Ichiyama S., Nada T., Ohta M. Mucosal macrophage inflammatory protein-1 alpha levels are increased in Helicobacter pylori infection. J. Clin. Gastroenterol. 1998;27 Suppl. 1:144-9.

Antoniades H.N., Neville-Golden J., Galanopoulos T., Kradin,R.K., Valente A.J., Graves D.T. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1992;89:5371-5.

Arbour N., Lorenz E., Schutte B., Zabner J., Kline J., Jones M., Frees K., Watt J., Schwartz A. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat. Genet. 2000;25:187-91.

Baggiolini M., Dahinden C.A. CC Chemokines in allergic inflammation. Immunol. Today 1994;15:127-33.

Baggiolini M., Dewald B., Moser B. Human chemokines: an update. Annu. Rev. Immunol. 1997;15:675-705.

Baggiolini M., Dewald B., Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines CXC and CC chemokines. Adv. Immunol. 1994;55:97-179.

Baggiolini M., Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. Immunol. Today 2000;21:418-20.

Barnes P.J. Cytokine modulators as novel therapies for airway disease. Eur. Respir. J. Suppl. 2001;34:67s-77s.

Bazan J.F., Bacon K.B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D.R., Zlotnik A., Schall T.J. A new class of membrane-bound chemokines with a CX(3)C motif. Nature 1997;385:640-4.

Ben-Baruch A., Michiel D.F., Oppenheim J.J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. J. Biol. Chem. 1995;270:11703-6.

Berkman N., John M., Rosems G., Jose P., Barnes P.J., Chung K.F. Interleukin-13 inhibits macrophage protein-1 alpha production from human alveolar macrophages and monocytes. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1996;15:382-9.

Berkman N., Robichaud A., Krishnan V.L., Roesems G., Robbins R., Jose P.J., Barnes P.J., Chung K.F. Expression of RANTES in human airway epithelial cells: effect of corticosteroids and interleukin-4, -10 and -13. Immunology 1996;87:599-603.

Berkman N., Krishnan V.L., Gilbey T., Newton R., O'Connor B., Barnes P.J., Chung K.F. Expression of RANTES mRNA and protein in airways of patients with mild asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996;154:1804-11.

Bocchino V., Bertorelli G., Bertrand C.P., Ponath P.D., Newman W.C., Marruchella A., Merlini S., Del Donno M., Zhuo X., Olivieri D. Eotaxin and CCR-3 are up-regulated in exacerbation of chronic bronchitis. Allergy 2002;57:17-22.

Bone R.C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. Clin. Microbiol. Rev. 1993;6:57-68.

Brieland J.K., Flory C.M., Jones M.L., Miller G.R., Remick D.G., Warren J.S., Fantone J.C. Regulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Expression and Secretion in Rat Pulmonary Alveolar Macrophages by Lipopolysaccharide, Tumor Nekrosis Factor-alpha and Interleukin-1ß. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995;12:104-9.

Brieland J.K., Jones M.L., Clarke S.J., Baker J.B., Warren J.S., Fontone J.C. 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. 1992; 7:134-39.

Brigham K.L., Meyrick B. Endotoxin and lung injury. Am. Rev. Respir. Dis. 1986;133:913-27.

Capelli A., Di Stefano A., Gnemmi I., Balbo P., Cerutti C.G., Balbi B., Lusuardi M., Donner C.F. Increased MCP-1 and MIP-1 beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. Eur. Respir. J. 1999;14:160-5.

Charo I.F., Myers S.J., Herman A., Franci C., Conolly A.J., Coughin S.R. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the cabroxyl-terminal tail. Proc. Natl. Acad. Sci. 1994;91:2752-6.

Charo I.F., Ransohoff R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N. Engl. J. Med. 2006;354(6):610-621.

Christman J.W., Blackwell T.R., Cowan H.B., Shepherd V.L., Rinaldo J.E. Endotoxin induces the expression of macrophage inflammatory protein 1 alpha mRNA by rat alveolar and bone marrow-derived macrophages. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1992;7:455-61.

Chung K.F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. Eur. Respir. J. Suppl. 2001;34:50s-9s.

Chvatchko Y., Hoogewerf A.J., Meyer A., Alouani S., Juillard P., Buser R., Conquet F., Proudfoot A.E., Wells T.N., Power C.A. A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. J. Exp. Med. 2000;191:1755-64.

Cocch F., De Vico A.L., Garzino-Demo A., Arya S.K., Gallo R.C., Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. Science 1995;270:1811-5.

Colotta F., Borre A., Wang J.M., Tattanelli M., Maddalena F., Polentarutti F.N., Peri G., Mantovani A. Expression of monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. J. Immunol. 1992; 48:760-5.

Combadiere C., Ahuja S.K, Murphy P.M. Cloning, chromosomal localization, and RNA expression of a human beta chemokine receptor-like gene. DNA Cell Biol. 1995;14:673-80.

Combadiere C., Ahuja S.K., Tiffany H.L. Murphy P.M., Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC Chemokine receptor for MIP-1 alpha, MIP-1 beta and RANTES. J. Leukoc. Biol. 1996;60:1-6.

Cook D.N. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hemattopoesis. J. Leukoc. Biol. 1996;59:61-6.

Cook E.B., Stahl J.L., Lilly C.M., Haley K.J., Sanchez H., Luster A.D., Graziano F.M., Rothenberg M.E. Epithelial cells are a major cellular source of the chemokine eotaxin in the guinea pig lung. Allergy Asthma Proc. 1998;19:15-22.

Crofford, L.J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. J. Rheumatol. Suppl. 1997;49:15-19.

Cruikshank W.W., Long A., Tarpy R.E., Kornfeld H., Caroll M.P., Teran L., Holgate S.T., Center D.M. Early Identification of Interleukin-16 (Lymphocyte Chemoattractant Factor) and Macrophage Inflammatory Protein 1 (MIP-1 alpha) in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Antigen-challenged Asthmatics. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995;13:738-47.

Cummings C., Martin T., Frevert C., Quan J., Wong V., Mongovin S., Hagen T., Steinberg K., Goodman R. Expression and Function of the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 in Sepsis. J. Immunol. 1999;162:2341-6.

Daugherty B.L., Siciliano S.J., DeMartino J.A., Malkowitz L., Sirotina A., Springer M.S. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. J. Exp. Med. 1996;183:2349-54.

Dellinger R., Opal S.M., Rotrosen D., Suffredini A.F., Zimmerman J.L. From the bench to the bedside: the future of sepsis research. Chest 1997;111:744-53.

Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., Di Marzio P., Marmon S., Sutton R.E., Hill C.M., Davis C.B., Peiper S.C., Schall T.J., Littmann D.R. Landau N.R. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature 1996;381:661-6.

Dens M. Proinflammatory Cytoines in Hypersensitivity Pneumonitis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995;151:164-9.

Denthol E.M., Wolber F.M., Phan S.H. Secretion of monocyte chemotactic activity by alveolar macrophages. Am. J. Pathol. 1989;135:571-80.

Department of Pharmacology, Gifu Pharmaceutal University, Japan. Pharmacology. 1998;56:230-6.

Dorfmuller P., Zarka V., Durand-Gasselin I., Monti G., Balabanian K., Garcia G., Capron F., Coulomb-Lhermine A., Marfaing-Koka A., Simonneau G., Emilie D., Humbert M. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002;165:534-9.

Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., Martin S.R., Huang Y., Nagashima K.A., Cayanan C., Maddon P.J., Koup R.A., Moore J.P., Paxton W.A. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. Nature 1996;381:667-73.

Dwainell M.B., Eckmann L., Leopard J.D., Varki N.M., Kangnoff M.F. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. Gastroenterology 1999;117;359-67.

El Samalouti V.T., Schletter J., Chyla I., Lentschat A., Mamat U., Brade L., Flad H.D., Ulmer A.J., Hamann L. Identification of the 80-kDA LPS-binding protein (LMP80) as decay-accelerating factor (DAF, CD55). FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1999;23:259-69.

Elsner J., Hochstetter R., Kimming D., Kapp A. Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. Eur. J. Immunol. 1996;26:1919-25.

Endo T., Ogushi F., Sone S., Ogura T., Taketani Y., Hayashi Y., Ueda N., Yamamaoto S. Induction of cyclooxygenase-2 is responsible for interleukin-1b-dependent prostaglandin E2 synthesis by human lung fibroblasts. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995;12:358-65.

Ermert M., Merkle M., Mootz R., Grimminger R.F., Seeger W., Ermert L. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2000;278:1195-203.

Evans G.F., Snyder Y.M., Butler L.D., Zuckerman S.H. Differential expression of interleukin-1 and tumor necrosis factor in murine septic shock models. Circ. Shock 1989;29:279-90.

Fraziano M., Cappelli G., Santucci M., Mariani F., Amicosante M., Casarini M., Giosue S., Bisetti A., Colizzi V. Expression of CCR-5 is increased in human monocyte-derived macrophage and alveolar macrophages in the course of in vivo and in vitro Mycobacterium tuberculosis infection. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1999;15:869-74.

Ganzalo, J.A., Jia G.Q., Aguirre V., Friend D., Coyle A.J., Jenkins, N.A., Lin, G.S. Katz. H., Lichtmann A., Copeland N., Kopf M., Gutierrez Ramos J.C. Mouse eotaxin expression parallels eosinophil accumulation during lung allergic inflammation but it is not restricted to a Th2-type response. Immunity 1996;4:1-14.

Gao J.L. Kuhns D.B., Tiffany H.L., McDermott D., LI X., Francke U., Murphy P.M. Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha /RANTES receptor. J. Exp. Med. 1993;177:1421-7.

Gao J.L., Wynn T.A., Chang Y., Lee E.J., Broxmeyer H.E., Cooper S., Tiffany H.L., Westphal H., Kwon-Chung J., Murphy P.M. Impaired host defence, hematopoiesis, granlomatous inflammation and type 1- type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. J. Exp. Med. 1997;185:1959-68.

Garcia-Zepeda E., Rothenberg M.E., Ownbey R.T., Celestin J., Leder P., Luster, A.D. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. Nat. Med. 1996;2:449-56.

Ghosh S., Latimer R.D., Gray B.M., Harwod, R.J., Oduro A. Endotoxin-induced organ injury. Crit. Care Med. 1993;21:19-24.

Gillitzer R., Wolff K., Tong D., Muller C., Yoshimura T., Hartmann A.A., Stingl G., Berger R. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. J. Invest. Dermatol. 1993;101:127-31.

Griffiths-Johnson D.A., Collins P.D., Rossi A.G., Jose P.J., Williams T.J. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo. Biochem. Biophy. Res. Commun. 1993;197:1167-72.

Grimm M.C., Elsbury S.K., Pavli P., Doe W.F. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. J. Leukoc. Biol. 1996;59:804-12.

Gunn M.D., Nelken N.A., Liao X., Williams L.T. 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. 1997;158:376-83.

Harrington P.M., Newton D.J., Williams C.M., Hunt J.A., Dearman R.J., Kimber I., Coleman J.W., Flanagan B.F. Eotaxin and eotaxin receptor(CCR3) expression in Sephadex particle-induced rat lung inflammation. Int. J. Exp. Path. 1999;80:177-85.

Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y.,Takeda K., Akira S. Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice are hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 and the Lps Gene Product. J. Immunol. 1999;162:3749-52.

Ichiyasu H., Suga M., Matsukawa A., Iyonaga K., Mizobe T., Takahashi T., Ando M. Functional roles of MCP-1 in Propionibacterium acnes-induced T cell-mediated pulmonary granulomatosis in rabbits. J. Leukoc. Biol. 1999;65:482-91.

Iilda K., Kawakami Kadta J., Matsubara K., Shirai Y., Kohono R.S. Analysis of T cell subsets and chemokines in patient with pulmonary sarcoidosis. Thorax. 1997;52:431-7.

Ingalls R.R., Golenbock D.T. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. J. Exp. Med. 1995;181:1473-9.

Iyonaga K., Takeya M., Saita N., Sakamoto O., Yoshimura T., Ando M., Takahashi K. Monocyte chemoattractant protein-1 in idiopathic pulmonary fibrosis and other intestinal lung diseases. Hum. Pathol. 1994;25:455-63.

Jiang Y., Salafranca M.N., Adhikari S., Xia Y., Feng L., Sonntag M.K., deFiebre C.M., Pennel N.A., Streit W.J., Harrison J.K. Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. J. Neuroimmunol. 1998;86:1-12.

John M., Hirst S.J., Jose P.J., Robichaud A., Berkmann N., Witt C., Twort C., Barnes P.J., Chung K.F. Human Airway Smooth Muscle Cells Express and Release RANTES in Response to T Helper 1 Cytokines. J. Immunol. 1997;158:1841-7.

Keane M.P., Belperio J.A., Xue Y.Y., Burdick M.D., Strieter R.M. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. J. Immunol. 2004;172:2853-60.

Kelner G.S., Kennedy J., Bacon K.B., Kleyensteuber S., Largaespada D.A., Jenkins N.A., Copeland N.G., Bazan J.F., Moore K.W., Schall T.J., Zlotnik A. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. Science 1994;266:1395-9.

Koch A.E., Kunkel S.L., Harlow L.A., Johnson B., Evanoff H.L., Haines G.K., Burdick M.D., Pope R.M., Strieter R.M. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. J. Clin. Invest. 1992;90:772-9.

Kolios G., Wright K.L., Jordan N.J., Leithead J.B., Robertson D.A., Westwick J. C-X-C and C-C chemokine expression and secretion by the human colonic epithelial cell line, HT-29: differential effect of T lymphocyte-derived cytokine. Eur. J. Immunol. 1999;29:530-6.

Kopydlowski K.M., Salkowski C.A., Cody M.J., van Rooijen N., Major J., Hamilton T.A., Vogel S.N. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. J. Immunol. 1999;163:1537-44.

Kucharzik T., Lugering N., Pauels H.G., Domschke W., Stoll R. IL-4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells. Clin. Exp. Immunol. 1998;111:152-7.

Lane S.J., Soh C., Hallsworth M.P., Sousa A., Litchfield T., Poston R.N., Arm J.P., Lee T.H. Monocytes and macrophages in asthma. Int. Arch. Allergy Immunol. 1992;99:200-3.

Lee B., Montaner L.J. Chemokine immunbiology in HIV-1 pathogenesis. J. Leukoc. Biol. 1999;65:552-65.

Leonard E.J., Takeya M., Skeel A., Yoshimura T. Biological aspects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Adv. Exp. Med. Biol. 1991;305:57-64.

Lin X., Yang H., Sakuragi T., Hu M., Mantell L.L., Hayashi S., Al-Abed Y., Tracey K.J., Ulloa L., Miller E.J. Alpha-chemokine receptor blockade reduces high mobility group box 1 protein-induced lung inflammation and injury and improves survival in sepsis. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2005;289:583-90.

Lonnkvist K., Moshfegh A., Pedroletti C., Hedlin G., Hallden G. Increased eosionphil transmigration after nasal allerge challenge in children with allergic asthma and rhinitis. Allergy. 2002;57:1200-4.

Luster A.D., Rothenberg M.E. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. J. Leukoc Biol. 1997;62:620-33.

Luster A.D. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. N. Engl. J. Med. 1998;338:436-45.

Lynn W.A., Liu Y., Golenbock D.T. Neither CD14 is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide. Infect. Immun. 1993;61:4452-61.

Maier S., Emmanuilidis K., Entleutner M., Zantl N., Werner M., Pfeffer K., Heidecke C.D. Massive chemokine transcription in acute renal failure due to polymicrobial sepsis. Shock 2000;14:187-92.

Manthey C.L., Vogel S.N. The role of cytokines in host response to endotoxin. Rev. Med. Microbiol. 1992;3:72.

Martin T.R., Mathison J.C., Tobias P.S., Leturcq D.J., Moriarty A.M., Maunder R.J., Ulevitch R.J. Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. J. Clin. Invest. 1992;90:2209-19.

Mattoli S., Stacey M., Sun A., Bellini G., Marini M. Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma. Biochem, Biophys. Res. Commun. 1997;236:299-301.

Mazzucchelli L., Hauser C., Zgraggen K., Wagner H.E., Hess M.W., Laissue J.A., Mueller C. Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammation bowel disease. J. Pathol. 1996;178:201-6.

Medhitov R. Toll-Like Receptors and Innate Immunity. Nat. Rev. 2001;1:135-45.

Minshall E., Cameron L., Lavigne F., Leung D.Y., Hamilos D., Garcia-Zepada E.A., Rothenberg M.E., Luster A.D., Hamid Q. Eotaxin mRNA expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal responses in seasonal allergic rhinitis. Am. J. Resir. Cell Mol. Biol. 1997;17:683-90.

Morokata T., Suzuki K., Masunaga Y., Taguchi K., Morihira K., Sato I., Fujii M., Takizawa S., Torii Y., Yamamoto N., Kaneko M., Yamada T., Takahashi K., Shimizu Y. A novel, selective, and orally available antagonist for CC chemokine receptor 3. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. Pubmed. Abstract ahead of print.

Murphy P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. Annu. Rev. Immunol. 1994;12:593-633.

Nelken N.A., Coughlin S.R., Gordon D., Wilcox J.N. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. J. Clin. Invest. 1991;4:1121-7.

Neote K., DiGregorio D., Mak. J.Y., Horuk R., Schall T.J. Molecular cloning, functional expression, and signalling characteristics of a CC chemokine receptor. Cell 1993;72:415-25.

Newton R.C., Vaddi K. Biological responses to C-C chemokines. Methods Enzymol. 1997;287:174-86.

O'Grady N.P., Tropea M., Preas H.L. 2nd, Reda D., Vandivier R.W., Banks S.M., Suffredini A.F. Detection of macrophage inflammatory protein(MIP)-1 alpha and MIP-1 beta during experimental endotoxemia and human sepsis. J. Infect. Dis. 1999;179:136-41.

Paine R., Rolfe M.W., Standiford T.J., Burdick M.D., Rollins B.J., Strieter R.M. MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. J. Immunol. 1993;150:4561-70.

Pan Y., Lloyd C., Zhou H., Dolich S., Deeds J., Gonzalo J.A., Vath J., Gosselin M., Ma J., Dussault B., Woolf E., Alperin G., Culpepper J., Gutierrez-Ramos J.C., Gearing D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. Nature 1997;387:611-7.

Patel V.P., Kreider B.L., Li Y., Li H., Leung K., Salcedo T., Nardelli B., Pippalla V., Gentz. S., Thotakura R. Parmelee D., Gentz, R.G., Garotta G. Molecular and functional characterization of two novel human CC chemokines as inhibitors of two distinct classes of myeloid progenitors. J. Exp. Med. 1997;185:1163-72.

Pease J.E., Williams T.J. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. Br. J. Pharmacol. 2006;147:212-21.

Petrek M., Pantelidis P., Southcott A.M., Lympany P., Safranek P., Black C.M., Kolek V., Weigl E., du Bois R.M. The source and role of RANTES in interstitial lung disease. Eur. Respir. J. 1997;10:1207-16.

Ponath P.D., Quin S., Post T.W., Wang J., Wu L., Gerad N.P., Newman W., Gerad C., Mackay C.R. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. J. Exp. Med. 1996;183:2437-48.

Poston, R.N., Chanez P., Litchfeld T., Lee T.H., Bousquet J. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi. Am. Rev. Respir. Dis. 1992;145:918-21.

Power C.A., Meyer A., Nemeth K., Bacon K.B. Hoogewerf A.J., Proudfoot A.E., Wells. T.N. Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. J. Biol. Chem. 1995;270:19495-500.

Prodjosudjadi W., Gerritsma J.S., van-Es L.A., Daha M.R, Bruijn J.A. Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis. Clin. Nephrol. 1995;44:148-55.

Proost P., Wuyts A., Van Damme J. The role of chemokines in inflammation. Int. J. Clin. Lab. Res. 1996;26:211-23.

Pugin, J., Schürer M., Leturcq D., Moriarty A., Ulevitch R.J., Tobias P.S. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993;90:2744-8.

Pype J.L., Dupont L.J., Menten P., Van Coillie E., Opdenkker G., Van Damme J., Chung K. F., Demedts M.G., Verleden G.M. Expression of monocytes chemotactic protein(MCP)-1, MCP-2 and MCP-3 by human airway smooth muscle cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1999;21:528-36.

Quershi T., Larivière L., Leveque G, Clermont S., Moore K., Gros P.H., Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like Receptor 4 (Tlr4). J. Exp. Med. 1999;184:615-65.

Qui H., Pan J., Zhao Y. The role of TNF alpha, IL-1 beta and MIP-1 alpha in LPS-induced organ injury. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 1996;76:254-7.

Reeves J.D., Piefer A.J. Emerging drug target for antiretroviral therapy. Drugs. 2005;65:1747-66.

Rollins B.J. „Oh no. Not another cytokine". – MCP-1 and respiratory disease. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1992;7:126-7.

Rollins B.J. Chemokines. Blood 1997;90:909-28.

Rollins B.J., Yoshimura T., Leonard E.J. Pober J.S. Cytokine activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemottractant, MCP-1/ JE. Am. J. Pathol. 1990;136:1229-33.

Rothenberg M.E., Luster A.D., Leder P. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in IL-4 induced tumor suppression. Proc. Nat. Acad. Sci. 1995;92:8960-4.

Rothenberg M.E., Luster A.D., Lilly C.M., Drazen J.M., Leder, P. Constitutive and allergen-induced expression of eotaxin mRNA in the guinea pig lung. J. Exp. Med. 1995;181:1211-6.

Rottman J.B., Ganley K.P., Wiliams K., Wu L., Mackay C.R., Ringler D.J. Cellular localization of the chemokine receptor CCR5: Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. Am. J. Pathol. 1997;151:1341-51.

Rovin B.H., Doe N., Tan L.C. Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. Am. J. Kidney Dis. 1996;27:640-6.

Sakanashi Y., Takeya M., Yoshimura T., Feng L., Morioka T., Takahashi K. Kinetics of macrophage subpopulations and expression of monocyte chemottractant protein-1 (MCP-1) in bleomycin-induced lung injury of rats studied by a novel monoclonal antibody against rat MCP-1. J. Leukoc. Biol. 1994;56:741-50.

Samson M., Labbe O., Mollereau C., Vassart G., Parmentier M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC chemokine receptor gene. Biochem. 1996;35:3362-7.

Sarafi M.N., Garcia-Zepeda N.G., MacLean E.A., Charo I.F., Luster A.D. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: A novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. J. Exp. Med. 1997;185:99-109.

Schütte H., Rosseau S., Czymek R., Ermert L., Walmrath D., Kramer H.J., Seeger W. Grimminger F. Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997;156:819-24.

Seino Y., Ikeda U., Takahashi M., Hojo Y., Irokawa M., Kasahara T., Shimada K. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular tissue. Cytokine 1995;7:575-9.

Shanley T.P., Schmal H., Friedl H.P., Jones M.L., Ward P.A. Role of Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha in Acute Lung Injury in Rats. J. Immunol. 1995;154:4793-802.

Shi M.M., Chong I.W., Long N.C., Love J.A., Godleski J.J., Paulauskis J.D. Functional characterization of recombinant rat macrophage inflammatory protein-1 alpha and mRNA expression in pulmonary inflammation. Inflammation 1998;22:29-43.

Sica A., Saccani A., Borsatti A., Power C.A., Wells T.N., Luini W., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of CC chemokine receptors in human monocytes. J. Exp. Med. 1997;185: 969-74.

Smith R.E., Strieter R.M., Phan S.H., Lukacs N., Kunkel S.L. TNF and IL-6 mediate MIP-1 alpha expression in bleomycin-induced lung injury. J. Leukoc. Biol. 1998;64:528-36.

Smith R.E., Strieter R.M., Zhang K., Phan S.H., Standford T.J., Lukacs N.W., Kunkel S.L. A role for CC chemokines in fibrotic lung disease. J. Leukoc. Biol. 1995;57:782-7.

Sousa A.R., Nakhosteen S.J.A., Yoshimura T., Lee T.H., Poston R.N. Increased Expression of the Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Bronchial Tissue from Asthmatic Subjects. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1994;10:142-7.

Standiford T., Kunke J., Phan S.H., Rollins B.J., Strieter R.M. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human type II-like epithelial cells. J. Biol. Chem. 1991;266:9912-8.

Standiford T.J., Mark J., Wolfe W., Kunkel S.L., Lynch J.P., Burdick M.D., Gilbert A.R., Orringer M.B., Whyte R., Strieter R.M. Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha Expression in Interstitial Lung Disease. J. Immunol. 1993;151:2852-63.

Standiford T.J., Kunkel S.L., Lukacs N.W., Greenberger M.J, Danforth J.M., Kunkel R.G., Strieter R.M. Macrophage inflammatory protein-1 mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. J. Immunol. 1995;155:1515-24.

Standiford T.J., Strieter R.M., Lukacs N.W., Kunkel S.L. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia: cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. J. Immunol. 1995;155:2222-9.

Sun Y., Robinson D.S., Meng Q., Rottman J., Kennedy R., Ringler D.J., Mackay C.R., Daughert B.L., Springer M.S., Durham S.R., Williams T.J., Kay A.B. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. Eur. J. Immunol. 1997;27:3507-16.

Takeya M., Yoshimura T., Leonard E.J., Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. Human Pathol. 1993;24:534-9.

Tanaka Y., Adams D.H., Hubscher S., Hirano H., Siebenlist U., Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan immobilized cytokine MIP-1ß. Nature 1993;361:79-82.

Taub D. Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well. Cytokine Growth Factor Rev. 1996;7:355-76.

Tobias P.S., Soldau K., Gegner J.A., Mintz D., Ulevitch R.J. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. J. Biol. Chem. 1995;270:10482-8.

Tokuyama H., Ueha S., Kurachi M., Matsushima K., Moriyasu F., Blumberg R.S., Kakimi K. The simultaneous blockade of chemokine receptors CCR2, CCR5 and CXCR3 by a non-peptide chemokine receptor antagonist protects mice from dextran sodium sulfate-mediated colitis. Int. Immunol. 2005;17:1023-34.

Ulevitch R.J. Endotoxin opens the tollgate to innate immunity. Nat. Med. 1999;5:144-5.

Ulevitch R.J. Toll gates for pathogen selection. Nature 1999; 401:755-6.

Ulevitch, R.J. Recognition of bacterial endotoxin in biologic systems. Lab Invest 1991;65:121-2.

Ulevitch R.J., Tobias P.S. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Curr. Opin. Immunol. 1999;11:19-22.

Valente A.J., Graves D.T., Vialle-Valentin C.E., Delgado R., Schwartz C.J. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture. Biochemistry 1988;27:4162-8.

Van Otteren G.M., Strieter R.M., Kunkel S.L., Paine R., Greenberger M.J., Danforth J.M., Burdick M.D., Standiford T.J. Compartmentalized expression of RANTES in a murine model of endotoxemia. J. Immunol. 1995;154:1900-8.

Venge J., Lampinen M., Hakansson L., Rak S., Venge P. Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. J. Allergy Clin. Immunol 1996;97:1110-5.

Verani A., Scalatti G., Comar M., Tresoldi E., Polo S., Giacca M., Lusso P., Siccardi A.G., Vercelli D. CC chemokine released by lipopolysaccharide(LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. J. Exp. Med. 1997;185:805-16.

Vielhauer V., Berning E., Eis V., Kretzler M., Segerer S., Strutz F., Horuk R., Grone H.J., Schlondorff D., Anders H.J. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. Kidney Int. 2004;66:2264-78.

Walley K.R., Lukacs N.W., Standiford T.J., Strieter R.M., Kunkel S.L. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. Infect. Immun. 1997;65:3847-51.

Walmrath D., Ghofrani H.A., Rosseau S., Schütte H., Cramer A., Kaddus W., Grimminger F., Bhakdi S., Seeger W. Endotoxin „priming" potentiates lung vascular abnormalities in response to Escherichia coli hemolysin: an example of synergism between endo- and exotoxin. J. Exp. Med. 1994;180:1437-43.

Walmrath D., Grimminger F., Seeger W. Schwere Sepsis – neue Therapieverfahren. Internist 2001;42:1619-39.

Warrior U., McKeegan E.M., Rottinghaus S.M., Garcia L., Grayson G., Komater V., McNally T., Helfrich R., Harris R.R. Identification and characterization of novel antagonist CCR3 receptor. J. Biomol. Screen. 2003;8:324-31.

Wells T.N., Power C.A., Narasimhan M.L., Hoogewerf A.J., Cook R.M., Chun W.C., Peitsch M.C., Proudfoot A.E. Selectivity and antagonism of chemokine receptors. J. Leukoc. Biol. 1996;59:53-60.

Wolpe S.D., Davatelis G., Sherry B., Beutler B., Hesse D.G., Nguyen H.T., Moldawer L.L., Nathan C.F., Lowry S.F., Creami A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. J. Exp. Med. 1988;167:570-81.

Wright S. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. J. Exp. Med. 1999;189:605-9.

Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science 1990;249:1431-3.

Wright T.W., Johnston C.J., Harmsen A.G., Finkelstein J.N. Chemokine gene expression during peneumocystis carinii-driven pulmonary inflammation. Infect. Immunol. 1999;67:3452-60.

Wu L., Paxton W.A., Kassam N., Ruffing N., Rottman J.B., Sullivan N., Choe H., Sodroski J., Newman W., Koup R.A., Mackay C.R. CCR-5 Levels and Expression Pattern with Infectability by Macrophage-tropic HIV-1, In Vitro. J. Exp. Med. 1997;185:1681-91.

Yamada H., Hirai, K., Miyamasu M., Iikura M., Misaki Y., Shoji, S. Takaichi T., Kasahara T. Morita. Eotaxin is a potent chemotaxin for human basophils. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997;231:365-8.

Yawalkar N., Hguccioni M., Scharer J., Braunwalder J., Karlen S., Dewald B., Braathen L.R, Baggiolini M. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol. 1999;113:43-8.

Ying S., Robinson D.S., Meng Q., Rottman J., Kennedy R., Ringler D.J., Mackay C.R., Daugherty B.L., Springer M.S., Durham S.R., Williams T.J., Kay A.B. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. Eur. J. Immunol. 1997;27:3507-16.

Ylä H., Lipton S., Rosenfeld B.A., Sakija M.E., Yoshimura T., Leonard T., Witztum E.J., Steinberg J.L. Expression of monocyte chemottractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosklerotic lesions. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991;88:5252-6.

Yoshimura T.N., Takeya M., Takahashi K. Molecular cloning of rat monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) and its expression in rat spleen and tumor cell lines. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991;174:504-9.

Yoshimura T.N., Yuhki S., Moore K., Appela E., Lermann M.I., Leonard E.J. Human monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1). Full length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. FEBS Lett. 1989;244:487-93.

Zhang K., Gharaee K.M., Jones M.L., Warren J.S., Phan S.H. Lung Monocytes Chemoattractant Protein-1 Gene Expression in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. J. Immunol. 1994;153:4733-41.

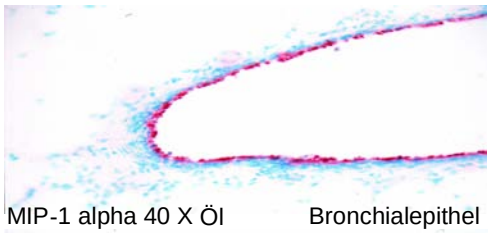
Ziegenhagen M.W., Schrum S., Zissel G., Zipfel P.F., Schlaak M., Muller-Quernheim J. Increased expression of proinflammatory chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with progressing idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. J. Invest. Med. 1998;46:223-31.

Zimmermann N., Hershey G.K., Forster P.S., Rothenberg M.E. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. J. Allergy Clin. Immunol. 2003;111:227-42.

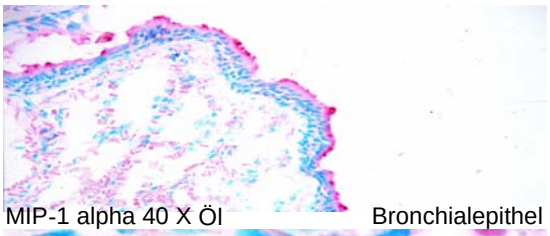
Zisman D.A., Kunkel S.L., Strieter, R.M., Tsai W.C., Bucknell K., Wilkowski J., Standiford T.J. MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. J. Clin. Invest. 1997;99:2832-6.

8. Bildtafeln

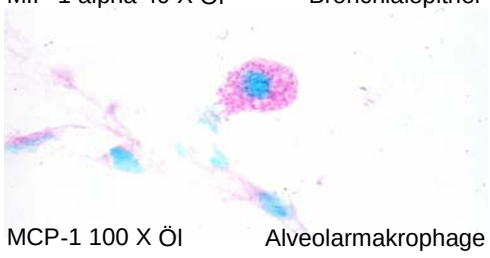
I. Chemokine / Rezeptoren in der Lunge
Vergleich
Ratte und Mensch



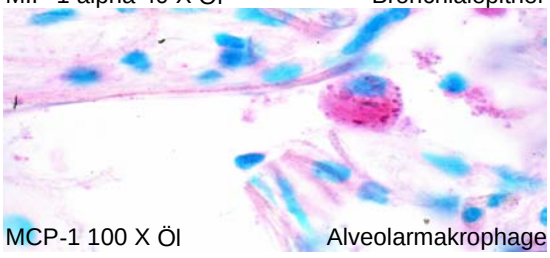
MIP-1 alpha 40 X Öl Bronchialepithel



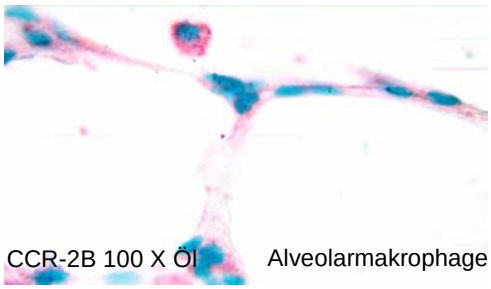
MIP-1 alpha 40 X Öl Bronchialepithel



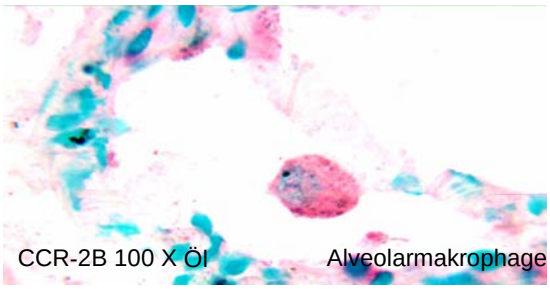
MCP-1 100 X Öl Alveolarmakrophage



MCP-1 100 X Öl Alveolarmakrophage



CCR-2B 100 X Öl Alveolarmakrophage

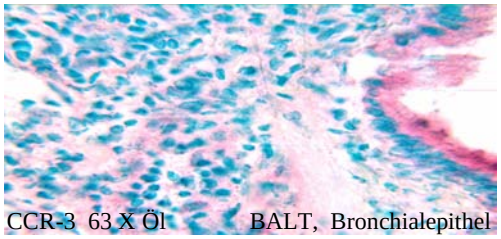


CCR-2B 100 X Öl Alveolarmakrophage

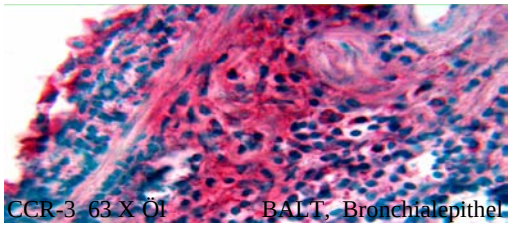
8. Bildtafel

II. Chemokine / Rezeptoren in der Rattenlunge

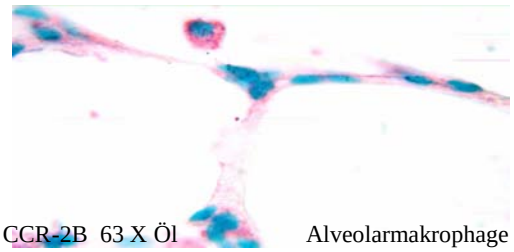
Vergleich Kontrollen und LPS -Lungen



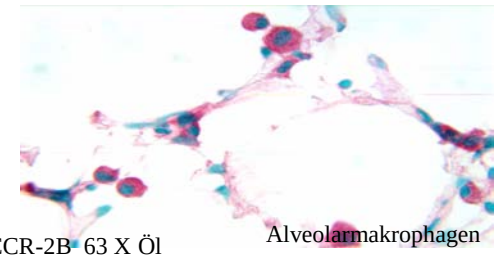
CCR-3 63 X Öl BALT, Bronchialepithel



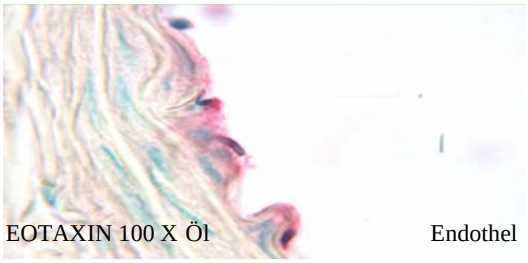
CCR-3 63 X Öl BALT, Bronchialepithel



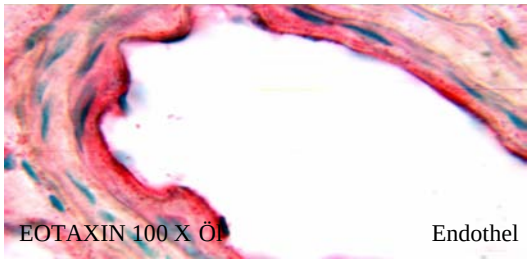
CCR-2B 63 X Öl Alveolarmakrophage



CCR-2B 63 X Öl Alveolarmakrophagen



EOTAXIN 100 X Öl Endothel

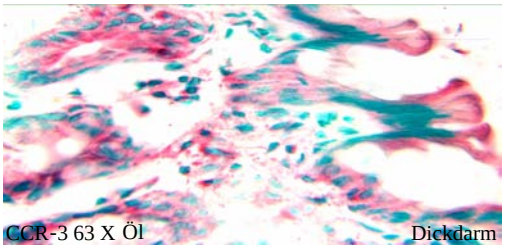


EOTAXIN 100 X Öl Endothel

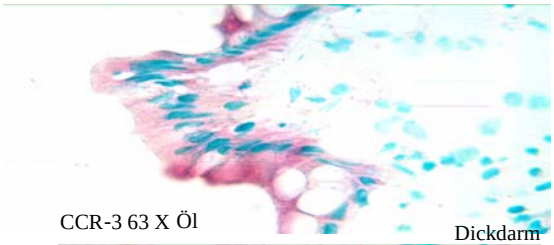
8. Bildtafel

III. Chemokine / Rezeptoren in anderen Organen

Vergleich Ratte und Mensch

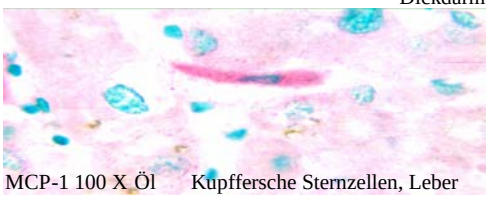


CCR-3 63 X Öl Dickdarm

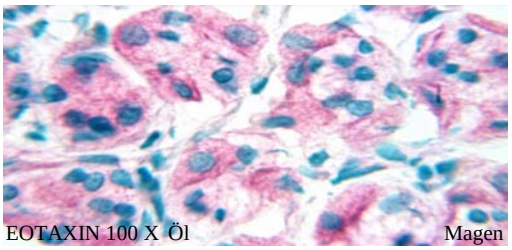


CCR-3 63 X Öl Dickdarm

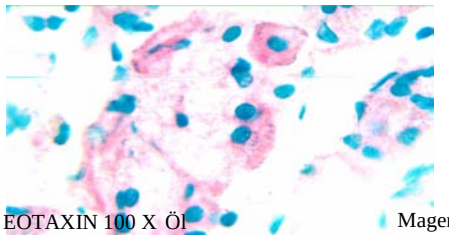
MCP-1 100 X Öl Kupffersche Sternzellen, Leber



MCP-1 100 X Öl Kupffersche Sternzellen, Leber



EOTAXIN 100 X Öl Magen



EOTAXIN 100 X Öl Magen

9. Anhang

Tabelle 1

Ratten-lunge	MIP-1 alpha	MIP-1 beta	RANTES	MCP-1	EOTAXIN
proximales Bronchial-epithel	sehr stark	stark	stark	mäßig	stark
distales Bronchial-epithel	sehr stark	stark	stark	stark	mäßig
Tracheal-epithel	stark	stark	stark	mäßig	sehr stark
peribron-chiale Chondro-zyten	schwach	stark	stark	stark	sehr stark
peribron-chiale Drüsen	schwach	stark	stark	mäßig	sehr stark
perivas-kuläre Lympho-zyten	keine Färbung	mäßig	stark	sehr stark	stark
Alveolar-makro-phagen	mäßig	sehr stark	stark	sehr stark	stark
pribron-chiale periphere Nerven	mäßig	stark	stark	mäßig	stark
teilmusku-larisierte Gefäße	schwach	mäßig	schwach	schwach	schwach
Endothel	keine Färbung	stark	mäßig	mäßig	stark

Tabelle 2

Ratten-lunge	CCR-1	CCR-2	CCR-3	CCR-4	CCR-5
proximales Bronchial-epithel	mäßig	stark	sehr stark	mäßig	keine Färbung
distales Bronchial-epithel	mäßig	mäßig	sehr stark	schwach	keine Färbung
Tracheal-epithel	stark	sehr stark	sehr stark	mäßig	schwach
peribron-chiale Chondro-zyten	stark	sehr stark	mäßig	schwach	schwach
peribron-chiale Drüsen	sehr stark	sehr stark	mäßig	schwach	schwach
perivas-kuläre Lympho-zyten	sehr stark	stark	stark	schwach	schwach
Alveolar-makro-phagen	stark	mäßig	sehr stark	schwach	keine Färbung
peribron-chiale periphere Nerven	mäßig	schwach	mäßig	schwach	keine Färbung
einzelne Zellen im Septum	mäßig	schwach	mäßig	keine Färbung	keine Färbung
Endothel	mäßig	stark	schwach	schwach	keine Färbung
BALT	sehr stark	keine Färbung	schwach	keine Färbung	keine Färbung

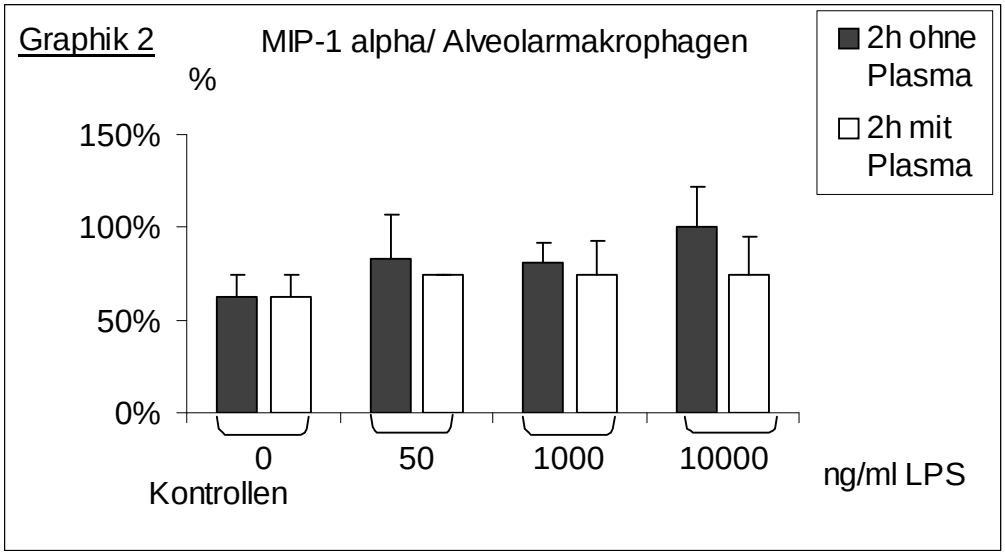
Tabelle 3

Humane Lunge	MIP-1 alpha	MIP-1 beta	RANTES	MCP-1	EOTAXIN
proximales Bronchial-epithel	stark	mäßig	mäßig	mäßig	sehr stark
distales Bronchial-epithel	stark	mäßig	mäßig	mäßig	stark
Tracheal-epithel	stark	mäßig	stark	mäßig	mäßig
peribron-chiale Chondro-zyten	schwach	stark	stark	sehr stark	sehr stark
peribron-chiale Drüsen	mäßig	mäßig	stark	stark	stark
perivas-kuläre Lympho-zyten	schwach	mäßig	stark	stark	stark
Alveolar-makro-phagen	mäßig	mäßig	stark	stark	stark
peribron-chiale periphere Nerven	schwach	mäßig	mäßig	mäßig	stark
teilmusku-larisierte Gefäße	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Endothel	schwach	stark	mäßig	mäßig	stark

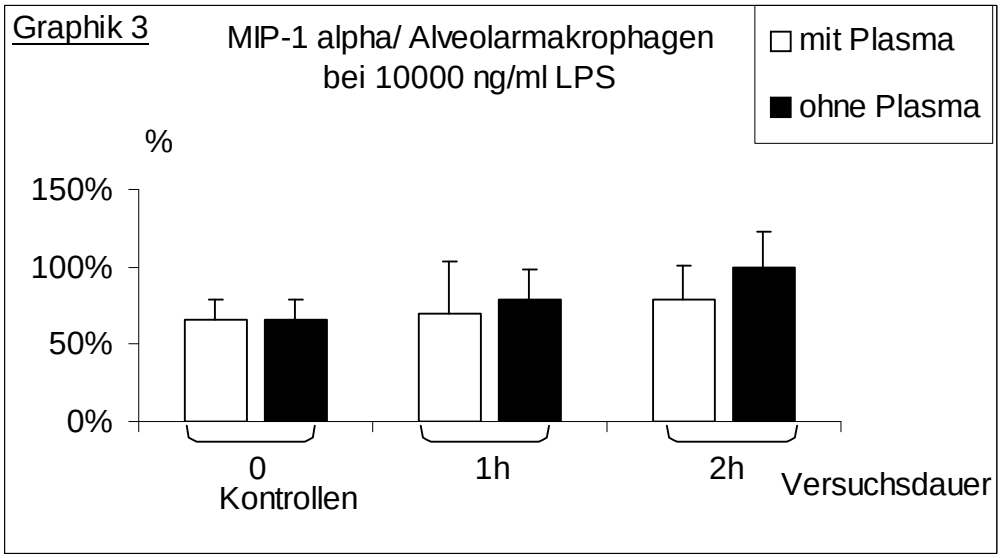
Tabelle 4

Humane Lunge	CCR-1	CCR-2	CCR-3	CCR-4	CCR-5
proximales Bronchial-epithel	mäßig	sehr stark	stark	mäßig	stark
distales Bronchial-epithel	mäßig	mäßig	mäßig	schwach	keine Färbung
Tracheal-epithel	mäßig	stark	mäßig	mäßig	schwach
peribron-chiale Chondro-zyten	stark	stark	stark	keine Färbung	sehr stark
peribron-chiale Drüsen	stark	stark	stark	stark	mäßig
perivas-kuläre Lympho-zyten	mäßig	sehr stark	stark	mäßig	keine Färbung
Alveolar-makro-phagen	stark	sehr stark	mäßig	keine Färbung	stark
peribron-chiale periphere Nerven	keine Färbung	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
einzelne Zellen im Septum	keine Färbung	mäßig	schwach	keine Färbung	keine Färbung
Endothel	schwach	mäßig	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
BALT	keine Färbung	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung

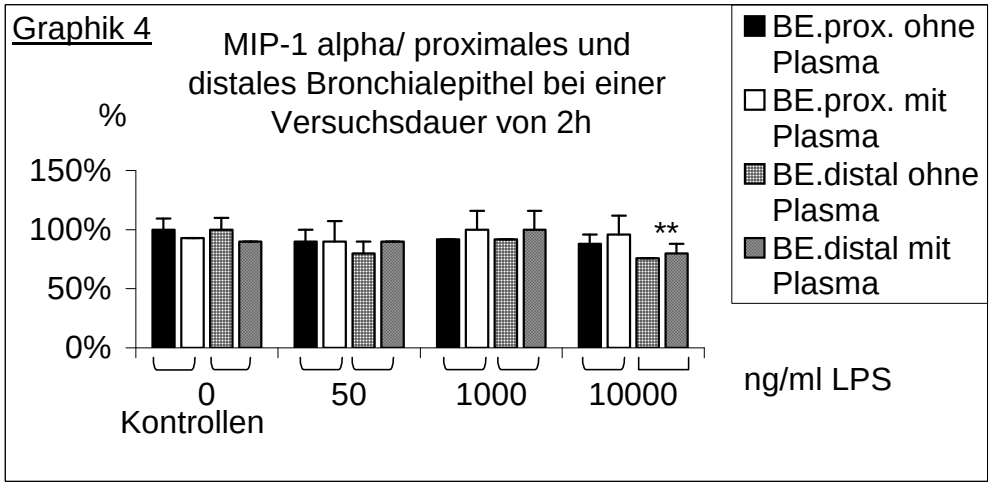
Graphik 2



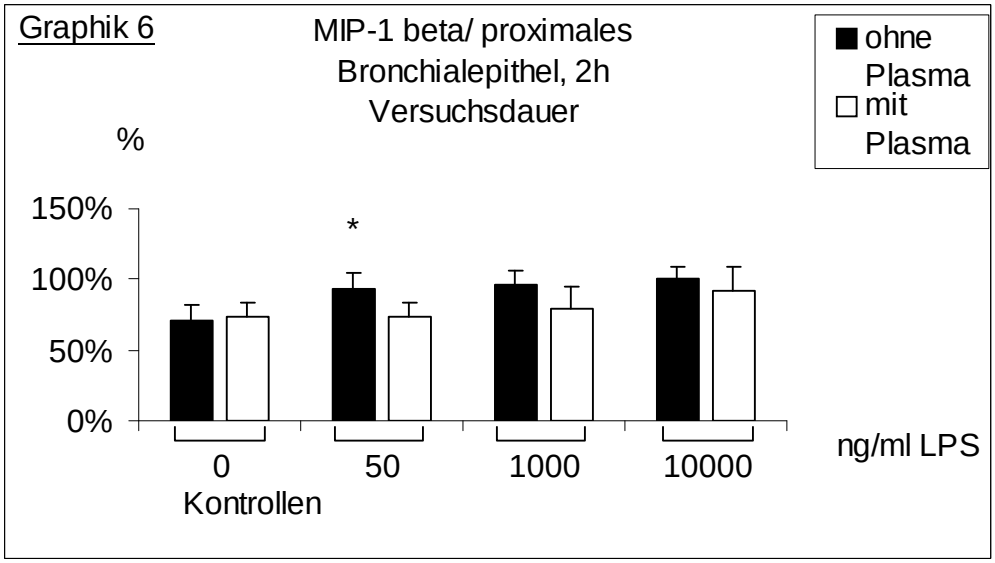
Graphik 3



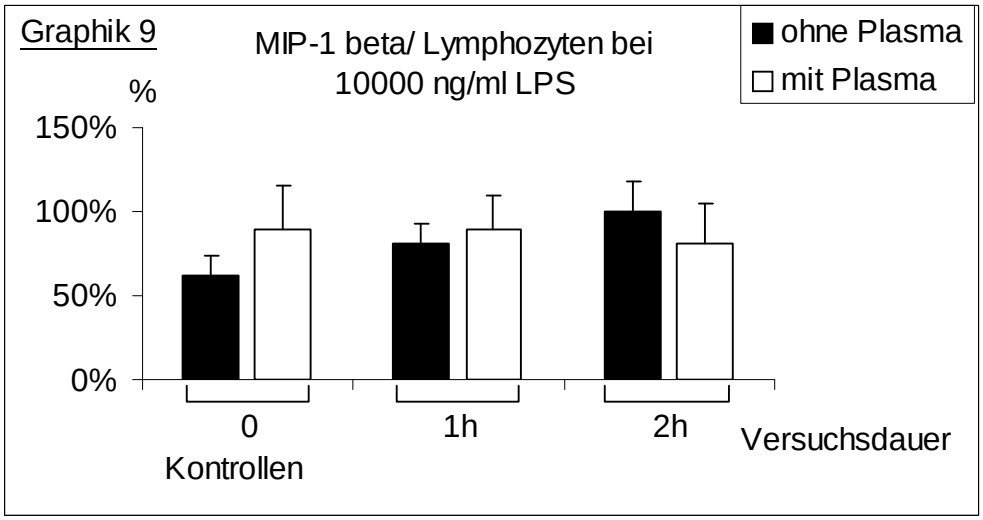
Graphik 4



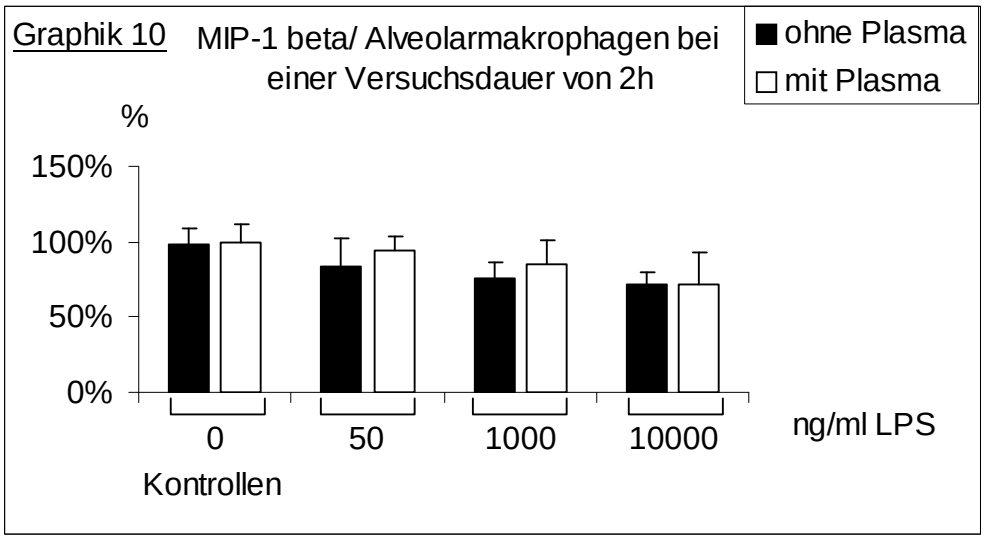
Graphik 6



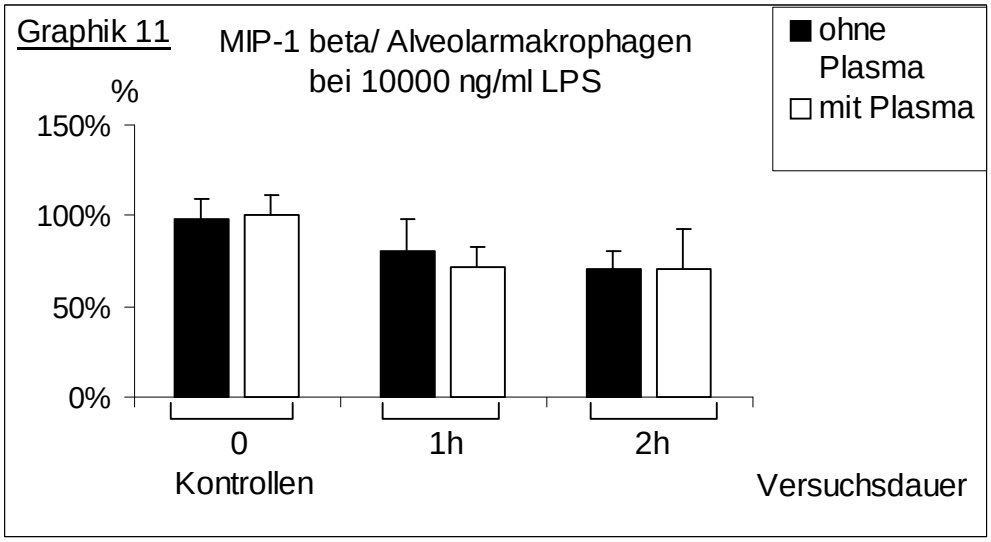
Graphik 9



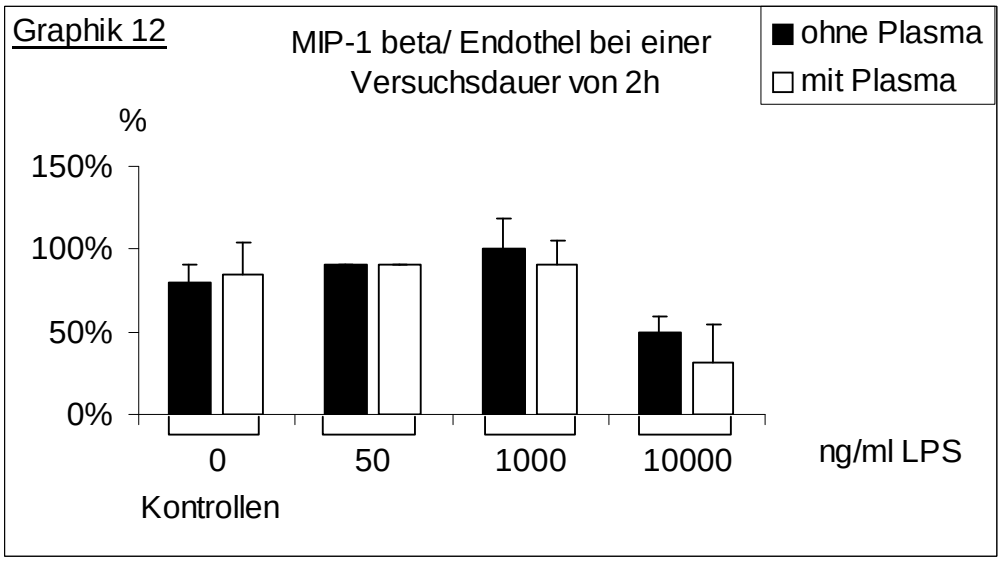
Graphik 10



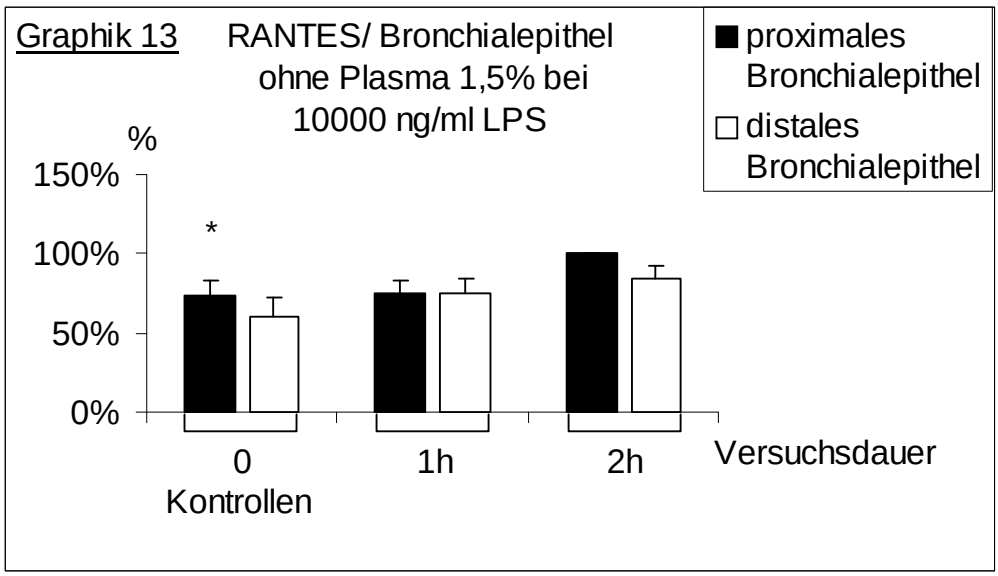
Graphik 11



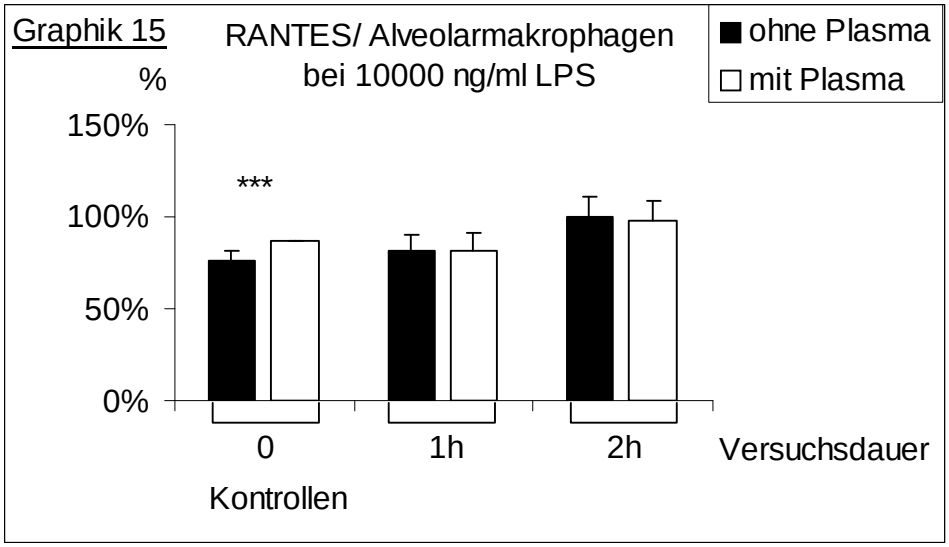
Graphik 12



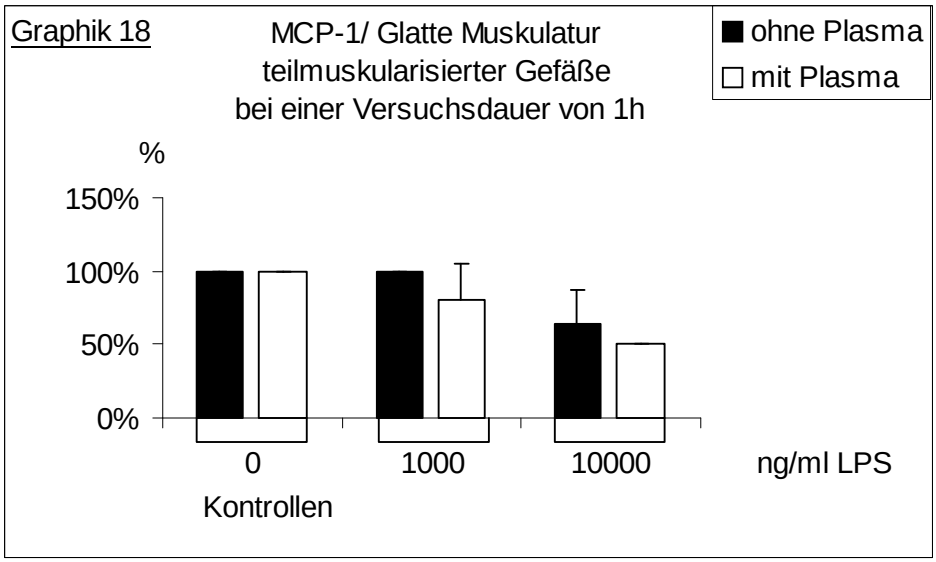
Graphik 13



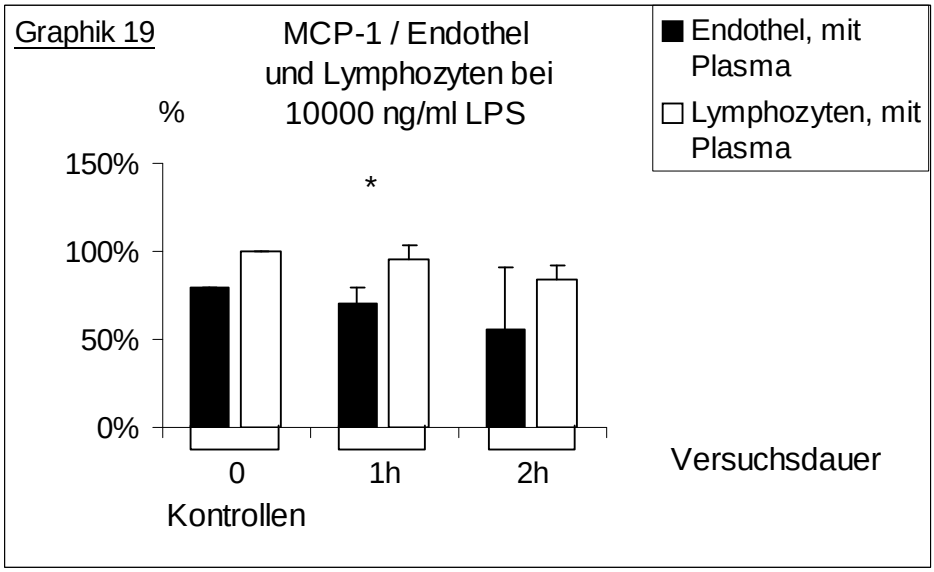
Graphik 15



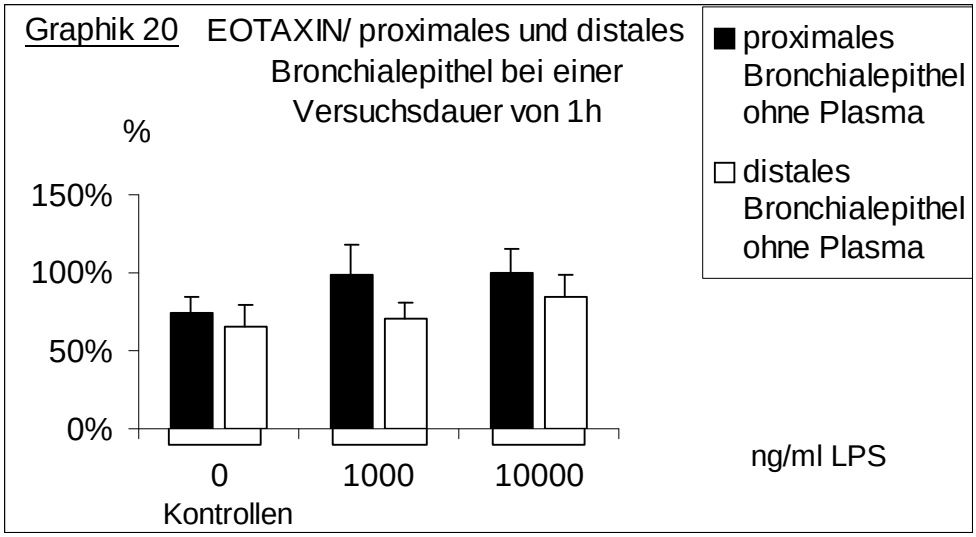
Graphik 18



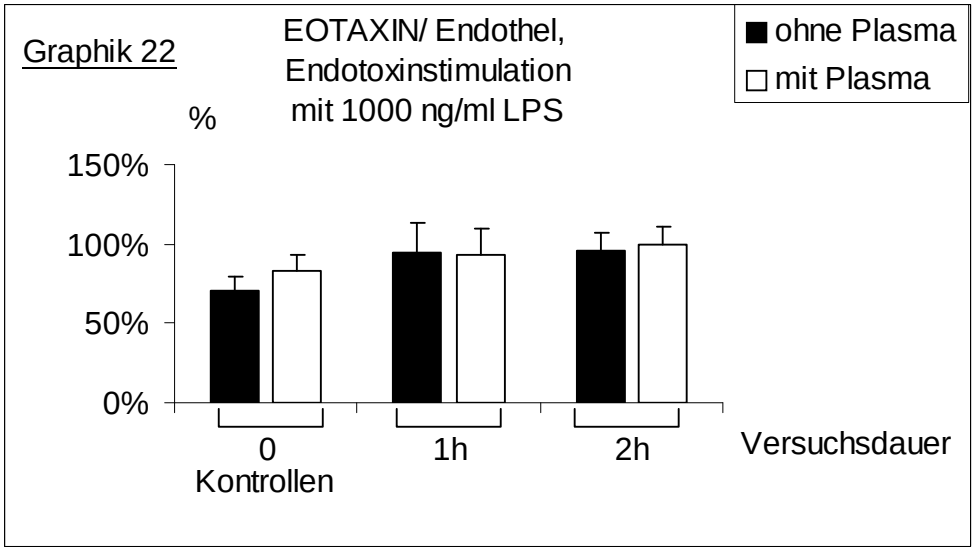
Graphik 19



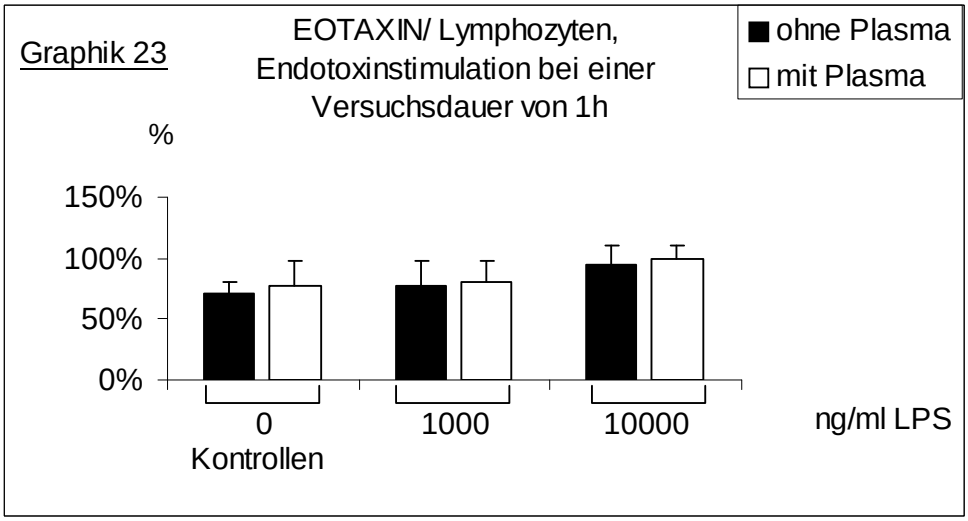
Graphik 20 EOTAXIN/ proximales und distales Bronchialepithel bei einer Versuchsdauer von 1h



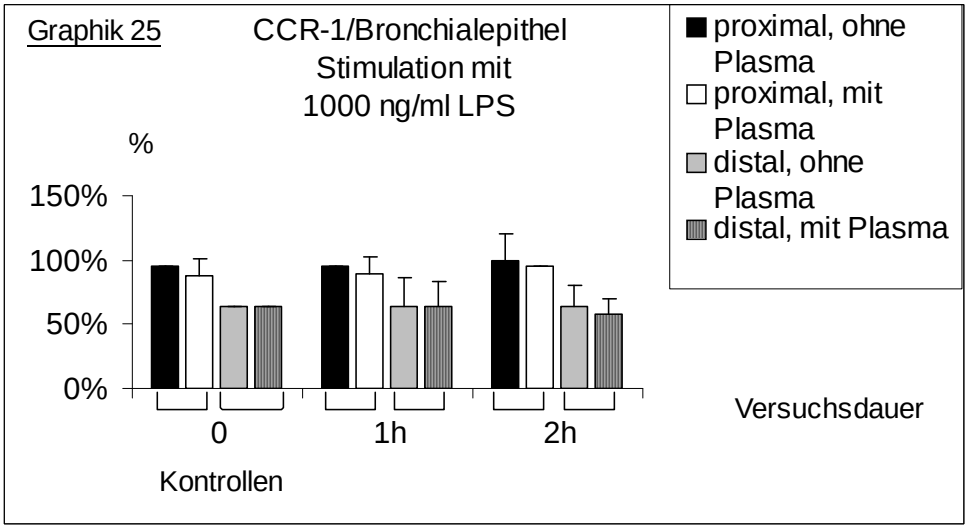
Graphik 22 EOTAXIN/ Endothel, Endotoxinstimulation mit 1000 ng/ml LPS



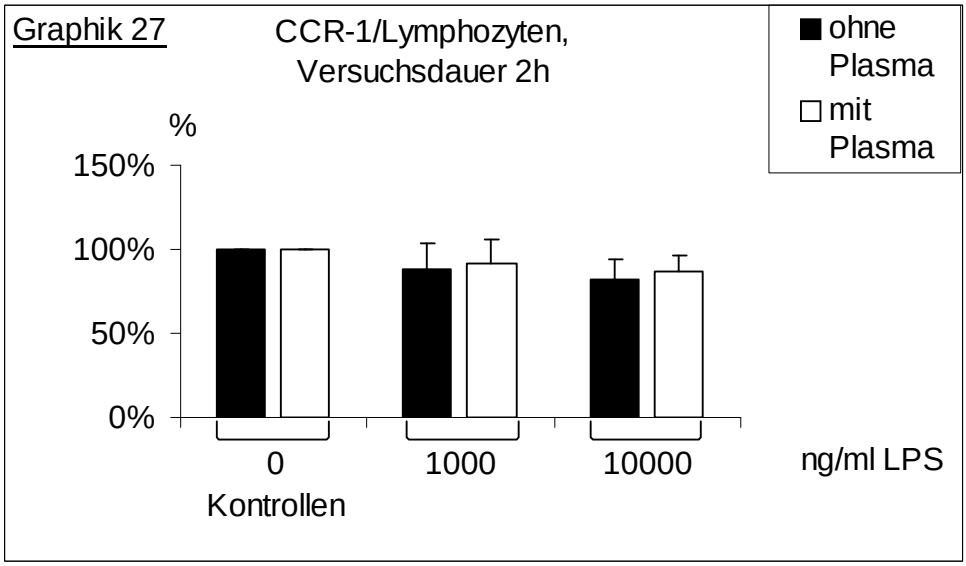
Graphik 23 EOTAXIN/ Lymphozyten, Endotoxinstimulation bei einer Versuchsdauer von 1h



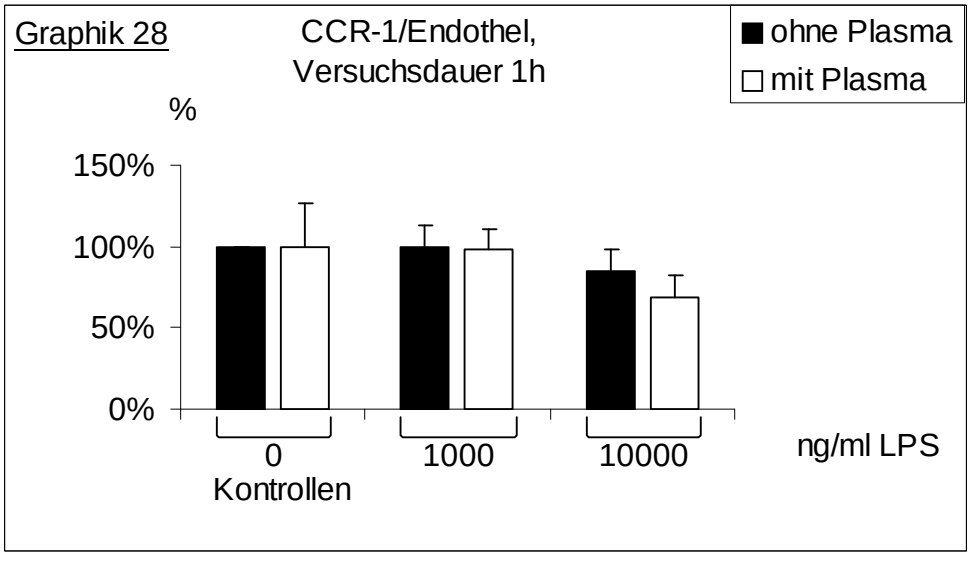
Graphik 25



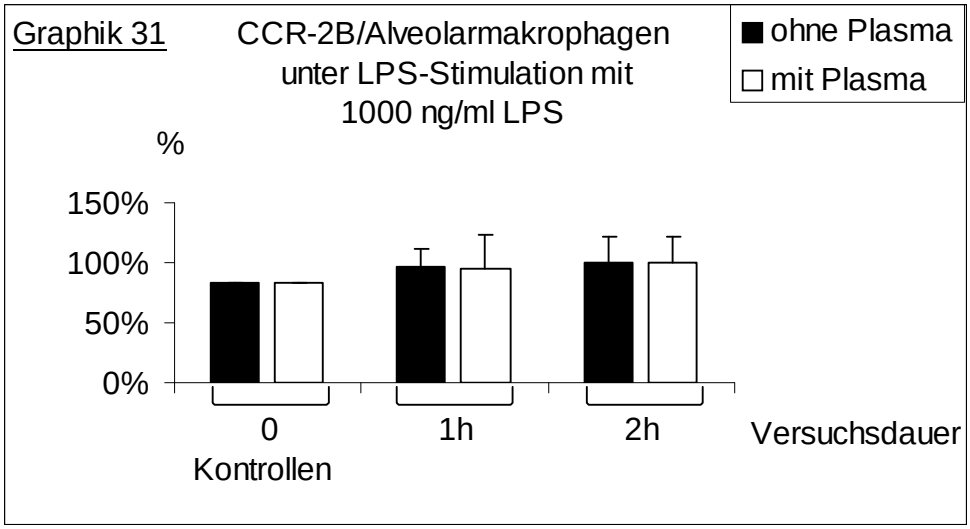
Graphik 27



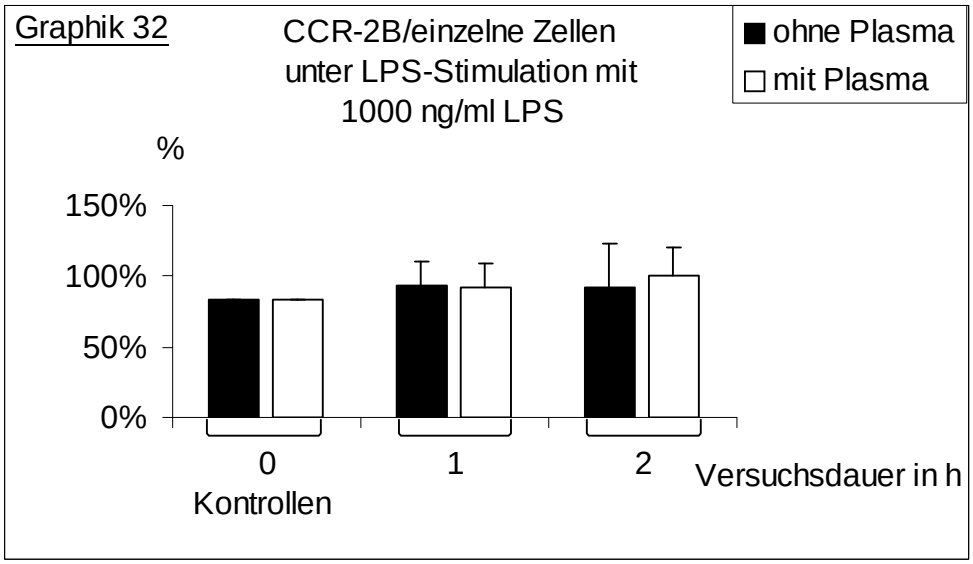
Graphik 28



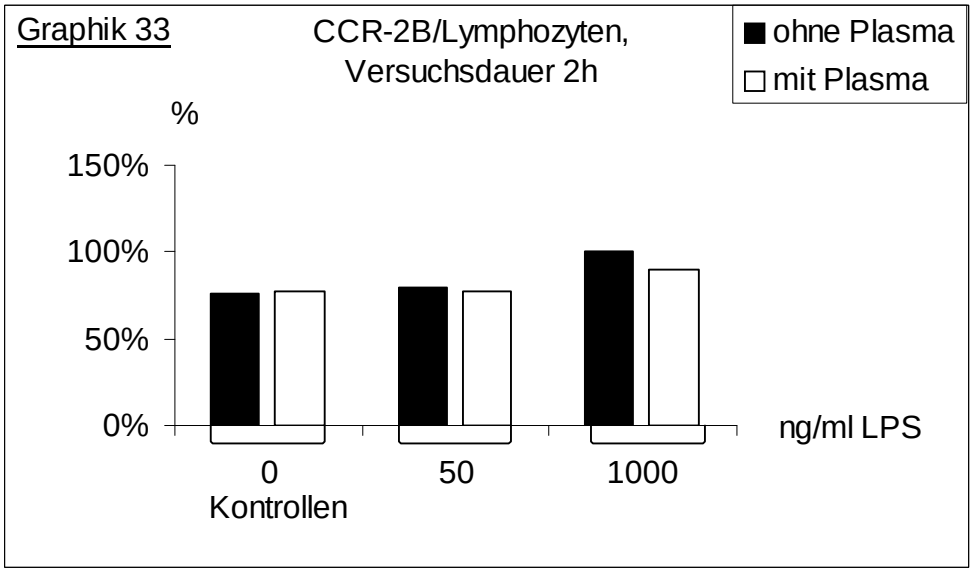
Graphik 31



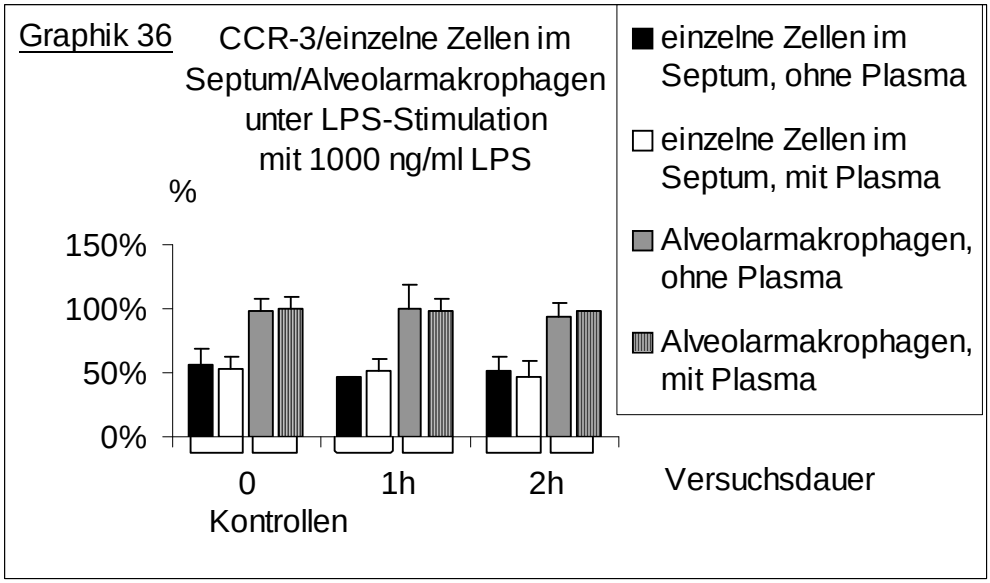
Graphik 32



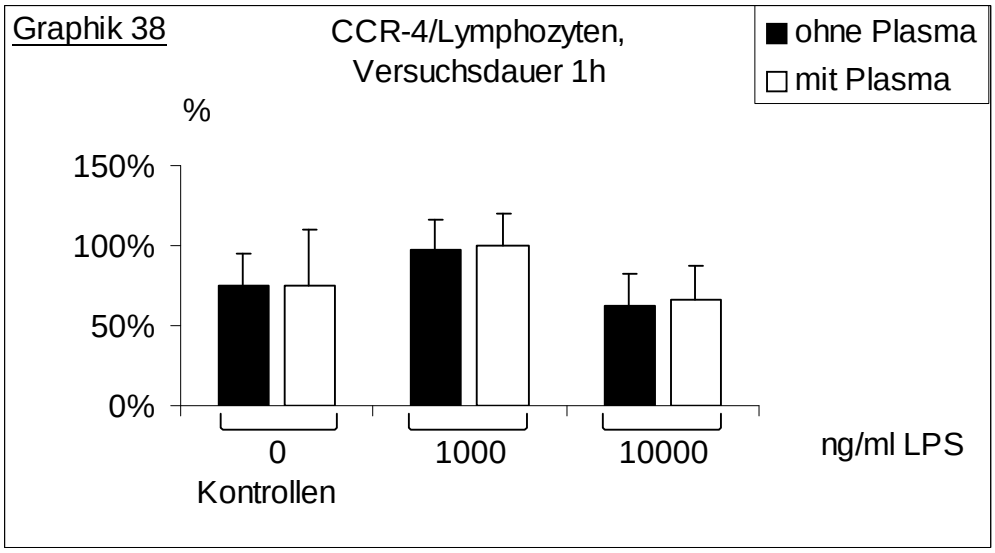
Graphik 33



Graphik 36



Graphik 38



Graphik 39

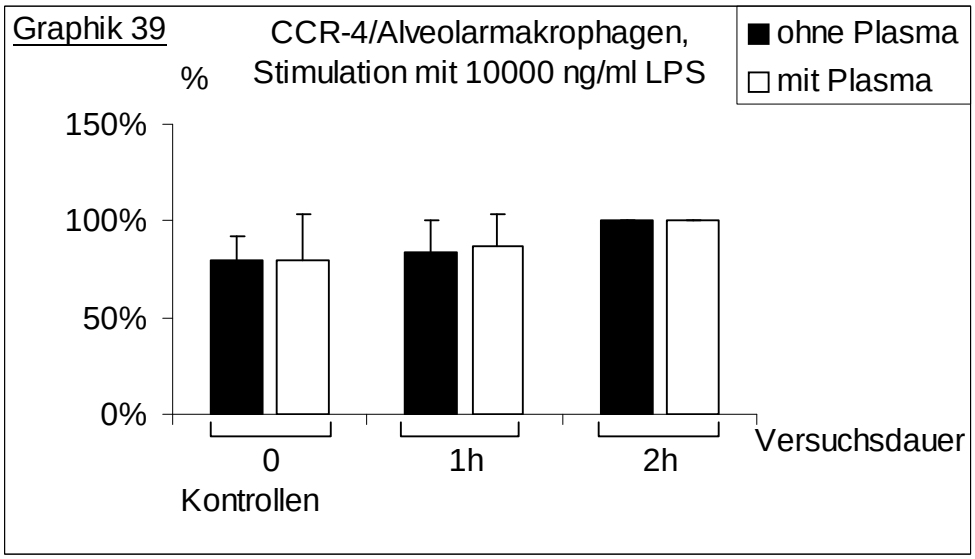


Tabelle 5

Rattenorgane	MIP-1 alpha	MIP-1 beta	RANTES	MCP-1	EOTAXIN
I. Leber					
Hepatozyten	schwach	mäßig	mäßig	mäßig	stark
Kupffersche Sternzellen	stark	stark	sehr stark	sehr stark	keine Färbung
Gallengang	keine Färbung	schwach	mäßig	keine Färbung	keine Färbung
II. Pankreas					
seröse Drüsen	mäßig	mäßig	stark	mäßig	schwach
Drüsengang	schwach	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung
Langerhansche Inselzellen	schwach	sehr stark	schwach	mäßig	schwach
III. Schilddrüse					
Follikelepithel	schwach	mäßig	schwach	schwach	sehr stark
IV. Speicheldrüse					
seröse Drüsen	schwach	mäßig	mäßig	mäßig	schwach
mucöse Drüsen	keine Färbung	schwach	mäßig	schwach	schwach
Drüsengang	keine Färbung	schwach	stark	schwach	mäßig
V. Herz					
Kardiomyozyten	keine Färbung	schwach	mäßig	keine Färbung	keine Färbung
Endothel	keine Färbung	schwach	keine Färbung	keine Färbung	sehr stark
VI. Niere					
Glomerulus	keine Färbung	schwach	keine Färbung	schwach	schwach
Cortex	mäßig	keine Färbung	mäßig	schwach	keine Färbung
Medulla	keine Färbung	schwach	schwach	keine Färbung	schwach
Urothel	keine Färbung	schwach	mäßig	mäßig	schwach
Macula Densa	mäßig	keine Färbung	mäßig	schwach	keine Färbung

Tabelle 6

Rattenorgane	MIP-1 alpha	MIP-1 beta	RANTES	MCP-1	EOTAXIN
VII. Milz					
Retikulumzellen	mäßig	stark	stark	schwach	mäßig
weiße Pulpa	mäßig	stark	stark	schwach	stark
rote Pulpa	schwach	mäßig	mäßig	mäßig	schwach
IIX. Thymus					
Retikulumzellen	schwach	stark	mäßig	keine Färbung	stark
Cortex	keine Färbung	schwach	mäßig	keine Färbung	schwach
IX. Speiseröhre					
Oberflächenzellen	schwach	schwach	mäßig	keine Färbung	schwach
X. Magen					
Oberflächenzellen	mäßig	stark	stark	schwach	stark
Belegzellen	schwach	mäßig	stark	mäßig	stark
Hauptzellen	schwach	mäßig	mäßig	schwach	stark
XI. Duodenum					
Oberflächenzellen	mäßig	schwach	mäßig	mäßig	schwach
XII. Ileum					
Oberflächenzellen	stark	keine Färbung	stark	stark	mäßig
XIII. Dickdarm					
Oberflächenzellen	mäßig	stark	stark	stark	stark
Intestinaldrüsen	keine Färbung	mäßig	mäßig	mäßig	schwach
XIV. Haut					
Talgdrüsen	mäßig	stark	stark	mäßig	sehr stark
Haarfollikel	keine Färbung	keine Färbung	mäßig	keine Färbung	mäßig
Nerven	keine Färbung	mäßig	stark	mäßig	mäßig

Tabelle 7

Humane Organe	MIP-1 alpha	MIP-1 beta	RANTES	MCP-1	EOTAXIN
I. Leber					
Hepatozyten	keine Färbung	schwach	schwach	schwach	schwach
Kupffersche Sternzellen	keine Färbung	schwach	schwach	stark	schwach
Gallengang	keine Färbung	schwach	mäßig	mäßig	mäßig
II. Pankreas					
seröse Drüsen	keine Färbung	schwach	schwach	schwach	schwach
Drüsengang	schwach	mäßig	stark	stark	mäßig
Langerhansche Inselzellen	keine Färbung	schwach	schwach	schwach	keine Färbung
III. Schilddrüse					
Follikelepithel	keine Färbung	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
IV. Speicheldrüse					
seröse Drüsen					
mucöse Drüsen	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
Drüsengang					
V. Herz					
Kardiomyozyten	keine Färbung	keine Färbung	schwach	schwach	schwach
Endothel	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	schwach
VI. Niere					
Glomerulus	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Cortex	schwach	schwach	schwach	mäßig	mäßig
Medulla	keine Färbung	keine Färbung	schwach	keine Färbung	keine Färbung
Urothel	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Macula Densa	keine Färbung	keine Färbung	schwach	keine Färbung	keine Färbung

Tabelle 8

Humane Organe	MIP-1 alpha	MIP-1 beta	RANTES	MCP-1	EOTAXIN
VII. Milz					
Retikulumzellen	schwach	keine Färbung	keine Färbung	mäßig	mäßig
weiße Pulpa	schwach	keine Färbung	keine Färbung	mäßig	schwach
rote Pulpa	schwach	schwach	schwach	stark	schwach
IIX. Thymus					
Retikulumzellen	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
Cortex					
IX. Speiseröhre					
Oberflächenzellen	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
X. Magen					
Oberflächenzellen	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Belegzellen	schwach	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig
Hauptzellen	keine Färbung	schwach	schwach	mäßig	schwach
XI. Duodenum					
Oberflächenzellen	keine Färbung	schwach	schwach	schwach	mäßig
XII. Ileum					
Oberflächenzellen	schwach	keine Färbung	schwach	schwach	schwach
XIII. Dickdarm					
Oberflächenzellen	mäßig	stark	mäßig	mäßig	mäßig
Intestinaldrüsen	schwach	mäßig	schwach	mäßig	schwach
XIV. Haut					
Talgdrüsen	schwach	stark	mäßig	schwach	mäßig
Haarfollikel	keine Färbung	schwach	mäßig	mäßig	schwach
Nerven	keine Färbung	schwach	keine Färbung	mäßig	schwach

Tabelle 9

Rattenorgane	CCR-1	CCR-2	CCR-3	CCR-4	CCR-5
I. Leber					
Hepatozyten	mäßig	schwach	mäßig	mäßig	schwach
Kupffersche Sternzellen	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	mäßig	keine Färbung
Gallengang	keine Färbung	keine Färbung	mäßig	mäßig	keine Färbung
II. Pankreas					
seröse Drüsen	schwach	mäßig	keine Färbung	mäßig	schwach
Drüsengang	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	schwach	keine Färbung
Langerhansche Inselzellen	keine Färbung	schwach	keine Färbung	schwach	keine Färbung
III. Schilddrüse					
Follikelepithel	schwach	stark	mäßig	schwach	keine Färbung
IV. Speicheldrüse					
seröse Drüsen	keine Färbung	mäßig	keine Färbung	mäßig	schwach
mucöse Drüsen	keine Färbung	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Drüsengang	schwach	schwach	schwach	schwach	schwach
V. Herz					
Kardiomyozyten	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Endothel	keine Färbung	schwach	schwach	schwach	keine Färbung
VI. Niere					
Glomerulus	keine Färbung	schwach	schwach	schwach	keine Färbung
Cortex	keine Färbung	keine Färbung	schwach	schwach	mäßig
Medulla	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Urothel	schwach	keine Färbung	schwach	schwach	keine Färbung
Macula Densa	keine Färbung	keine Färbung	schwach	schwach	keine Färbung

Tabelle 10

Rattenorgane	CCR-1	CCR-2	CCR-3	CCR-4	CCR-5
VII. Milz					
Retikulumzellen	mäßig	sehr stark	keine Färbung	schwach	mäßig
weiße Pulpa	schwach	keine Färbung	keine Färbung	schwach	mäßig
rote Pulpa	schwach	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung
IIX. Thymus					
Retikulumzellen	stark	stark	keine Färbung	stark	keine Färbung
Medulla	mäßig	schwach	schwach	schwach	schwach
Cortex	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
IX. Speiseröhre					
Oberflächenzellen	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
X. Magen					
Oberflächenzellen	schwach	mäßig	mäßig	schwach	keine Färbung
Belegzellen	mäßig	stark	schwach	schwach	keine Färbung
Hauptzellen	schwach	stark	schwach	schwach	keine Färbung
XI. Duodenum					
Oberflächenzellen	keine Färbung	schwach	schwach	schwach	schwach
XII. Ileum					
Oberflächenzellen	schwach	schwach	schwach	schwach	keine Färbung
XIII. Dickdarm					
Oberflächenzellen	mäßig	mäßig	stark	mäßig	mäßig
Intestinaldrüsen	stark	mäßig	mäßig	mäßig	schwach
XIV. Haut					
Talgdrüsen	schwach	stark	mäßig	stark	schwach
Haarfollikel	keine Färbung	schwach	schwach	schwach	keine Färbung
Nerven	mäßig	mäßig	keine Färbung	mäßig	keine Färbung

Tabelle 11

Humane Organe	CCR-1	CCR-2	CCR-3	CCR-4	CCR-5
I. Leber					
Hepatozyten	schwach	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung
Kupffersche Sternzellen	stark	mäßig	mäßig	keine Färbung	schwach
Gallengang	mäßig	schwach	mäßig	keine Färbung	schwach
II. Pankreas					
seröse Drüsen	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung	schwach
Drüsengang	mäßig	mäßig	schwach	keine Färbung	mäßig
Langerhansche Inselzellen	schwach	keine Färbung	schwach	keine Färbung	schwach
III. Schilddrüse					
Follikelepithel	schwach	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung
IV. Speicheldrüse					
seröse Drüsen	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
mucöse Drüsen					
Drüsengang					
V. Herz					
Kardiomyozyten	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Endothel	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
VI. Niere					
Glomerulus	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Cortex	mäßig	mäßig	mäßig	schwach	schwach
Medulla	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Urothel	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Macula Densa	schwach	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung

Tabelle 12

Humane Organe	CCR-1	CCR-2	CCR-3	CCR-4	CCR-5
VII. Milz					
Retikulumzellen	mäßig	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	schwach
weiße Pulpa	mäßig	mäßig	mäßig	keine Färbung	mäßig
rote Pulpa	mäßig	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung
IIX. Thymus					
Retikulumzellen	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
Cortex					
IX. Speiseröhre					
Oberflächenzellen	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
X. Magen					
Oberflächenzellen	keine Färbung	mäßig	keine Färbung	mäßig	keine Färbung
Belegzellen	mäßig	stark	mäßig	schwach	mäßig
Hauptzellen	schwach	mäßig	schwach	schwach	schwach
XI. Duodenum					
Oberflächenzellen	schwach	schwach	mäßig	schwach	schwach
XII. Ileum					
Oberflächenzellen	schwach	schwach	keine Färbung	schwach	schwach
XIII. Dickdarm					
Oberflächenzellen	sehr stark	stark	mäßig	stark	stark
Intestinaldrüsen	stark	stark	mäßig	mäßig	stark
XIV. Haut					
Talgdrüsen	schwach	schwach	schwach	keine Färbung	keine Färbung
Haarfollikel	schwach	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung	keine Färbung
Nerven	mäßig	schwach	keine Färbung	keine Färbung	schwach

10. Nachwort und Danksagung

Für die gute Betreuung und Motivation während der Promotionsarbeit möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. med. L. Ermert und Frau Dr. med. M. Ermert herzlich bedanken. Außerdem danke ich ganz besonders Herrn Prof. W. Seeger für die Möglichkeit im Rahmen der SFB eine experimentelle Doktorarbeit erarbeiten zu können. Einen herzlichen Dank gilt auch meinen Ko-Doktoranden und Frau Gisela Müller (MTA) für die Mithilfe, Unterstützung und die stimulierende Atmosphäre. Eine weitere unverzichtbare Stütze war stets meine Familie und meine Ehefrau.

11. Lebenslauf

Mahyar Lavae-Mokhtari
Karmarsch Str. 48
30159 Hannover

Persönliche Angaben

geboren am: 10. Juni 1970
Geburtsort: Teheran-Iran
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1976- 1981	Grundschule Saied in Teheran
1981- 1984	Orientierungsstufe Hedayat in Teheran
1984- 1987	David-Hansemann Realschule in Aachen
1987- 1990	Einhard-Gymnasium in Aachen
1991- 1993	Studium der Zahnmedizin an der Universität Giessen
1993- 2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Giessen

Drittes Staatsexamen

2000	mit der Note gut am 23.11.2000 in Gießen bestanden

Arzt im Praktikum

2000	01.12.2000 bis 14.06.2002 an der Medizinischen Klinik II der Universität Regensburg unter Prof. Rieger, Prof. Pfeifer, Prof. Krämer (Pneumologie, Kardiologie, Nephrologie)

Assistenzarzt

2002	15.06.2002 bis 14.06.2003 an der medizinischen Klinik II der Universität Regensburg unter Prof. Rieger, Prof. Pfeifer, Prof. Krämer (Pneumologie, Kardiologie, Nephrologie)

Forschungsjahr

2003	15.08.2003 bis 14.04.2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer Institut für klinische Allergie, Asthma, COPD und Inhalationsforschung unter Prof. Krug und Prof. Hohlfeld

Assistenzarzt

2005	Ab dem 15.04.2005 an der medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Pneumologie unter Prof. Welte

Experimentelle Promotionsarbeit

Experimentelle Promotionsarbeit („Endotoxin-vermittelte Regulation der Expression von Chemokinen und ihrer Rezeptoren in isoliert perfundierten Rattenlungen im Vergleich zur Basalexpression in verschiedenen Organsystemen in Ratte und Mensch“) im Bereich des Teilprojektes B1 des Sonderforschungsbereichs 547 am Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig Universität Giessen.

Wissenschaftliche Arbeiten

Poster:

I. Immunhistochemische Lokalisation von MIP-1 alpha und MIP-1 beta in normaler Lunge der Ratte und des Menschen. L. Ermert (1), M. Ermert (3), M. Lavae-Mokhtari (3), W. Seeger (2), H.-R. Dunker (3). Institut für Pathologie, Universitätsklinik Giessen (1), Medizinische Klinik II, Universitätsklinik Giessen (2), Institut für Anatomie, Universitätsklinik Giessen (3). 40. Symposium der Gesellschaft der Histochemie, Giessen, 1998.

II. Cellular Localization and Differential Regulation of MIP-1 alpha and MIP-1 beta Expression in Response to LPS and Plasma in Isolated Perfused Rat Lungs. L. Ermert MD (1), M. Ermert MD (3), M. Lavae-Mokhtari (3), H.-R. Dunker MD (3) and W. Seeger MD (2). Dept. of Pathology (1), the Dept. of Internal Medicine (2) and Inst. of Anatomy (3). University of Giessen, Germany. International Conference of American Thoracic Society (ATS). San Diego, USA, 1999.

III. Immunohistochemical Expression of COX-Isoenzymes Downstream Enzymes (PGI2-S, TXA2-S, PGD2-S) and PGE2 in Human Lung Tumors. L. Ermert MD (1), M. Lavae-Mokhtari (2) and M. Ermert MD (2). Dept. of Pathology (1) and Inst. of Anatomy (2). University of Giessen, Germany. Meeting of the German Society of Pathology. Kiel, 2000.

IV. Expression von IL-8 in humaner Lunge. M. Lavae-Mokhtari (1), C. Schulz (1), G. Richter (2) , K. Wolf (1), M. Pfeifer (1). Pneumologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinik Regensburg (1), Institut für Pathologie, Universitätsklinik Regensburg (2). Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP). Bochum, 2002.

V. Verstärkte bronchoepitheliale Aktivierung und Expression von NF-kappaB p50 und p65 bei COPD Patienten. M. Lavae-Mokhtari (1), C. Schulz (1), M. Woenkhaus (2) , K.Wolf (1), M. Pfeifer (1). Pneumologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinik Regensburg (1), Institut für Pathologie, Universitätsklinik Regensburg (2). Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP). München, 2003.

VI. Different Immunohistochemical Detection of IL-8 in Human Lungs of Smokers and Non-Smokers. M. Lavae-Mokhtari (1), C. Schulz MD (1), M. Woenkhaus MD (2), M. Pfeifer MD (1). Pneumologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinik Regensburg, Germany (1), Institut für Pathologie, Universitätsklinik Regensburg, Germany (2). International Conference of American Thoracic Society (ATS). Atlanta, USA, 2002.

VII. Effects of The T-Calcium Channel Blocker Mibifradil in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension. A. Lorenz, M. Lavae-Mokhtari, F. Blumberg MD, C. Lorenz, A. Rottmeier, M. Pfeifer MD. Pneumologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinik Regensburg, Germany. International Conference of American Thoracic Society (ATS). Atlanta, USA, 2002.

VIII. Increased Expression of IL-8, NF-kappaB p50 and NF-kappaB p65 in Human Lungs of Smokers Compared to Lifelong Non-Smokers. M. Lavae-Mokhtari (1), C. Schulz MD(1), M. Woenkhaus MD (2), K. Wolf PhD (1), and M. Pfeifer MD (3). Pneumologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinik Regensburg, Germany (1), Institut für Pathologie, Universitätsklinik Regensburg, Germany (2) and Krankenhaus Donaustauf, Germany (3). International Conference of American Thoracic Society (ATS). Seattle, USA, 2003.

IX. Quantitative Immunohistochemical Assessment of Cigarette Smoke dependent Bronchoepithelial Cell Activation in Human Lungs. M. Lavae-Mokhtari (1), C. Schulz MD (1), M. Woenkhaus MD (2), L. Miller MD (3) and M. Pfeifer MD (4). Pneumologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinik Regensburg, Germany (1), Institut für Pathologie, Unisversitätsklinik Regensburg, Germany (2), Medizinische Klinik I, Universitätsklinik Regensburg, Germany (3) and Krankenhaus Donaustauf, Germany (4). International Conference of European Thoracic Society (ERS). Wien, Österreich, 2003.

X. Analysis of Particles in Exhaled Breath of Smokers with and without Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). J. M. Hohlfeld MD, M. Lavae-Mokhtari , N. Krug MD, H. Windt Physict, W. Koch Physict. Fraunhofer ITEM, Hannover, Germany. International Society for Aerosols in Medicine (ISAM). Perth, Australien, 2005.

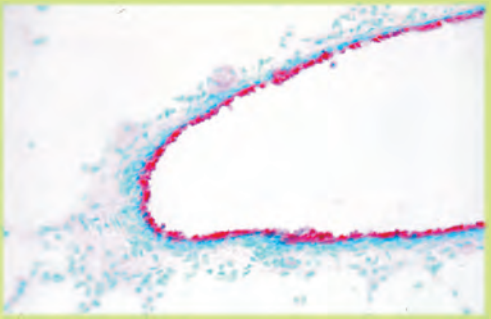
XI. Roflumilast Inhibits Recruitment of Inflammatory Cells into the Lung after Segmental LPS Challenge in Healthy Subject. J. M. Hohlfeld MD (1), K. Schoenfeld PhD (2), M. Lavae-Mokhtari (1), F. Schaumann MD (1), M. Mueller PhD (1), T. D. Bethke, MD (2), D. Bredenbroeker MD (2), N. Krug MD (1) and R. Herrmann MD (2). Fraunhofer ITEM, Hannover, Germany (1) and ALTANA Pharma AG, Konstanz, Germany (2). International Conference of American Thoracic Society (ATS). San Diego, USA, 2006.

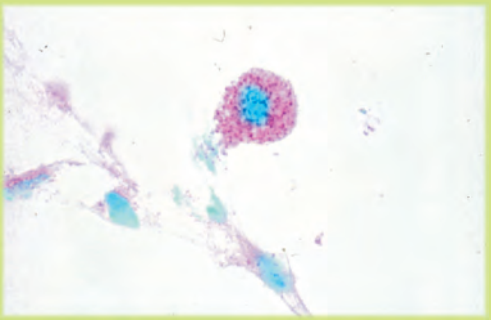
Hannover, den 31.08.2006

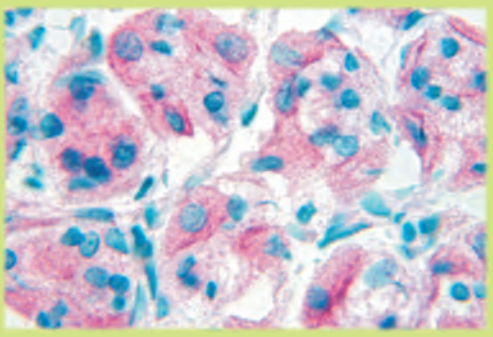
Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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.

Datum, Unterschrift







édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5037-1
9 783835 950375