

**TRANSENDO-/EPITHELIALE REKRUTIERUNG VON
MONOZYTEN IN DIE LUNGE: PHÄNOTYPISCHE UND
FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Susanne Valerie Herold

Aus Offenburg

Giessen 2002

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
des Universitätsklinikums Giessen,
Sonderforschungsbereich 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“
Leiter: Prof. Dr. med. Werner Seeger**

Gutachter: Prof. Dr. Lohmeyer

Gutachter: PD Dr. Ermert

Tag der Disputation: 18.06.2003

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| ABKÜRZUNGEN | 5 |
| 1. EINLEITUNG | 9 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 14 |
| 2.1 Tierexperimenteller Versuchsabschnitt | 14 |
| 2.1.1 Versuchstiere | 14 |
| 2.1.2 Narkose | 14 |
| 2.1.3 Farbstoffmarkierung mit PKH26: Dosis- und zeitabhängige Akkumulation in residenten Alveolarmakrophagen | 14 |
| 2.1.4 Intratracheale Instillation von murinem rekombinantem JE/MCP-1 | 15 |
| 2.1.5 Durchführung des Limulus-Amöbozytenlysat-Assays zur Bestimmung der LPS-Kontamination | 16 |
| 2.1.6 Durchführung der Blutentnahme | 16 |
| 2.1.7 Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL) | 17 |
| 2.1.8 In vitro Fluoreszenzmarkierung peripherer Blutleukozyten mit dem Farbstoff PKH26 | 17 |
| 2.2 Durchflußzytometrie | 18 |
| 2.2.1 Durchflußzytometrisches Meßprinzip | 18 |
| 2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse des Antigenprofils von peri- pheren Blutmonozyten, alveolär rekrutierten Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen | 19 |
| 2.2.2.1 Durchflußzytometrische Analyse des Antigenprofils | 19 |

| | |
|--|-----------|
| peripherer Blutmonozyten | |
| 2.2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse des Antigenprofils alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen | 19 |
| 2.2.3 Prinzip der durchflußzytometrischen Zellseparation | 20 |
| 2.2.4 Separation der mittels BAL und Blutentnahme gewonnenen Zellen | 21 |
| 2.3 Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten | 22 |
| 2.4 Histologie und Immunhistochemie von Lungenschnitten | 22 |
| 2.5 Analyse der TNF-α-Genexpression peripherer Blutmonozyten, alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen | 24 |
| 2.5.1 Isolation der Gesamt-RNA und reverse Transkription | 24 |
| 2.5.2 Nachweis und Quantifizierung der TNF- α -Genexpression in peripheren Blutmonozyten, alveolären Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen mittels real-time PCR | 25 |
| 2.5.2.1 Prinzip der real-time PCR | 25 |
| 2.5.2.2 Durchführung der real-time PCR | 27 |
| 2.6 In vitro Kultur peripherer Blutmonozyten, alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen sowie Quantifizierung der TNF-α-Zytokinsekretion | 30 |
| 2.6.1 Kultivierung der Alveolarmakrophagen und der Monozyten | 30 |
| 2.6.2 Quantifizierung der Zytokinsekretion peripherer Blutmonozyten, alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakro- phagen mittels ELISA | 30 |
| 2.7 STATISTIK | 32 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3. | ERGEBNISSE | 33 |
| 3.1 | Dosis- und Zeitabhängigkeit der Akkumulation von PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen | 33 |
| 3.2 | Auszählung und zytologische Differenzierung der bronchoalveolären Lavage von Kontrollmäusen, Mäusen mit PKH26-Injektion und Mäusen mit JE/MCP-1-Instillation | 39 |
| 3.3 | Rekrutierung von Monozyten in den Bronchoalveolarraum und ihre Diskriminierung von residenten Alveolarmakrophagen | 40 |
| 3.3.1 | Rekrutierung von Monozyten durch intratracheale Instillation von JE/MCP-1 | 40 |
| 3.3.2 | Nachweis über die Herkunft alveolär rekrutierter Monozyten | 42 |
| 3.3.3 | Effekte der intratrachealen Instillation von MIP-1 α und RANTES | 43 |
| 3.4 | Morphometrische Quantifizierung von Leukozyten in histologischen Lungenpräparaten | 44 |
| 3.5 | Immunphänotypisches Profil von peripheren Blutmonozyten, alveolär rekrutierten Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen | 46 |
| 3.6 | Durchflußzytometrische Separation peripherer Blutmonozyten, alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen zur Analyse der TNF-α-Zytokingenexpression und – Proteinsekretion | 48 |
| 3.6.1 | Quantifizierung der TNF- α -Genexpression | 50 |
| 3.6.2 | Evaluierung der funktionellen Relevanz gesteigerter CD14-Expression auf alveolären Monozyten | 52 |

| | | |
|------------|--|----|
| 4. | DISKUSSION | 53 |
| 4.1 | Alveoläre Rekrutierung von Monozyten und deren Diskriminierung von Alveolarmakrophagen | 53 |
| 4.1.1 | PKH26-Markierung residenter Alveolarmakrophagen | 53 |
| 4.1.2 | Rekrutierung von Monozyten aus der Lungenstrombahn in den Alveolarraum mittels intratrachealer Instillation von JE/MCP-1 | 56 |
| 4.2 | Verifizierung der Monozytenspezifität von JE/MCP-1 | 58 |
| 4.3 | Antigenprofil der alveolär rekrutierten Monozyten | 59 |
| 4.4 | Bedeutung der CD14-Expression auf alveolär rekrutierten Monozyten | 61 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 64 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 66 |
| 7. | ANHANG | 87 |
| | Verwendete Lösungen | 87 |
| | Materialien und Bezugsquellen | 88 |
| | Herstellernachweis verwendeter Geräte | 92 |
| | DANKSAGUNG | 93 |
| | LEBENS LAUF | 94 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|--------|-------------------------------------|
| Ak | Antikörper |
| Alv-Mo | Alveolär rekrutierter Monozyt |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| BAL | Bronchoalveoläre Lavage |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bp | Basenpaare |
| C5a | Komplementfaktor 5a |
| CCR2 | C-C-Chemokinrezeptor 2 |
| CD | Cluster of differentiation |
| d | Tage |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| DDT | Dithiotreitol |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| FAM | 6-Carboxyfluorescein |
| FCS | Fötale Kälberserum |

| | |
|--------|--|
| FET | Förster-Energietransfer |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FL | Fluoreszenz |
| FSC | Vorwärtsstreulicht |
| FW | Forward primer |
| g | Fallbeschleunigung |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase |
| GM-CSF | Granulocyte macrophage colony stimulating factor |
| GPI | Glycosyl-Phosphatidylinositol |
| h | Stunden |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HSA | Humanes Serumalbumin |
| ICAM-1 | Intercellular adhesion molecule-1 |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| kDa | Kilodalton |
| kHz | Kilohertz |
| LBP | Lipopolysaccharide binding protein |
| LFA-1 | Lymphocyte function antigen-1 |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| Ly | Lymphozyt |
| mCD14 | Membranständiges CD14 |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein-1 |
| min | Minuten |

| | |
|----------------|---|
| MIP-1 α | Macrophage inflammatory protein-1 α |
| MMLV | Moloney murine leukemia virus |
| mRNA | Messenger-RNA |
| nm | Nanometer |
| n. s. | Nicht signifikant |
| PB-Mo | Peripherer Blutmonozyt |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PE | Phycoerythrin |
| pg | Pikogramm |
| PMA | Phorbolmyristataacetat |
| PMN | Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt |
| Psi | Pound force per square inch |
| RANTES | Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted |
| rAM | Residenter Alveolarmakrophage |
| R _n | Normalized Reporter |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| rpm | Umdrehungen/min |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion |
| RV | Reverse primer |
| s | Sekunden |
| sCD14 | Lösliches CD14 |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SEM | Standard error of the mean |
| SSC | Seitwärtsstreulicht |

| | |
|--------|-----------------------------------|
| TAMRA | 6-Carboxytetramethylrhodamin |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TP | Fluorogene Probe |
| TRIS | Tris-Hydroxymethylethyldiamin |
| U | Units |
| V | Volt |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule-1 |
| VLA-4 | Very late activation antigen-4 |
| W | Watt |

1. EINLEITUNG

Die akut pulmonale Inflammation sowie das hieraus häufig resultierende respiratorische Versagen sind trotz moderner Beatmungsstrategien immer noch mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert. Charakteristisches Merkmal der akuten pulmonalen Entzündungsreaktion ist die rasche, massiv verlaufende Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Gefäßbett der Lunge über die transendotheliale Barriere, das Lungeninterstitium und das Alveolarepithel in den Alveolarraum der Lunge. In tierexperimentellen Modellen konnte gezeigt werden, daß dem raschen alveolären Einstrom von neutrophilen Granulozyten zeitlich verzögert regelhaft ein Einstrom von Monozyten folgt. Im Gegensatz zur gut untersuchten pathophysiologischen Rolle neutrophiler Granulozyten ist über die Bedeutung von Monozyten im Rahmen akut pulmonaler Entzündungsvorgänge nur wenig bekannt.

Aufgrund ihres Potentials zur Zytokinliberierung, Sekretion von Sauerstoffradikalen sowie zur Phagozytose und Antigenpräsentation wird Monozyten eine wichtige Funktion im Kontext akut pulmonaler Inflammation zugeschrieben [183, 187]. Für eine Reihe von Erkrankungen verschiedener anderer Organsysteme ist die Funktion von Monozyten bereits gut charakterisiert: Es ist bekannt, daß Monozyten im frühen Stadium der Atherogenese in den subendothelialen Raum des Gefäßes evadieren [50, 128]; monozytäre Infiltrate finden sich darüberhinaus bei Multipler Sklerose, Asthma, Rheumatoider Arthritis, sowie bei interstitiellen Lungenerkrankungen [74, 76, 84].

Für die Rekrutierung von Monozyten an den Ort der Entzündung sind Chemokine von zentraler Bedeutung. Monozyten werden mit Hilfe dieser Chemokine in das inflammatorisch veränderte Gewebe gelockt, um letztendlich dort zur Expansion des ortsständigen Makrophagenpools beizutragen [16]. Für die Rekrutierung von Monozyten aus der Blutbahn in das entzündliche Gewebe spielt das Monozyten-chemotaktische Protein MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) eine wichtige Rolle [144, 193]. MCP-1 gehört wie auch MIP-1 α und RANTES zur Familie der CC-Chemokine. Chemokine wiederum gehören zur Superfamilie der Zytokine und besitzen vielfältige chemotaktische Effekte auf diverse Leukozytenpopulationen [6, 7, 12, 141, 152, 171, 175]. Neben seiner primären Funktion als monozytenrekrutierendes Chemokin zeigt MCP-1 aber auch chemotaktische Wirkung für Makrophagen, CD4-positive T-Lymphozyten und NK-Zellen (natural killer cells) [1, 19, 42,

51, 175]. MCP-1 ist ein 148 Aminosäuren langes, stark glycosyliertes Protein, welches primär von makro- und mikrovaskulären Endothelzellen der pulmonalen Strombahn, aber auch von Alveolarepithelzellen, residenten Alveolarmakrophagen und Fibroblasten sezerniert wird [16, 24, 133, 146, 166, 192]. Neben seiner chemotaktischen Aktivität beeinflusst es die Affinität von Adhäsionsmolekülen der zu rekrutierenden Zellen für den jeweiligen Rezeptor [75, 86, 181]. Neben seiner wichtigen Funktion in der Monozytenrekrutierung kann MCP-1 auch den Aktivierungszustand der Monozyten beeinflussen: Nach Bindung an seinen hochaffinen Rezeptor CCR-2 induziert MCP-1 in Monozyten regelhaft eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die Freisetzung von Arachidonsäurederivaten, sowie auch den respiratorischen Burst [104, 140].

Verschiedene transgene Mausmodelle haben bisher einen kausalen Zusammenhang zwischen der Überexpression von MCP-1 und der Akkumulation von Monozyten und CD4-positiven Lymphozyten in verschiedenen Organsystemen nachgewiesen. So fanden sich Infiltrate von Monozyten sowie CD4⁺ Lymphozyten in perivaskulären Arealen des Zentralnervensystems von Mäusen, welche MCP-1 im Gehirn überexprimierten; ein ähnliches, monozytär dominiertes Zellinfiltrat ließ sich bei Mäusen mit einer Überexpression des Chemokins in pankreatischen Inselzellen finden [42, 47]. Die Überexpression von transgenem humanem MCP-1 in Typ II-Alveolarepithelzellen bewirkte ebenso eine starke Akkumulation von Monozyten im alveolären Kompartiment von Mäusen [51]. Interessanterweise zeigte sich parallel zu diesen Erkenntnissen aus transgenen Mausmodellen, daß unter klinischen Bedingungen eine gesteigerte Expression von MCP-1 regelhaft mit einer Akkumulation von Monozyten im Gewebe assoziiert ist. Erhöhte Spiegel von MCP-1 finden sich in der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit interstitiellen granulomatösen Lungenerkrankungen [4, 20, 41, 74, 76], sowie bei Immunkomplexalveolitiden [78]. Desweiteren ist MCP-1 auch bei nicht-pulmonalen inflammatorischen Prozessen, wie der Rheumatoiden Arthritis [2, 55, 84], in atherosklerösen Plaques [50, 128, 170, 191] und bei bestimmten Nephritiden exprimiert [130, 148]. Diese Beobachtungen zeigen, daß Chemokine wie MCP-1 alleine, bei Abwesenheit weiterer Stimuli wie Endotoxin, in der Lage sind, eine Migration monozytärer Zellen in das Gewebe zu induzieren.

Von großer Bedeutung für die transalveoläre Monozytenrekrutierung sind die auf der Monozytenoberfläche exprimierten Adhäsionsmoleküle. Diese Adhäsionsmoleküle spielen bei Zell-Zell-Interaktionen eine wesentliche Rolle. Zahlreiche Untersuchungen der letzten

Jahre haben Erkenntnisse zum Mechanismus der transendo-/epithelialen Emigration von Leukozyten in den Alveolarraum der Lunge geliefert. So zeigte sich, daß diese Zellen auf ihrer Oberfläche v. a. Integrine und Selektine tragen [20, 53, 72, 100, 103, 107, 116, 118, 124, 125, 156, 164]. Dominierende Bedeutung kommt nach den Untersuchungen der letzten Jahre vor allem dem β_1 -Integrin VLA-4 (CD49d/CD29) [23, 60, 61] sowie den β_2 -Integrinen LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) und p150/95 (CD11c/CD18) zu, ebenso dem Selektin CD62 [70, 80, 91, 101, 122, 135, 154, 161, 173, 174, 184].

Für die Evaluierung der Funktion von Monozyten im Kontext der akut pulmonalen Inflammation spielt das Entzündungspotential dieser Zellen eine entscheidende Rolle. Dieses wird ganz maßgeblich über ihre Fähigkeit zur Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine bestimmt. Zytokine sind zellregulatorische Proteine mit einem Molekulargewicht von < 80 kDa. Sie spielen in der Hämatopoese und bei der Kommunikation zwischen inflammatorischen Zellen eine wichtige Rolle, denn sie regulieren Initiation, Stärke und Dauer einer Immunreaktion [8]. Sie werden lokal produziert, haben kurze Halbwertszeiten (Sekunden bis Minuten) und sind in pikomolaren Konzentrationen wirksam. Zytokine wirken parakrin, z. T. auch autokrin, interagieren mit hochspezifischen Zellrezeptoren und induzieren zunächst zellspezifische Effekte, wie z. B. Mediatorenliberation und Regulation der Expression verschiedener Zelloberflächenmoleküle [48, 54, 162]; dabei wirken sie meist pleiotrop. Dies bedeutet, daß ein Zytokin unterschiedliche Effekte in verschiedenen Zielzellen ausüben kann [83]. Als „molekulare Kommunikationsvermittler“ spielen sie in der „host-defense“ gegen invadierende Pathogene eine zentrale Rolle. Hierbei agieren pro- und antiinflammatorische Zytokine in einer Art „Zytokin-Netzwerk“ mit synergistischen, additiven und antagonistischen Wirkungen, wodurch die Effektorfunktionen der Zielzellen vielfältig moduliert werden können [8, 26, 81, 83, 139]. Die Frühphase der akuten Entzündung ist durch verstärkte Sekretion des Akute-Phase-Proteins TNF- α gekennzeichnet. TNF- α ist ein nicht glycosyliertes, aus 157 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. Gemeinsam mit dem Zytokin IL-1 β spielt es eine tragende Rolle als inflammatorischer Mediator [27, 30, 69, 90, 98, 123, 129, 150, 178]. Ursprünglich als zytotoxisches Effektormolekül beschrieben, scheint TNF- α auch aufgrund dieser zytotoxischen Eigenschaften [49, 89] ein wichtiger Mediator im LPS-Signaling in vivo zu sein. Von Monozyten und Alveolarmakrophagen produziert [169], wirkt es entzündungsfördernd, antiinfektiös und antiproliferativ [9, 36, 111, 113, 138].

Für die Induktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine spielen Pattern-Recognition Rezeptoren wie die Toll-like Rezeptoren und das GPI-verankerte CD14 eine wichtige Rolle. Als „molekulare Schaltstelle“ sorgen diese für die Transition exogener Stimuli, wie z. B. des Lipopolysaccharids gramnegativer Bakterien, in endogene Signale, die zur Freisetzung von Zytokinen führen. CD14 ist ein 55kDa-Glykoprotein, welches sowohl als membranständiges Protein mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (mCD14), als auch als lösliches Protein existiert (sCD14). CD14 wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen exprimiert und vermittelt zusammen mit Toll-like Rezeptor 4 die durch Endotoxin ausgelöste Zellaktivierung [37, 87, 94, 109, 134, 176, 190, 196]. Hierbei bindet Endotoxin zunächst an das Akute-Phase-Protein LBP, das lipopolysaccharidbindende Protein (lipopolysaccharide binding protein) und dieser Komplex schließlich an CD14, was letztendlich zur Zellaktivierung mit der Konsequenz der Zytokinliberation führt [28, 62]. Die lösliche Form von CD14 ist außerdem in der Lage, die Zytokinsekretion von Alveolarmakrophagen auf einen Endotoxinstimulus hin zu verstärken und Endo- und Epithelzellen, welche kein membranal exprimiertes CD14 besitzen, LPS-responsiv zu machen [110, 113, 137, 153]. Die lösliche Form von CD14 ist darüberhinaus am Prozess der Elimination von LPS beteiligt [32, 88]. Ferrero et al. konnten zeigen, daß transgene Mäuse, die CD14 überexprimieren, hypersensitiv auf LPS reagieren [39], was die zentrale Rolle von CD14 im LPS-Signaling verdeutlicht.

Die pathophysiologische Rolle transalveolär akkumulierender Monozyten bei akuten und chronischen entzündlichen Veränderungen in der Lunge war bis dato noch wenig untersucht, da eine suffiziente Technik zur klaren Identifikation, Isolation und funktionellen Charakterisierung frisch rekrutierter Monozyten vor dem Hintergrund residenter Alveolarmakrophagen nicht vorhanden war. In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung einer neuen Technik beschrieben, welche es erlaubt, mit Hilfe eines Intravital-Fluoreszenzfarbstoffes chemotaktisch in den Alveolarraum von Mäusen rekrutierte Monozyten klar vom Pool der residenten Alveolarmakrophagen durchflußzytometrisch zu diskriminieren, zu isolieren und partiell funktionell zu charakterisieren.

Fragestellung:

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- 1) die Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung der pulmonalen transendotheliale/epitheliale Rekrutierung von peripheren Blutmonozyten in den Alveolarraum und deren durchflußzytometrische Diskriminierung von Alveolarmakrophagen durch Fluoreszenzmarkierung;
- 2) die immunphänotypische Analyse transmigrations- und aktivierungsrelevanter Adhäsionsmoleküle auf alveolär rekrutierten Monozyten und ihr Vergleich mit peripheren Blutmonozyten;
- 3) die funktionelle Charakterisierung alveolär rekrutierter Monozyten bezüglich ihrer Endotoxin-Stimulierbarkeit ex vivo.

Zur Untersuchung der pathophysiologischen Rolle von Monozyten bei akut inflammatorischen Prozessen in der Lunge wurde Mäusen intratracheal das Chemokin MCP-1 verabreicht. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die in den Alveolarraum evadierten Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnen, mit Hilfe der Durchflußzytometrie hochgradig aufgereinigt und immunphänotypisch charakterisiert. Außerdem wurden separierte alveolär rekrutierte Monozyten ex vivo hinsichtlich ihrer TNF- α -Sekretion als Maß ihrer Endotoxin-Induzierbarkeit analysiert und mit peripheren Blutmonozyten verglichen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tierexperimenteller Versuchsabschnitt

2.1.1 Versuchstiere

In allen Experimenten wurden weibliche BALB/c Mäuse im Alter von 10 – 12 Wochen und mit einem Gewicht von 18 – 21 g verwendet.

2.1.2 Narkose

Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere in einer Aetherglocke für ca. 20 s sediert. Danach erfolgte die intramuskuläre Gabe von Xylazinhydrochlorid (Rompun®) zur tiefen Sedierung und Muskelrelaxation. Hierfür wurden 200 µl der Xylazinhydrochloridlösung mit 300 µl einer 0,9% Natriumchloridlösung in eine 1 ml-Spritze aufgezogen, gemischt und von dieser Lösung wiederum 100 µl mit 900 µl 0,9% Natriumchloridlösung verdünnt (Mischungsverhältnis 1:15, Endkonzentration 2,5 mg/kg Körpergewicht). Die eigentliche Narkose wurde durch intramuskuläre Gabe von ca. 50 µl einer 1:5 verdünnten Ketaminhydrochloridlösung eingeleitet (Endkonzentration 50 mg/kg Körpergewicht). Während des operativen Eingriffs erfolgte die Aufrechterhaltung der Narkose durch intramuskuläre Gabe von 20-30 µl Aliquots der verdünnten Ketaminhydrochloridlösung.

2.1.3 Farbstoffmarkierung mit PKH26: Dosis- und zeitabhängige Akkumulation in residenten Alveolarmakrophagen

Für die in vivo Fluoreszenzmarkierung der residenten Alveolarmakrophagen wurde der rote Fluoreszenzfarbstoff PKH26 und die zugehörige Verdünnungslösung (Diluent B) eingesetzt. PKH26, welches als 1 mM Stocklösung in 100% Ethanol gelöst vorliegt, wurde unter sterilen Bedingungen mit der Verdünnungslösung B auf die jeweiligen Gebrauchskonzentrationen verdünnt. Diese PKH26-Lösung wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl in einer 1 ml-

Spritze mit einer 29G-Kanüle unter sterilen Bedingungen langsam in die Schwanzvene injiziert.

Zunächst wurde die Dosis- und Zeitabhängigkeit der Akkumulation von PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen *in vivo* untersucht. Hierzu wurde Mäusen nach vorausgegangener Narkose in steigender Konzentration je 100 μ l einer 10 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 240 μ M und 300 μ M PKH26-Lösung über die Schwanzvene appliziert. Unter Zugrundelegung eines austauschbaren Blutvolumens der Mäuse von ca. 2000 μ l ergaben sich schließlich *in vivo* folgende Endkonzentrationen dieser intravenös applizierten Stammkonzentrationen: 0,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 12 μ M und 15 μ M PKH26.

Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Akkumulation von PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen wurde den Mäusen eine 300 μ M PKH26-Lösung injiziert (15 μ M *in vivo* Konzentration) und nach 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt.

2.1.4 Intratracheale Instillation von murinem rekombinantem JE/MCP-1

24 Stunden nach der intravenösen Injektion von PKH26 bzw. 15 min nach Reinjektion PKH26-vormarkierter Blutleukozyten (s. 2.1.8), wurden die BALB/c Mäuse wiederum wie oben beschrieben narkotisiert. Nachdem beide Augen zum Austrocknungsschutz mit Bepanthen Augensalbe versorgt worden waren, erfolgte die Fixation der Maus in Rückenlage. Das Fell wurde in Höhe der Trachea abrasiert und die Haut mit Desinfektionslösung desinfiziert. Mit einem sterilen Einmalskalpell wurde unter stereomikroskopischer Kontrolle eine senkrechte, ca. 0,5 cm lange Inzision vorgenommen und das unter dem Schnitt befindliche Gewebe mit sterilen feinen Pinzetten stumpf dissektiert, um die Trachea freizulegen. Nachdem zunächst mit einer 23G Kanüle zwischen zwei Trachealspannen ein kleiner Einstich plaziert worden war, wurde ein steriler 26G Abbocath-Venenverweilkatheter in die Trachea eingebracht. Nun wurde murines JE/MCP-1, das homologe Genprodukt zum humanen MCP-1 [142, 146], bzw. murines rekombinantes MIP-1 α oder RANTES mittels einer 1ml-Spritze unter visueller Kontrolle der Atmung langsam in die Lunge instilliert (jeweils 50 μ g gelöst in 80 μ l PBS mit 0,1% HSA). Nach intratrachealer Instillation von rJE/MCP-1 wurde der Venenverweilkatheter entfernt, die Wunde mit zwei bis drei Stichen Vicryl-Faden vernäht und anschließend gründlich mit Softasept Desinfektionslösung

befeuchtet. Kontrollmäuse erhielten eine intratracheale Instillation von 80 µl PBS mit 0,1% HSA. Die Tiere wurden nach Erwachen aus der Narkose in ihre Käfige zurückgebracht und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.1.5 Durchführung des Limulus-Amöbozytenlysat-Assays zur Bestimmung der LPS-Kontamination

Zum Ausschluß von Endotoxinkontaminationen der verwendeten Lösungen und Präparationen wurde ein Limulus Amöbozytenlysat Assay (LAL) durchgeführt. Der Test weist sehr sensitiv und spezifisch bakterielles Endotoxin in Konzentrationen von > 0,015 U/ml (1,25 pg/ml) nach. Das Test-Prinzip beruht auf der Aktivierbarkeit eines Limuluszyns durch Endotoxin, welches p-Nitro-Anilin von einem chromogenen Substrat abspaltet. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm erfaßt und über eine Standardkurve in Konzentrationswerte umgerechnet werden kann. Standards und Proben wurden im Duplikat gemessen. Hierzu wurden 100 µl der 37°C warmen Proben, Standards und Kontrollen in 100 µl LA-Lysat gegeben, nach 15 min 200 µl der Substrat-Puffer-Lösung zugegeben, die ablaufende Farbreaktion nach 8 min durch die Zugabe von 100 µl 20%iger Essigsäure abgestoppt und anschließend im Photometer gemessen.

2.1.6 Durchführung der Blutentnahme

48 h nach der Instillation von rJE/MCP-1 in die Lunge der Mäuse, in einigen Experimenten auch 72 h und 96 h nach Instillation, wurden venöse Blutproben entnommen. Dafür wurden die Tiere durch eine Überdosis Forene getötet und in Rückenlage fixiert. Mit einer Mikropräparierschere wurde erst das Fell über der Bauchhöhle eingeschnitten, dann mit Pinzetten stumpf abpräpariert und schließlich die Bauchhöhle eröffnet. Die Vena cava wurde freigelegt und ca. 800 µl Blut mit einer 23G Kanüle in eine 1-ml Spritze abgenommen und in EDTA-Blutprobenröhrchen gegeben. Anschließend wurde das antikoagulierte Blut durch Zugabe von 10 ml Ammoniumchloridlösung einer Erythrozytenlyse (5 min bei Raumtemperatur) unterworfen. Die Suspension wurde 9 min bei 1400 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand über dem Pellet der verbleibenden Zellen abgossen und das

Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (9 min bei 1400 rpm und 4°C) wurde wiederum der Überstand abgegossen, das Zellpellet in 0,5 ml PBS mit 10% FCS (foetalem Kälberserum) resuspendiert und sofort auf Eis inkubiert.

2.1.7 Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Hierzu wurde nach erfolgter Blutentnahme die Hautnaht über der Trachea mit einer Mikropräparierschere entfernt und der Hautschnitt auf ca. 1 cm erweitert. Mit der Schere wurde die Trachea zwischen zwei Trachealknorpelspangen unter stereomikroskopischer Kontrolle quer inzidiert, eine vorne abgeschliffene und auf 1,5 cm gekürzte 21G Kanüle in die Trachea eingesetzt und mit einem Vicrylfaden (4,0) durch Umschlingen von Tubus und Trachea fest fixiert. Eine 1 ml Spritze, in die zuvor 300 µl einer kalten sterilen PBS/EDTA-Lösung (EDTA-Konzentration 5 mM, pH-Wert 7,2) aufgezogen worden war, wurde auf den Tubus aufgesetzt und die PBS/EDTA-Lösung langsam in die Lunge instilliert, wieder langsam aspiriert und in ein 10 ml Probenröhrchen auf Eis überführt. Nach mehreren Lavageschritten (BAL-Volumen 4,5 ml) wurde die Zellsuspension bei 1400 rpm und 4°C 9 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die verbliebenen Zellen mit den zuvor gewonnenen in 1,5 ml PBS mit 10% FCS und 0,02% Natriumazid aufgenommen und auf Eis inkubiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die gewonnenen Zellen gezählt.

2.1.8 In vitro Fluoreszenzmarkierung peripherer Blutleukozyten mit dem Farbstoff PKH26

Zur in vitro Fluoreszenzfärbung von peripheren Blutleukozyten wurden Blutproben entnommen, in EDTA-Röhrchen überführt und einer Erythrozytenlyse unterworfen. Anschließend wurden die Blutleukozyten zwei Mal in RPMI 1640 Medium gewaschen und in 1 ml Diluent B Stocklösung resuspendiert. Die in vitro Fluoreszenzmarkierung der Blutleukozyten erfolgte durch Zugabe von PKH26-Lösung (Endkonzentration 10 µM PKH26). Die Färbung erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur und wurde durch Zugabe von 2 ml Mausserum abgestoppt. Die gefärbten Blutleukozyten wurden zwei Mal mit RPMI 1640 Medium mit 20% Mausserum gewaschen und zur Entfernung von Zellaggregaten durch einen sterilen 70 µm- und durch einen 20 µm-Nylonfilter gefiltert. Nach Überprüfung der

Fluoreszenzintensität der Leukozyten mittels Durchflußzytometer wurden die sorgfältig resuspendierten Blutleukozyten Empfängermäusen über die Schwanzvene reinjiziert ($\sim 4 \times 10^7$ rotmarkierte Leukozyten / Maus in einem Gesamtvolumen von 200 μl).

2.2 Durchflußzytometrie

2.2.1 Durchflußzytometrisches Meßprinzip

Mittels Durchflußzytometrie können komplexe Zellgemische, welche als Zellsuspension vorliegen, auf Einzelzellbasis analysiert werden. Hierbei erfolgt die Vereinzelung der Zellen durch hydrodynamische Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrahl. Dabei wird die Zellsuspension aus einem Probenröhrchen mittels Luftdruck über einen Schlauch - von einer dünnen Flüssigkeitssäule eingeschlossen - in ein zweites Flüssigkeitssystem eingeleitet, welches als größere Flüssigkeitssäule die kleinere Flüssigkeitssäule mit den darin befindlichen Zellen umgibt. Diese „Mantelflüssigkeit“ weist eine im Verhältnis zur kleinen Flüssigkeitssäule höhere Fließgeschwindigkeit auf, wodurch die Vereinzelung und Fokussierung der Zellen im Zentrum des Flüssigkeitsstrahles erzielt wird. Die Zellen liegen jetzt „perlschnurartig“ hintereinander. Jede einzelne vom Flüssigkeitszylinder umhüllte Zelle wird nun in einem sog. Laser-Intersect von einem Argonionen-Laser angestrahlt, welcher Licht bei 488 nm emittiert. Dabei erzeugt jede Zelle ein für ihren Zelltyp charakteristisches Vorwärts (FSC)- und Seitwärts (SSC)- streulicht. Ebenso werden verschiedene Zelltypen zur Emission spezifischer Fluoreszenzlichtcharakteristika angeregt. Diese für die jeweilige Zellpopulation charakteristischen Fluoreszenzlichtemissionen können bei 535 nm (FL 1, grüne Fluoreszenz) und bei 575 nm (FL 2, rote Fluoreszenz) mit Hilfe von Sekundärelektronenvervielfachern (sog. Photomultipliern) amplifiziert und nach Konvertierung in elektrische Signale quantitativ erfaßt werden. Ebenso wie die Streulichtcharakteristika dienen auch sie der Diskriminierung von einzelnen Zellpopulationen sowohl der BAL-Suspension als auch der gewonnenen Blutzellen. Es wurde gezeigt, daß sowohl die durchflußzytometrische Charakterisierung, wie auch die im folgenden beschriebene durchflußzytometrische Zellseparation keinen Einfluß auf die zelluläre Funktion oder das Antigenprofil der untersuchten Zellen haben [115].

2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse des Antigenprofils von peripheren Blutmonozyten, alveolär rekrutierten Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen

2.2.2.1 Durchflußzytometrische Analyse des Antigenprofils peripherer Blutmonozyten

Das Antigenprofil der peripheren Blutmonozyten wurde mittels Zweifarbandurchflußzytometrie im Fluoreszenz 1- (grün) und Fluoreszenz 2- (rot) Kanal analysiert. Die aus den Blutproben gewonnenen Leukozyten wurden in eine Mikrotiterplatte aliquotiert und mit 5-10 µl eines Fluorescein-Isothiocyanat- (FITC) konjugierten F4/80 Ratte-anti-Maus-Antikörpers inkubiert. Dieser Antikörper bindet an das für Monozyten und Makrophagen spezifische F4/80-Antigen [6, 46, 65, 94, 98, 119]. Ebenso wurden die Blutleukozyten mit jeweils 5-10 µl Phycoerythrin- (PE) konjugierten Ratte-anti-Maus-Antikörpern mit Spezifität für CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1), CD14, CD18, CD49d (VLA-4) und CD62L (L-Selektin) inkubiert. Die Inkubation erfolgte jeweils für 30 min auf Eis, danach wurden die mit den Antikörpern gekoppelten Zellen je zwei mal abzentrifugiert (9 min bei 1400 rpm und 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet in PBS mit 10% FCS resuspendiert. Die durchflußzytometrische Analyse der peripheren Blutmonozyten erfolgte, indem zuerst die F4/80-positiven, FITC-markierten Zellen (Monozyten) im FSC (Vorwärtsstreulicht) versus FL 1 dot plot elektronisch "gegatet" wurden und diese Zellen anschließend im FL 2 Histogramm bezüglich ihres spezifischen Antigenprofils, gemessen als Fluoreszenz 2-Emission, analysiert wurden.

2.2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse des Antigenprofils alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen

Die alveolär rekrutierten Monozyten und die residenten Alveolarmakrophagen wurden einer Einfarben-Grünfluoreszenzmarkierung (FITC) unterzogen. Die auf Eis inkubierte Zellsuspension wurde in eine Mikrotiterplatte aliquotiert und jedes Well mit 10 µl Fc-Block zur Blockade von Fc-Rezeptoren versehen. Danach wurden die Ansätze für 30 min mit 5-10 µl von Ratte-anti-Maus-Antikörpern mit Spezifität für F4/80, CD11a, CD11b, CD18, CD49d und CD62L inkubiert. Die Markierung der Zellen mit dem spezifischen CD14-Antikörper

wurde nach Angabe des Herstellers folgendermaßen durchgeführt: Zusätzlich zur Inkubation mit dem CD14-Antikörper wurde die zwanzigfache Menge aufgereinigten Maus-IgG zugegeben, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden diese mit 5-10 µl eines FITC-markierten Ziege-anti-Ratte-Antikörpers 30 min lang auf Eis inkubiert, danach weitere zwei Mal gewaschen und sofort im Durchflußzytometer analysiert, indem sie zuerst mittels ihrer FSC-Charakteristika versus FL 2-Kanal (PKH-vermittelte Rotfluoreszenz) gegatet wurden. Anschließend konnten die FITC-markierten Zellen im FL 1-Kanal auf ihre verschiedenen Oberflächenantigene hin untersucht werden. Die Diskriminierung alveolär rekrutierter Monozyten von residenten Alveolarmakrophagen und Lymphozyten konnte aus drei Gründen vollzogen werden:

- 1) Im Gegensatz zu den PKH-markierten, rotfluoreszierenden Alveolarmakrophagen zeigten die alveolär rekrutierten Monozyten nur eine geringe Rotfluoreszenz.
- 2) Zusätzlich zeigten diese neu rekrutierten Leukozyten eine für Monozyten typische F4/80-Expression.
- 3) Die im Durchflußzytometer als Monozyten identifizierten Zellen zeigten nach Separation, Zytozentrifugation und anschließender Pappenheim-Färbung (s. 2.3) mikroskopisch eine Monozyten-typische Morphologie.

2.2.3 Prinzip der durchflußzytometrischen Zellseparation

Zur Separation der residenten Alveolarmakrophagen und der in den Alveolarraum evadierten Monozyten wurde ein FACStar^{PLUS} Durchflußzytometer verwendet, welches zur Separation größerer biologischer Partikel eine MakroSort-Einrichtung besitzt. Mittels eines piezoelektrischen Transducers wird dabei nach der hydrodynamischen Fokussierung der BAL-Zellen der umhüllende Flüssigkeitsstrahl zu Vertikalschwingungen angeregt, so daß der die Zellen umgebende Flüssigkeitsmantel im sog. Tropfenabrißpunkt (stream breakoff) in einzelne Tropfen (droplets) übergeht. Erreicht nun eine zu separierende Zelle den Tropfenabrißpunkt, so wird der gesamte Flüssigkeitsstrahl für einen kurzen Zeitpunkt elektrisch geladen und der sich ablösende Tropfen mit der darin enthaltenen Zelle erhält eine elektrische Restladung. Zwischen zwei Ablenkungsplatten (deflection plates) findet nun in einem elektrischen Feld die Deflexion des elektrisch geladenen Tropfens und damit die

Separation der im Tropfen enthaltenen Zelle statt. Die separierten Zellen werden dabei in sterilen Probenröhrchen aufgefangen.

2.2.4 Separation der mittels BAL und Blutentnahme gewonnenen Zellen

Für die flow-zytometrische Separation der BAL-Zellen wurde ein Durchflußzytometer verwendet, welches mit einem 5W-Argonionen Laser mit einem Laser-Output von 200 mW und einer Emissionswellenlänge von 488 nm betrieben wurde. Vor jedem Separationsvorgang erfolgte eine Sterilisierung des Probenschlauches mit 0,1%iger (w/v) Natrium-Hypochloridlösung, darauf ein Nachspülen mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die MakroSort-Einrichtung am FACStar war folgendermaßen justiert: Der Differentialdruck wurde auf 8,5 psi (pound force per square inch = 1 bf/in²; 1 psi = 68,95 mbar) eingestellt und der piezoelektrische Transducer mit einer Frequenz von 17,164 kHz betrieben, so daß eine Tröpfchenverzögerung (droplet delay) von 15,2-15,7 Tröpfchen resultierte. Vor der Separation der Zellen erfolgte die exakte Justierung des Tropfenabrißpunktes durch experimentelle Separation fluoreszierender Kalibrierungsbeads, bis eine Separationsreinheit von > 99% erreicht war. Die während des Separationsvorgangs verwendete sterile Kochsalzlösung wurde mit Hilfe des oben beschriebenen Limulus-Amöbozytenlysat-Assays (s. 2.1.5) routinemäßig auf ihren Endotoxingehalt überprüft, der stets < 1.25 pg/ml Kochsalzlösung betrug.

Die Separation der einzelnen Zellpopulationen aus der BAL (alveolär rekrutierte Monozyten und residente Alveolarmakrophagen) wie auch der peripheren Blutmonozyten erfolgte jeweils nach unterschiedlichen Kriterien. Periphere Blutmonozyten wurden nach den Kriterien **1**) Vorwärtsstreulicht (FSC) und **2**) Fluoreszenz bei 535 ± 30 nm (FL 1) der vorher FITC-markierten Zellen (s. 2.2.2.1) separiert. Alveolär rekrutierte Monozyten und residente Alveolarmakrophagen (FITC- und PKH-markiert; s. 2.2.2.2) wurden hingegen nach den beiden Kriterien **1**) Fluoreszenz bei 535 ± 30 nm (FL 1) und **2**) Fluoreszenz bei 575 ± 26 nm (FL 2) separiert. Während der Zellseparation wurden die zu separierenden Zellsuspensionen, ebenso wie die bereits separierten Zellen auf Eis inkubiert. Die Reinheit der sortierten Zellpopulationen wurde **1**) durch eine "post-sort" Analyse der separierten Zellen überprüft und **2**) durch differentialzytologische Auswertung Pappenheim-gefärbter Zellausstrichpräparate bestimmt. Mittels einer Propidium-Iodid-Färbung und anschließender

FACS-Analyse der separierten Monozyten und Alveolarmakrophagen wurde ihre Vitalität bestimmt. Sie betrug immer > 96% [115]. Die Daten der Zellseparationsprozedur wurden computergestützt gespeichert und mit Hilfe der PCLYSYS-Software für graphische Auswertungen prozessiert.

2.3 Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten

Zur morphologischen Differenzierung der komplexen BAL-Zellgemische, ebenso zur mikroskopischen Kontrolle der Reinheit und der Morphologie der separierten Zellen wurden Zytozentrifugenpräparate angefertigt. Hierfür wurden 10^5 BAL-Zellen, bzw. separierte Zellen in 100 μ l PBS mit Hilfe einer Zytozentrifuge 5 min lang bei 500 rpm auf vertikal montierte Objektträger zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet. Diese Präparate wurden danach 10 min in May-Grünwald- (Eosin-Methylenblau-) Lösung fixiert und anschließend 5 min in Giemsa- (Azur-Eosin-Methylenblau-) Lösung (10% v/v in Aqua dest.) angefärbt (Pappenheim-Färbung). Die differentielle lichtmikroskopische Auszählung der prozentualen Anteile an invadierten Monozyten, residenten Alveolarmakrophagen und Lymphozyten in der BAL-Suspension bzw. die Bestimmung der Reinheit und der Morphologie der separierten Zellen erfolgte bei 100-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Leitz Mikroskopes.

2.4 Histologie und Immunhistochemie von Lungenschnitten

Nach erfolgter PKH26-Injektion und JE/MCP-1-Instillation wurden die Versuchstiere (im Zeitabstand von 48 h nach der intratrachealen Applikation) einer letalen Dosis Aether ausgesetzt. Sie wurden auf der Unterlage fixiert und der Thorax vorsichtig mit einer feinen Schere eröffnet. Herz und Lunge wurden von der Thoraxwand und dem Diaphragma gelöst, zusammen entnommen und die Lunge in eiskalter 2,5%iger Paraformaldehydlösung in PBS (pH 7,2) bei einem konstanten Druck von 20 cm H₂O via Instillation über die Trachea fixiert. Die Fixation erfolgte über 2 h bei 8°C. Danach wurden die fixierten Gewebe in Paraffin eingebettet. Weitere entnommene Lungen wurden in TissueTek, einer Lösung zur Herstellung von Kryopräparaten, eingebettet und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren, um Kryomikrotomschnitte anzufertigen. Von den entnommenen Lungen wurden Mikroschnitte

von 10 µm Dicke angefertigt, diese einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen und im Hinblick auf erfolgte Gewebeschädigung und zelluläre Infiltrate ausgewertet.

Von den in Stickstoff eingefrorenen Lungen wurden ebenfalls Kryoschnitte angefertigt, die dann immunhistochemisch mittels eines CD45-Primärantikörpers und Alkalische Phosphatase-markierten Sekundärantikörpern analysiert wurden: Zuerst erfolgte eine Fixation der Schnitte für 5 min in 3%iger Paraformaldehydlösung und nach einem Waschschrift eine Vorinkubation in PBS mit 5% Ziegen Serum, 1% BSA und 0,5% Tween-20, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Daraufhin wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem 1:50 verdünnten monoklonalen Anti-Maus CD45-Antikörper, kennzeichnend für leukozytäre Zellen, inkubiert. Ebenso erfolgte die Inkubation mit dem 1:400 verdünnten sekundären Alkalische Phosphatase-markierten Ziege-anti-Ratte-Antikörper über Nacht bei 4°C. Nach der Antikörpermarkierung wurden die Kryoschnitte mit einem VectorRed Substrat-Kit 60 min lang entwickelt, indem ein Substrat der Alkalischen Phosphatase zugegeben wurde, dessen Umbau durch das Antikörper-gekoppelte Enzym in einem braunen Farbumschlag zu erkennen und zu messen war. Zudem wurde Levamisol, ein spezifischer Inhibitor der Alkalischen Phosphatase, in einer Konzentration von 2,5 mM zugegeben, um die endogene Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu hemmen. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte dann mit Methylgrün. Negativkontrollpräparate wurden angefertigt, indem der primäre CD45-Antikörper durch unspezifisches Serum, ebenfalls 1:50 verdünnt, ersetzt wurde. Die mikroskopische Analyse der so markierten Kryoschnitte erfolgte mit einem Leitz Orthoplan Hellfeld-Mikroskop bei 160facher Vergrößerung. Die positiv gefärbten, also CD45-positiven Zellen wurden in zehn zufällig ausgewählten mikroskopischen Feldern ausgezählt, bezogen auf eine Gesamtfläche von 9,5 mm². Die zellulären Infiltrate wurden in vier verschiedenen histologischen Bereichen des Lungengewebes ausgewertet: **1)** Leukozyten im perivaskulären Gewebe, **2)** im peribronchialen Gewebe, **3)** in den alveolären Septen und **4)** in den Lungenalveolen [33, 34].

2.5 Analyse der TNF- α -Genexpression peripherer Blutmonozyten, alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen

2.5.1 Isolation der Gesamt-RNA und reverse Transkription

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe der sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chlorophorm-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi [22]: Nach der durchflußzytometrischen Separation der einzelnen zu untersuchenden Zellpopulationen wurden diese mit je 1 ml Guanidiniumthiocyanat in einem sterilen Probenröhrchen versetzt, durch eine 30G-Kanüle geschert und dieses so gewonnene Zellysate mit 1 ml 4°C kalten Phenol-Chlorophorm versetzt, gut vermischt und die Suspension für 15 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt (15 min bei 4°C und 13000 rpm) zur Trennung der wässrigen Phase, welche die RNA enthielt, von der organischen Phase. Nach vorsichtigem Abnehmen der oberen Phase wurde diese zum Ausfällen der RNA mit 1 ml Isopropanol versetzt, für 30 min bei -86°C eingefroren und nach dem Auftauen 30 min bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand über dem RNA-Pellet wurde abgenommen, je 500 μ l Guanidinthiocyanat und 500 μ l Isopropanol auf das Pellet gegeben, der Ansatz für weitere 15 min bei -86°C eingefroren und wiederum 20 min bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand über dem aufgereinigten RNA-Pellet wurde abgenommen und das Pellet zwei Mal mit je 100 μ l 70% Ethanol gewaschen, danach für 5 min getrocknet und in 10 μ l Aqua dest. rückgelöst. Nun erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte im Photometer bei 260 und 280 nm (Ausbeute an in Aqua dest. rückgelöster RNA: $OD_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 1-1,5).

Zur Entfernung genomischer DNA-Kontaminationen wurden die RNA-Präparationen einem enzymatischen DNA-Verdau unterzogen. Pro Ansatz wurden jeweils 0,5 μ g Gesamt-RNA in 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM $MgCl_2$, 0,1 mM DTT, 100 U RNAsin, sowie 2 U RNase-freier Deoxyribonuklease I in einem Endvolumen von 100 μ l bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Enzymaktivierung erfolgte durch Zugabe von 2 μ l einer 0,2%igen SDS-Lösung. Anschließend wurde die RNA mit 100 μ l Phenol-Chlorophorm-Isopropanol (PCI) erneut extrahiert und in 2,5fachem Volumen 100%igen Ethanol, sowie 1/10 Volumen 2 M Natriumacetats ausgefällt, in 70%igem Ethanol zwei Mal gewaschen und in RNase-freiem Aqua dest. rückgelöst. Im Anschluß hieran erfolgte die reverse Transkription der mRNA unter

Herstellung eines Mastermix aus 1 x first strand Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Dithiothreitol), 15 nm random Hexanucleotiden (als Primer), 20 U RNAsin, 1 mM der jeweiligen dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 100 U Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) Reverse Transkriptase in einem Endvolumen von 25 µl. Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte in einem PE GeneAmp PCR System 2400 während einer 50minütigen Inkubation bei 37°C; in einem abschließenden Schritt wurde die Enzymaktivierung durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 94°C (7 min) erreicht. Bis zur anschließenden real-time PCR-Analytik wurden die cDNA-Präparationen bei -86°C gelagert.

2.5.2 Nachweis und Quantifizierung der TNF- α -Genexpression in peripheren Blutmonozyten, alveolären Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen mittels real-time PCR

2.5.2.1 Prinzip der real-time PCR

Bei der PCR (polymerase chain reaction) handelt es sich um ein durch spezifische Primer definiertes, biochemisch-enzymatisches RNA-Amplifikationsverfahren, bei dem durch sich wiederholende „Zyklen“ eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht wird. Die real-Time PCR erlaubt eine „online“ Quantifizierung amplifizierter PCR-Produkte. Mit dem TaqMan-PCR-Verfahren ist es möglich, mittels fluorogener DNA-Sonden unter Ausnutzung der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase eine Quantifizierung der Sequenz-spezifischen Amplifikationsprodukte schon während des Reaktionsablaufs zu erreichen. Hierfür wird eine spezielle fluorogene Hybridisierungssonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (FAM, 6-Carboxyfluorescein) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (TAMRA, 6-Carboxytetramethylrhodamin) trägt. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der sterischen Nähe zum Quencher durch einen Förster-Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt (Abb. 1). Zu Beginn des PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde zusammen mit 5'- und 3'-PCR-Primern zunächst an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase („primer extension“, DNA-Synthese) trifft die Taq

Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt, sie mittels ihrer 5'-3'-exonukleolytischen Aktivität zu zerschneiden. Freie, nicht hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Kommt es jedoch zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche Nähe und damit auch der FRET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an (Abb. 2). Das dabei entstehende Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase aktiviert wird. Unspezifische Amplifikation wird daher nicht detektiert. Die Veränderungen der Fluoreszenzemissionen der beiden Farbstoffe kann mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfaßt werden [64, 95].

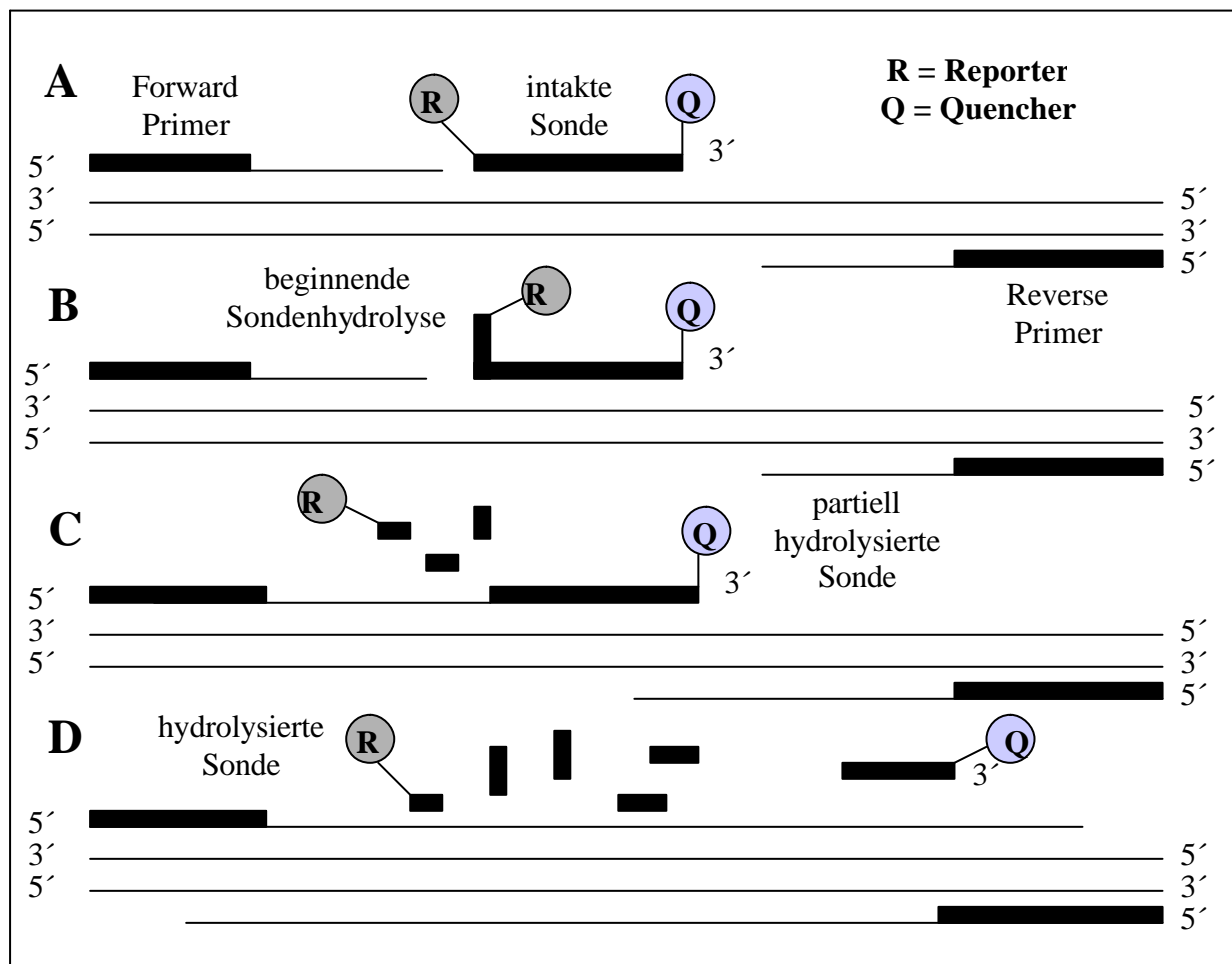


Abbildung 1A-D. Einzelne Schritte der 5'-3'-exonukleolytischen Aktivität der Amplifika-DNA-Polymerase während eines PCR-Zyklus. Polymerisation (A), Verdrängung der Sonde (B), Sondenhydrolyse (C), Polymerisation abgeschlossen (D).

2.5.2.2 Durchführung der real-time PCR

Der Nachweis und die Quantifizierung der Genexpression von murinem TNF- α in peripheren Blutmonozyten, alveolär rekrutierten Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen wurde folgendermaßen ermittelt: Entsprechend der Herstellerangabe des TaqMan™ PCR Reaction Kit wurde für den PCR-Ansatz zunächst ein Mastermix aus Aqua dest., 10x TaqMan Puffer A, MgCl₂-Lösung, dNTPs, jeweils einem Forward und Reverse Primer für mGAPDH, bzw. mTNF- α (Tab. 1), fluorogener Sonde und den Enzymen AmpliTaq Polymerase und AmpErase UNG (verhindert die Reamplifikation von überschüssigem PCR-Produkt) hergestellt. Nach Zupipettieren der cDNA-Proben für mTNF- α , bzw. mGAPDH zu je 23 μ l Mastermix (pro Ansatz wurden zusätzlich je drei Proben ohne Sonde als Negativkontrollen zur Standardisierung der Fluoreszenzwerte mitanalysiert; „No Template Control“ mit je 4 μ l TE-Puffer) erfolgte die Analyse in der PCR-Maschine. Die jeweiligen Konzentrationen wurden in Vorversuchen optimiert, wobei die Konzentrationen der Primer zwischen 200 und 900 nM, die des Mg²⁺ bei 5,5 – 6 mM und die der cDNA-Proben bei 200 nM lagen. Das PCR-Profil für die Analyse im ABI PRISM 7700 Sequence Detection System bestand nach sorgfältiger Optimierung aus initialer Denaturierung bei 50°C (2 min) und 95°C (10 min), gefolgt von 40 Zyklen der Denaturierung bei 95°C (15 s) und “primer annealing“ bzw. “primer extension“ bei 60°C (60 s) und einem abschließenden Inkubationsschritt bei einer Temperatur von 25°C. Für jeden PCR-Ansatz wurde das Haushaltsgen GAPDH als interner Standard koamplifiziert. Die Validität der Ergebnisse wurde überprüft, indem jede cDNA-Präparation mindestens drei PCR-Reaktionsansätzen unterworfen wurde. Zum Ausschluß falsch positiver Amplifikationsergebnisse wurden routinemäßig Negativkontrollen durchgeführt, indem entsprechende Reaktionsansätze ohne Zugabe von cDNA („No Template“), im übrigen jedoch wie die anderen PCR-Ansätze dem Amplifikationsprozess unterworfen wurden. Ebenso wurden für die Ermittlung des Fluoreszenzhintergrundes Proben ohne Sonde amplifiziert. Zur bildlichen Darstellung wurden Aliquots der PCR-Produkte zusätzlich mit Ethidiumbromid gefärbt, in 1,8%igem Nusieve/Agarosegel bei 75 V für ca. 2 h elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Kodak X667 Film fotografiert. Mittels dieser Technik wurde die TNF- α -Genexpression von separierten peripheren Blutmonozyten, alveolären Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen von mit PKH26 und JE/MCP-1 behandelten Tieren analysiert, ebenso als Negativkontrollen separierte Alveolarmakrophagen

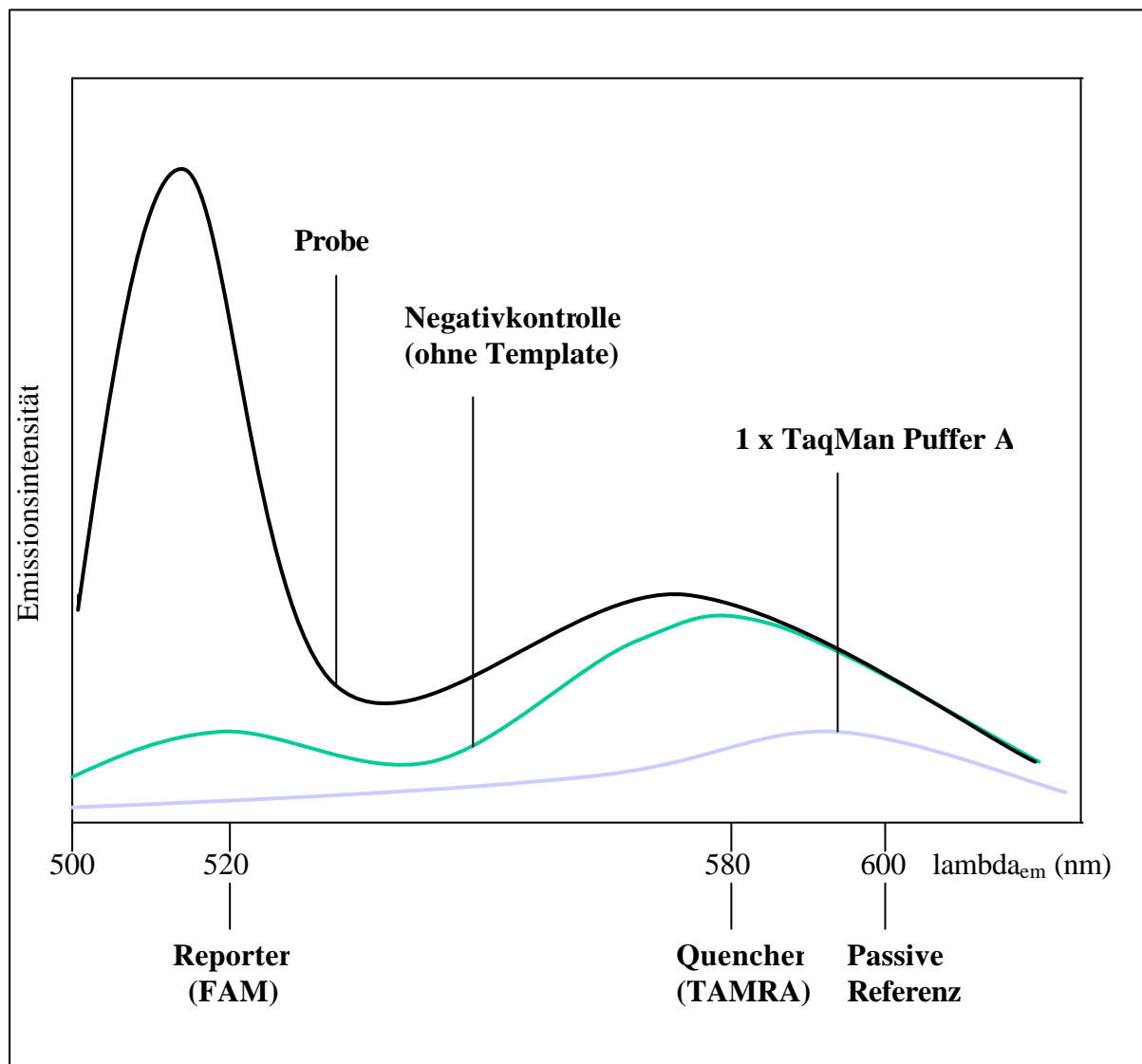


Abbildung 2. Emissionskurven des Reporters, des Quenchers und der „Passiven Referenz“.

von Mäusen, die nur den Farbstoff injiziert oder nur NaCl instilliert bekamen. Separierte Alveolarmakrophagen von Mäusen, denen 20 μg LPS intratracheal appliziert worden war, dienten als Positivkontrollen.

Die Standardisierung von Fluoreszenzschwankungen, wie sie z. B. durch minimale Konzentrationsänderungen zustande kommen können, wurden gemäß folgender Formel berechnet: Die Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes wird dividiert durch die Emissionsintensität der „Passiven Referenz“ (ein Farbstoff, der im 10x Puffer A enthalten ist und nicht am Nukleaseprozess teilnimmt, also einen internen Standard bezüglich des Reporterfarbstoffsignals darstellt). Man erhält so den Wert R_n (normalized reporter) für eine

Probe. Dieser R_n -Wert wird nun für eine Probe ohne cDNA ermittelt (R_n^- , unspezifischer Fluoreszenzhintergrund) und von den jeweiligen R_n^+ -Werten der Proben mit cDNA subtrahiert. Somit ergibt sich der standardisierte Wert ΔR_n für jede Probe:

$$\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-),$$

wobei

$$R_n^+ = \frac{\text{Emissionsintensität des Reporters}}{\text{Emissionsintensität der Passiven Referenz 1}} \quad \text{mit Sonde}$$

$$R_n^- = \frac{\text{Emissionsintensität des Reporters}}{\text{Emissionsintensität der Passiven Referenz 1}} \quad \text{ohne Sonde.}$$

| Spezifität | Primer | Sequenz (5'® 3') | bp |
|----------------|-------------------|------------------------------------|-----|
| mTNF- α | TNF- α -TP | CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG GA | 175 |
| | TNF- α -RV | TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC | |
| | TNF- α -FW | CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A | |
| mGAPDH | GAPDH-TP | TGC ATC CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG | 236 |
| | GAPDH-RV | GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA | |
| | GAPDH-FW | TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC | |

Tabelle 1. Spezifikationen der verwendeten Proben und Primer von TNF- α und Glycerinaldehyd.

2.6 In vitro Kultur peripherer Blutmonozyten, alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen sowie Quantifizierung der TNF- α -Zytokinsekretion

2.6.1 Kultivierung von Alveolarmakrophagen und Monozyten

Um potentielle Nebeneffekte der PKH26-Akkumulation in residenten Alveolarmakrophagen zu evaluieren, wurden residente Alveolarmakrophagen von PKH26-vorbehandelten Mäusen hinsichtlich ihrer LPS-induzierbaren TNF- α -Sekretion mit denen von Tieren, die keine PKH26-Injektion erhalten hatten, verglichen. Hierfür wurden die aus bronchoalveolären Lavagen gewonnenen Alveolarmakrophagen im Durchflußzytometer separiert. Um periphere und alveolär rekrutierte Monozyten hinsichtlich ihrer LPS-induzierbaren TNF- α -Sekretion vor und nach Transmigration zu vergleichen, wurden die Zellen ebenfalls separiert und die jeweiligen Zellpopulationen in RPMI-Medium, das mit 10% FCS supplementiert wurde, kultiviert. Es wurden jeweils 2×10^5 Alveolarmakrophagen/ml und 2×10^4 Blut- bzw. rekrutierte Monozyten/ml (diese stammten vom selben Tier) von Mäusen mit und ohne PKH26 in 24 Well Polystyren Kulturplatten bei 37°C/5%CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre 4 h lang ohne Stimulation oder mit 1 ng/ml *Salmonella abortus equi* Endotoxin inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellkulturüberstände abpipetiert, die zellulären Bestandteile mittels Zentrifugation abgetrennt (2 min bei 15 000 rpm) und die zellfreien Kulturüberstände in 500 μ l Aliquots bis zur Quantifizierung der Zytokinkonzentrationen bei – 86°C gelagert.

2.6.2 Quantifizierung der Zytokinsekretion peripherer Blutmonozyten, alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen mittels ELISA

Die Quantifizierung des sezernierten murinen TNF- α -Proteins in den Kulturüberständen der unstimulierten und LPS-stimulierten Blutmonozyten, alveolären Monozyten und Alveolarmakrophagen von mit PKH26 und JE/MCP-1 vorbehandelten Mäusen wurde mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits (enzyme-linked immunosorbent assay) durchgeführt. Mittels ELISA können Proteinmengen in Kulturüberständen oder Seren genau bestimmt werden. Hierfür werden mit dem jeweiligen Antikörper gegen das zu bestimmende Protein

beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Das zugegebene Protein wird von diesem Antikörper gebunden. Anschließend wird ein zweiter, mit einem Enzym gekoppelter Antikörper zugegeben, der wiederum an das zu analysierende Protein bindet. Nun wird das zum Enzym passende Substrat, gebunden an ein Chromogen, zugegeben, die Reaktion nach einer bestimmten Zeit gestoppt und die Farbintensität der jeweiligen Probe in einem Photometer gemessen. Sie verhält sich proportional zur Proteinmenge. Um die genaue Menge an Protein zu ermitteln, wurden Standardkurven durch serielle Verdünnung von vorgegebenen Proteinkonzentrationen erstellt.

Es wurden vom Hersteller mit polyklonalen Maus TNF- α -Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten verwendet, welche pro Well zunächst mit 50 μ l eines Caseinpuffers (0,2% w/v in PBS) zur Absättigung unspezifischer Bindungen beschichtet wurden. Nun wurden je 50 μ l des jeweiligen Kulturüberstandes, jeweils seriell im Verhältnis 1:2 verdünntes rekombinantes Protein als Standard oder unverdünntes rekombinantes Protein als Positivkontrolle zugegeben und nach vorsichtigem Mischen für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Bindung des Proteins an den in der Platte vorbeschichteten "capture-Antikörper", wurde nicht gebundenes Reagens in fünf Waschschritten unter Zuhilfenahme eines ELISA-Washers und Waschpuffer (0,05% v/v Tween 20 in Aqua dest.) entfernt. Anschließend wurden in jedes Well je 100 μ l TNF- α -Antikörper, konjugiert mit dem Enzym HRP (horse radish peroxidase), zugegeben und die Platten wieder für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgten erneute Waschschrritte mit dem entsprechenden Waschpuffer. Abschließend erfolgte die Detektion des gebundenen Enzyms durch eine 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit je 100 μ l der Substratlösung, die zu gleichen Anteilen das Reagens A (Wasserstoffperoxid, H₂O₂) und Reagens B (das Chromogen Tetramethylbenzidin) enthielt. Zuletzt wurden je 100 μ l einer die Reaktion beendenden Salzsäure zugegeben. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 405 nm unter Verwendung eines ELISA-Plattenphotometers. Die untere bzw. obere Nachweisgrenze des Zytokinassays lag bei 5 bzw. 1000 pg Protein pro ml Kulturüberstand. Die Quantifizierung der jeweiligen Proteine wurden pro Versuchsansatz in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.7 STATISTIK

Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert \pm SEM. Die statistischen Erhebungen wurden unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes SPSS[®] für MS Windows[®] durchgeführt. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Dosis- und Zeitabhängigkeit der Akkumulation von PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen

Residente Alveolarmakrophagen von Kontrollmäusen, welchen lediglich PBS/HSA intratracheal instilliert wurde, zeigten in der durchflußzytometrischen Analyse eine niedrige Autofluoreszenz bei 575 nm (Fluoreszenz 2; Abb. 3A). Die intravenöse Injektion des lipophilen rotfluoreszenten Farbstoffes PKH26 führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Akkumulation des Farbstoffes in residenten Alveolarmakrophagen und konnte anhand der steigenden Rotfluoreszenzemission dieser Zellpopulation evaluiert werden (Abb. 3B-F). Die höchste Rotfluoreszenzemission zeigten residente Alveolarmakrophagen von Mäusen mit einer in vivo Konzentration von 15 μ M PKH26 (Abb. 3F).

Es ließ sich durchflußzytometrisch auch eine Zeitabhängigkeit der Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen nachweisen. Bereits nach 6 h zeigte sich eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz 2-Emission residenter Alveolarmakrophagen nach intravenöser Applikation von PKH26 bei einer in vivo Konzentration von 15 μ M, welche ihr Maximum nach 24 h fand und auch nach 48 h und 72 h nicht weiter signifikant anstieg (Abb. 4A-E).

Die durchflußzytometrisch gemessene Steigerung der Fluoreszenz 2-Emission von residenten Alveolarmakrophagen nach Injektion von PKH26 konnte auch immunfluoreszenzmikroskopisch verifiziert werden und ging mit einer intrazellulären Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes einher (Abb. 5).

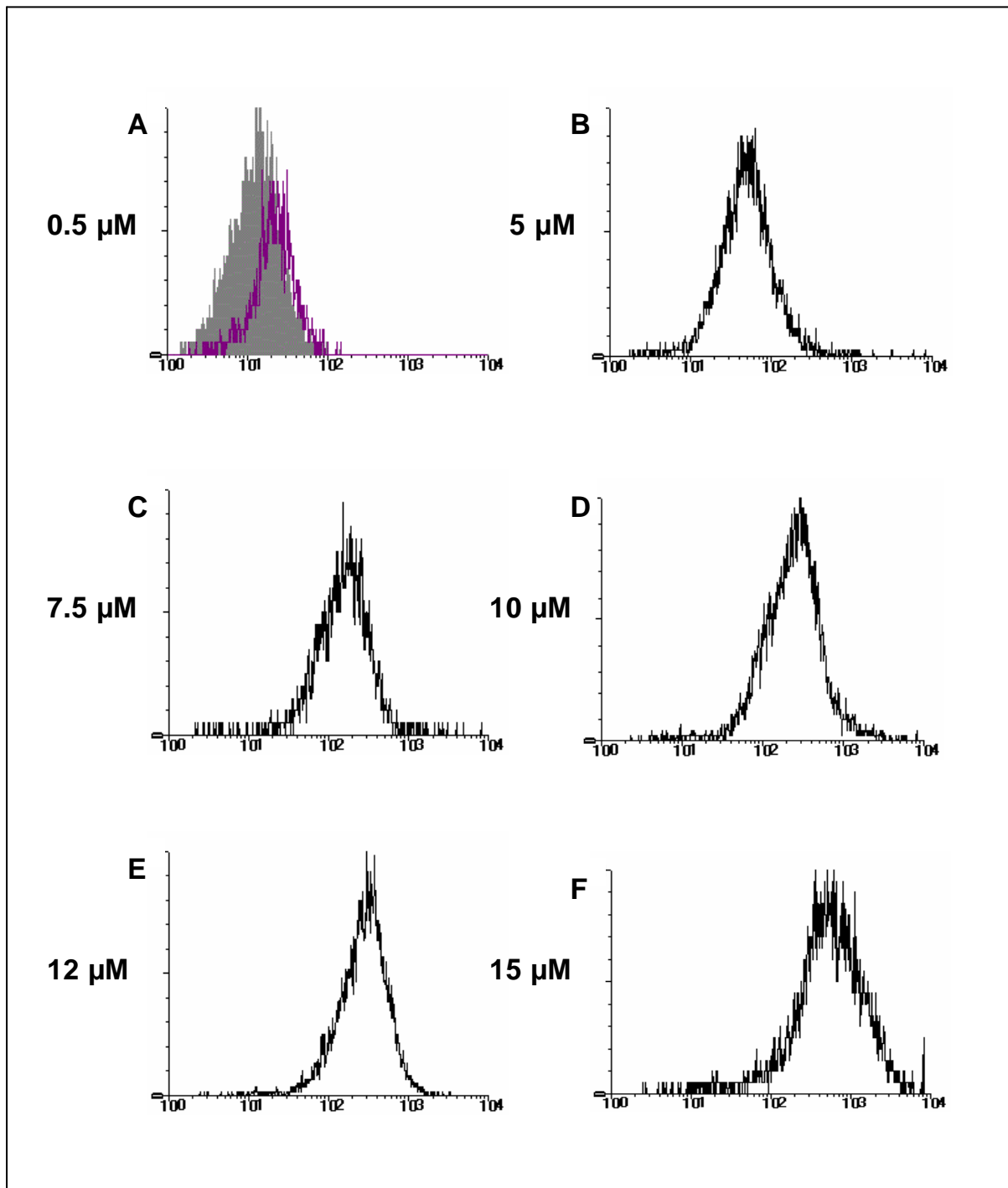


Abbildung 3A-F. Dosisabhängige Akkumulation von PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen. Die X-Achse zeigt die Intensität der Rotfluoreszenz (F488/575 nm; logarithmische Skalierung) der Alveolarmakrophagen (weiße Histogramme) gegenüber der Negativkontrolle (residente Alveolarmakrophagen von Mäusen nach intratrachealer Instillation von PBS/HSA; graues Histogramm in 3A mit niedriger Fluoreszenzintensität). Die Y-Achse zeigt die relativen Zellzahlen (lineare Skalierung).

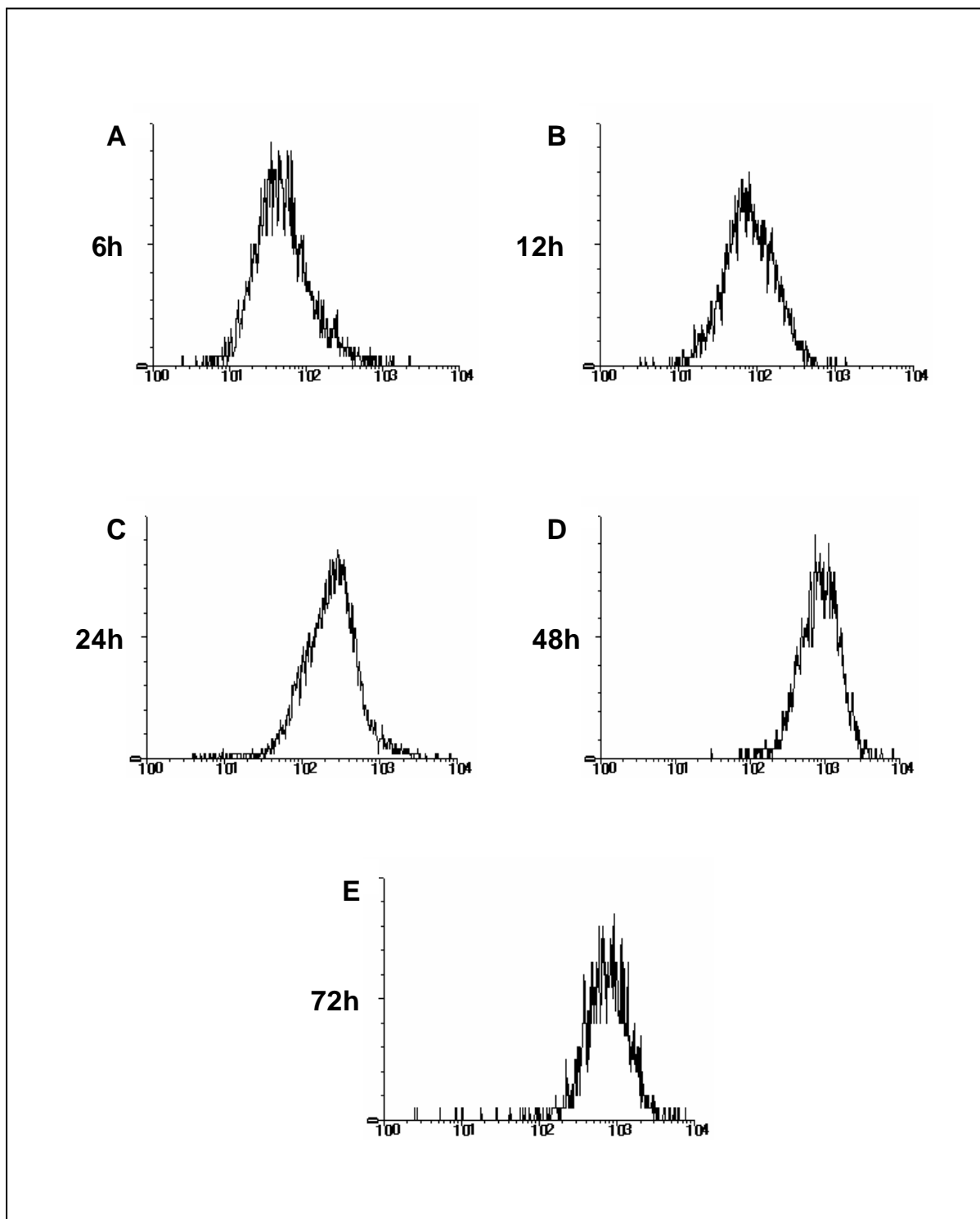


Abbildung 4A-E. Zeitabhängige Akkumulation von PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen. Die X-Achse zeigt die Intensität der Rotfluoreszenz (F488/575 nm; logarithmische Skalierung) und die Y-Achse die relativen Zellzahlen (lineare Skalierung).

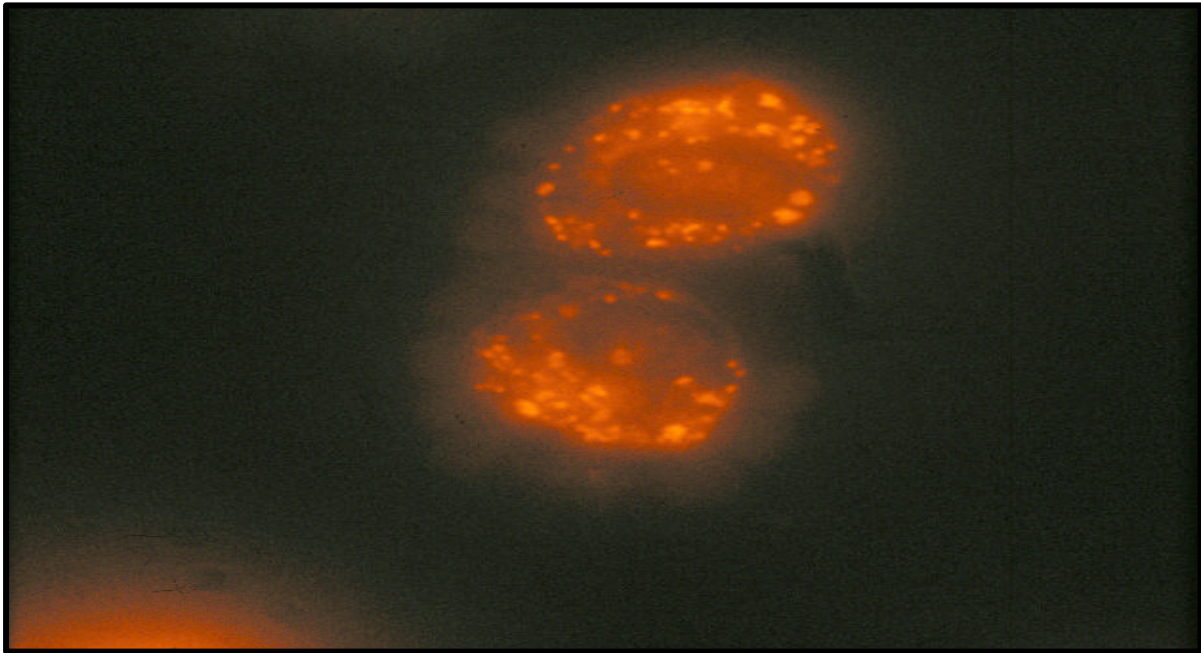


Abbildung 5. Fluoreszenzmikroskopisches Bild von PKH26-gefärbten Alveolarmakrophagen (15 μ M; 24 h).

Um auszuschließen, daß die Akkumulation von PKH26 die LPS-Induzierbarkeit residenter Alveolarmakrophagen als wichtige zelluläre Funktion beeinflusst, wurden Alveolarmakrophagen von Kontrollmäusen (PBS/HSA-Instillation) und Alveolarmakrophagen von Mäusen nach PKH26-Injektion (15 μ M in vivo Konzentration) durchflußzytometrisch separiert (Reinheitsgrad > 96%), in vitro mit LPS stimuliert und ihre TNF- α -Sekretion ermittelt. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede der basalen und LPS-induzierten TNF- α -Sekretion zwischen residenten Alveolarmakrophagen von PKH26-vorbehandelten Mäusen und Negativkontrollen (Abb. 6).

Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurden eine in vivo PKH26-Konzentration von 15 μ M und ein Zeitintervall von 24 h für die Intravitalfärbung residenter Alveolarmakrophagen angewandt.

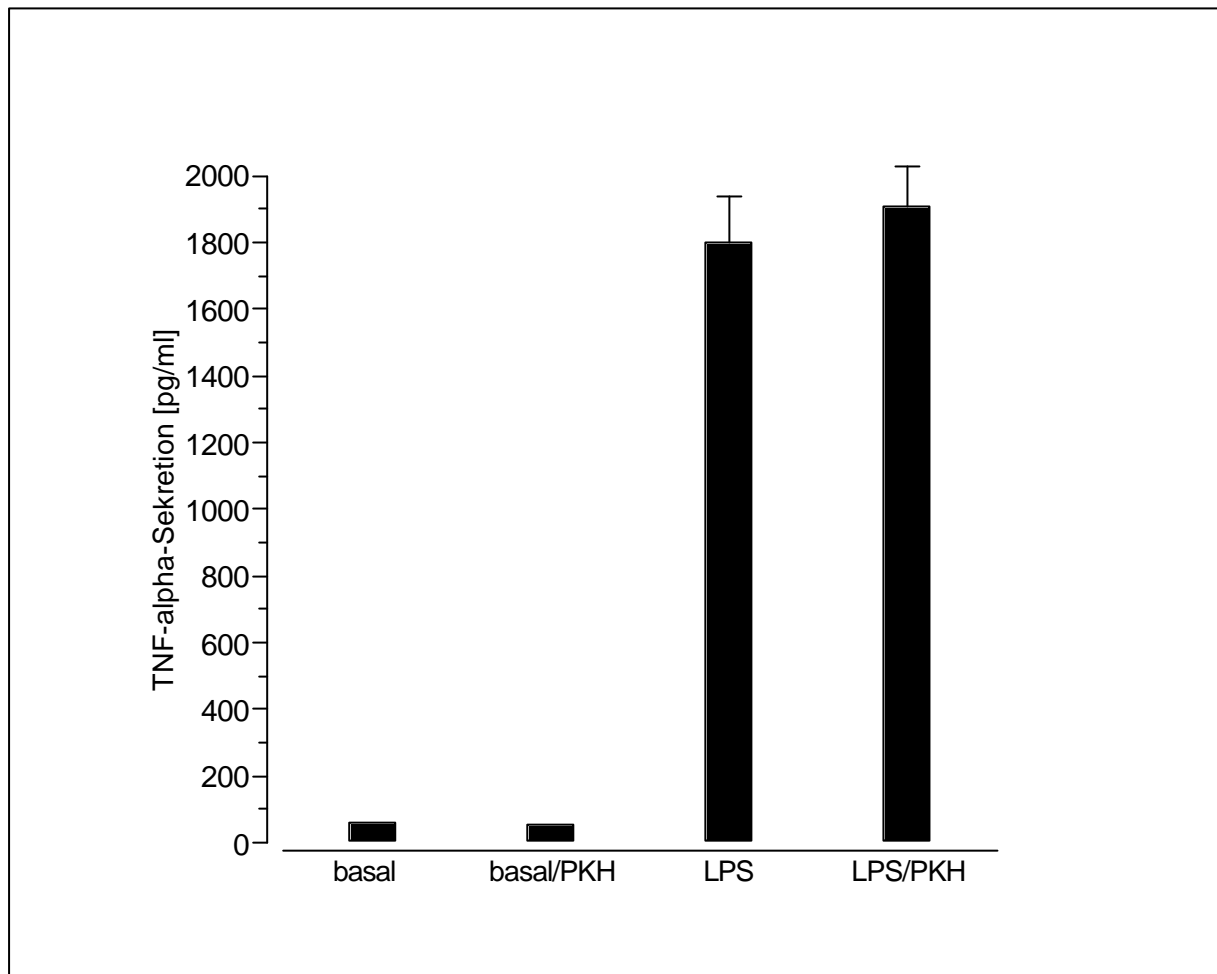


Abbildung 6. Vergleich der basalen und LPS-induzierten TNF- α -Sekretion von separierten Alveolarmakrophagen mit und ohne PKH26-Injektion (15 μ M; 24 h).

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde ausgeschlossen, daß PKH26 einen Einfluß auf die Morphologie des Lungengewebes hat. Hierfür wurden Paraffin-eingebettete Lungenschnitte von Mäusen, die PKH26 intravenös erhalten hatten (15 μ M in vivo Konzentration, Abb. 7B), mit Schnitten von Kontrollmäusen (NaCl i.v.) verglichen (Abb. 7A). Die zellulären Strukturen der jeweiligen Paraffinschnitte unterschieden sich hierbei nicht.

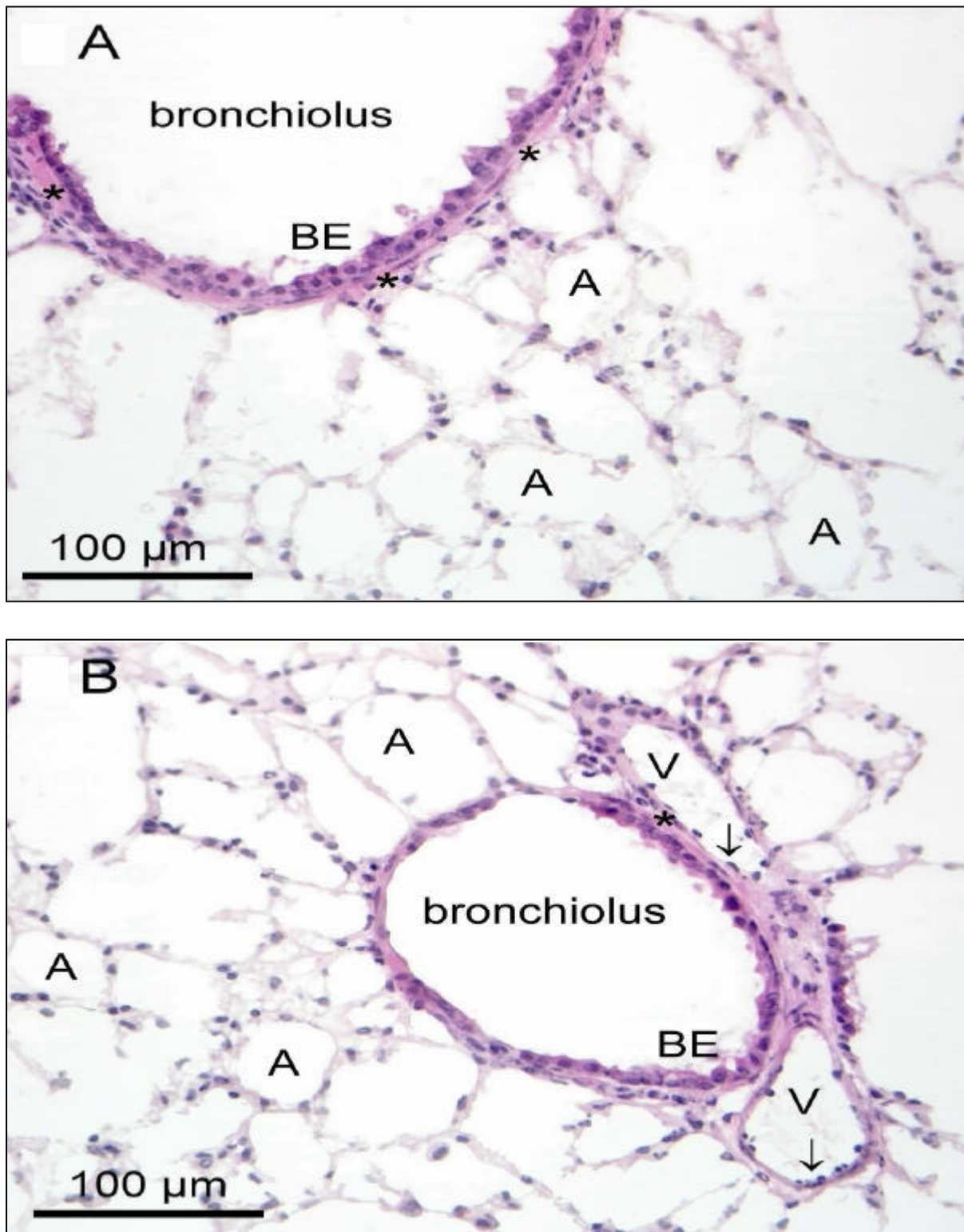


Abbildung 7. Histologie der Lungenschnitte von Kontrollmäusen (A; NaCl i.v.) und Mäusen nach PKH26-Injektion (B; 15mM; 24 h). HE-Färbung: A=Alveole; BE =Bronchialepithel; V = Gefäßlumen; * = glatte Muskelzelle; → = Endothelzelle.

3.2 Auszählung und zytologische Differenzierung der bronchoalveolären Lavage von Kontrollmäusen, Mäusen mit PKH26-Injektion und Mäusen mit JE/MCP-1-Instillation

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer, die zytologische Differenzierung der mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnenen Zellen im Zytozentrifugenpräparat nach Pappenheimfärbung. Bei Kontrollmäusen, sowie Mäusen mit PKH26-Injektion fand sich eine durchschnittliche Gesamtzahl von ~ 560 000 Leukozyten/BAL. Die zytologische Differenzierung ergab $91 \pm 3\%$ residente Alveolarmakrophagen, $4 \pm 2\%$ CD4-positive Lymphozyten, jedoch keine Monozyten. Die intratracheale Instillation von JE/MCP-1 führte zu einer signifikanten Steigerung der Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage. 48 h nach intratrachealer Instillation von JE/MCP-1 fanden sich ~ 1 700 000 Zellen mit $54 \pm 5\%$ residenten Alveolarmakrophagen und einem signifikant gesteigerten Anteil an alveolären Monozyten ($26 \pm 4\%$; $p < 0,05$) sowie CD4-positiven Lymphozyten ($16 \pm 3\%$; Tab. 2).

| Vorbehandlung | Zellzahlen | rAM (%) | Alv-Mo (%) | Ly (%) |
|-------------------------|------------|------------|-------------------|------------|
| 0,9% NaCl | 560 000 | 92 ± 3 | 0 | 4 ± 2 |
| PKH26 | 565 000 | 91 ± 3 | 0 | 4 ± 2 |
| PKH26 plus MCP-1 | 1 650 000 | 54 ± 5 | (*) 26 ± 4 | 16 ± 3 |

Tabelle 2. Zelluläre Komponenten in Lavageflüssigkeiten von Kontrollmäusen (PKH26) und Mäusen, die zusätzlich rJE/MCP-1 erhielten. Die angegebenen Prozentwerte sind Mittelwerte \pm SEM. (*) = $p < 0,05$ versus Kontrolle.

3.3 Rekrutierung von Monozyten in den Alveolarraum und ihre Diskriminierung von residenten Alveolarmakrophagen

3.3.1 Rekrutierung von Monozyten durch intratracheale Instillation von JE/MCP-1

Aufgrund der Erkenntnis, daß der intravenös applizierbare Fluoreszenzfarbstoff PKH26 dosis- und zeitabhängig in residenten Alveolarmakrophagen akkumulierte (vgl. Abb. 8A, B), nicht jedoch in zirkulierenden peripheren Blutleukozyten, gelang die durchflußzytometrische Diskriminierung neu rekrutierter Monozyten und Lymphozyten von residenten Alveolarmakrophagen. Die intratracheale Instillation von JE/MCP-1 führte zu einer starken Akkumulation von frisch rekrutierten Monozyten und zu geringerem Umfang von CD4-positiven Lymphozyten im Alveolarraum solcherart vorbehandelter Mäuse (Abb. 8C). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz 2-Charakteristika konnten neu rekrutierte Monozyten, Lymphozyten und residente Alveolarmakrophagen leicht im Durchflußzytometer abgegrenzt werden (Abb. 8C). Der Monozyten-/Makrophagen-spezifischen Marker F4/80 ließ sich auf den frisch rekrutierten Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen, nicht aber auf der Lymphozytenpopulation immunphänotypisch nachweisen (Abb. 8D).

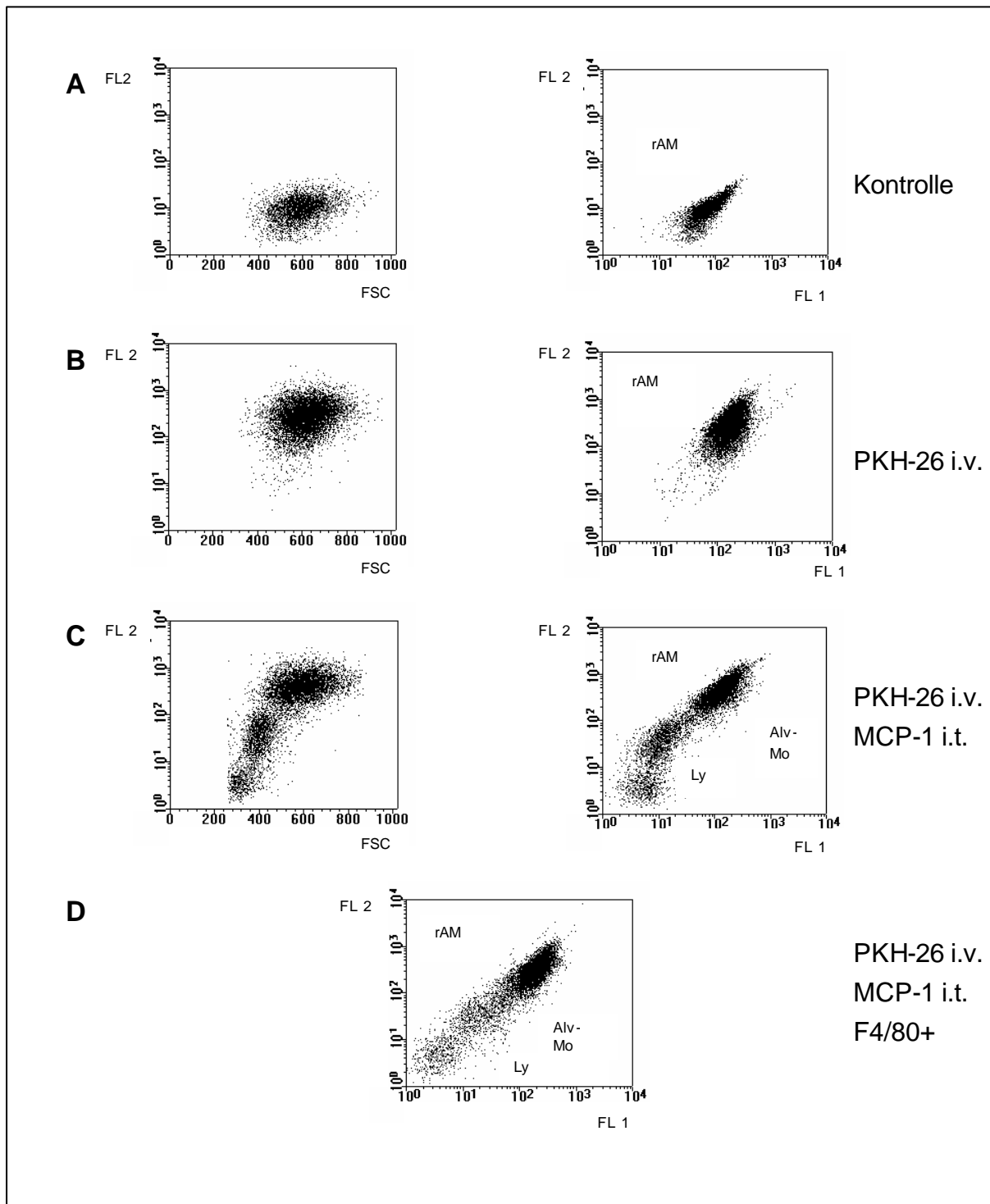


Abbildung 8A-D. Akkumulation von Monozyten im Alveolarraum nach intratrachealer Instillation von JE/MCP-1. Die X-Achse zeigt jeweils die FL 1-Intensitäten (F488/535 nm, logarithmische Skalierung), bzw. den FSC (lineare Skalierung); die Y-Achse zeigt die Fluoreszenz 2-Intensitäten in logarithmischer Skalierung.

3.3.2 Nachweis über die Herkunft alveolär rekrutierter Monozyten

Um zu überprüfen, ob nach intratrachealer Instillation von JE/MCP-1 im Alveolarraum akkumulierende Monozyten aus dem zirkulierenden Leukozytenpool stammten, wurden periphere Blutleukozyten von Spendermäusen isoliert, in vitro mit PKH26 markiert und in Empfängermause reinjiziert. Dabei zeigte sich bei Kontrollmäusen nach intravenöser Reinjektion PKH26-positiver Leukozyten ohne intratracheale PKH26-Instillation im Vergleich zu Mäusen mit JE/MCP-1-Instillation ohne Injektion PKH26-gefärbter Leukozyten jeweils nur eine basale FL 2-Emission der BAL-Zellen. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei Tieren, die gleichzeitig intratracheal JE/MCP-1 und intravenös PKH26-gefärbte Leukozyten erhielten, signifikant erhöhte FL 2-Emissionswerte der durchflußzytometrisch analysierten Leukozyten. Diese Daten demonstrieren, daß die mittels alveolärer Deposition von JE/MCP-1 in den Alveolarraum rekrutierten Monozyten aus dem zirkulierenden Pool peripherer Blutleukozyten rekrutiert wurden (Abb. 9).

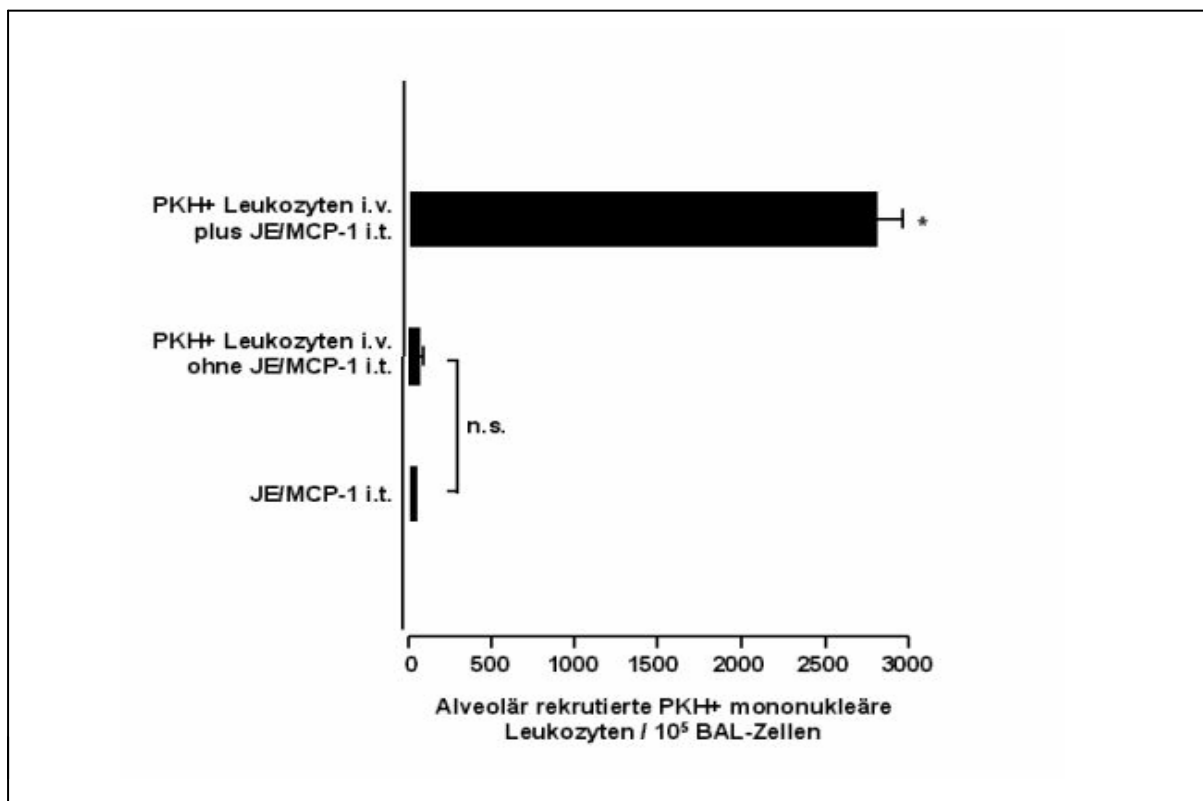


Abbildung 9. Anzahl der alveolär rekrutierten PKH26-positiven mononukleären Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit von Empfängermausen.

3.3.3 Intratracheale Instillation von MIP-1 α und RANTES

Um die Spezifität von JE/MCP-1 als Monozyten-rekrutierendes Chemokin im Vergleich zu anderen CC-Chemokinen zu evaluieren, wurden Mäusen nach PKH26-Injektion jeweils 50 μ g MIP-1 α bzw. RANTES intratracheal instilliert. Es zeigte sich, daß für das jeweilige Chemokin spezifische Leukozytenrekrutierungsprofile beobachtet werden konnten: Im Gegensatz zu JE/MCP-1 bewirkte die Gabe von MIP-1 α vorwiegend eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum, wobei der Anteil der rekrutierten Monozyten nur ca. 6% ausmachte (Abb. 10). Die intratracheale Instillation von RANTES induzierte primär einen Influx von CD4-positiven T-Lymphozyten, der Monozytenanteil lag hingegen nur bei ca. 2% (Abb. 10). Diese Daten belegen, daß JE/MCP-1 verglichen mit anderen CC-Chemokinen das stärkste Potential zur Monozytenrekrutierung in den Alveolarraum in vivo beigemessen werden kann.

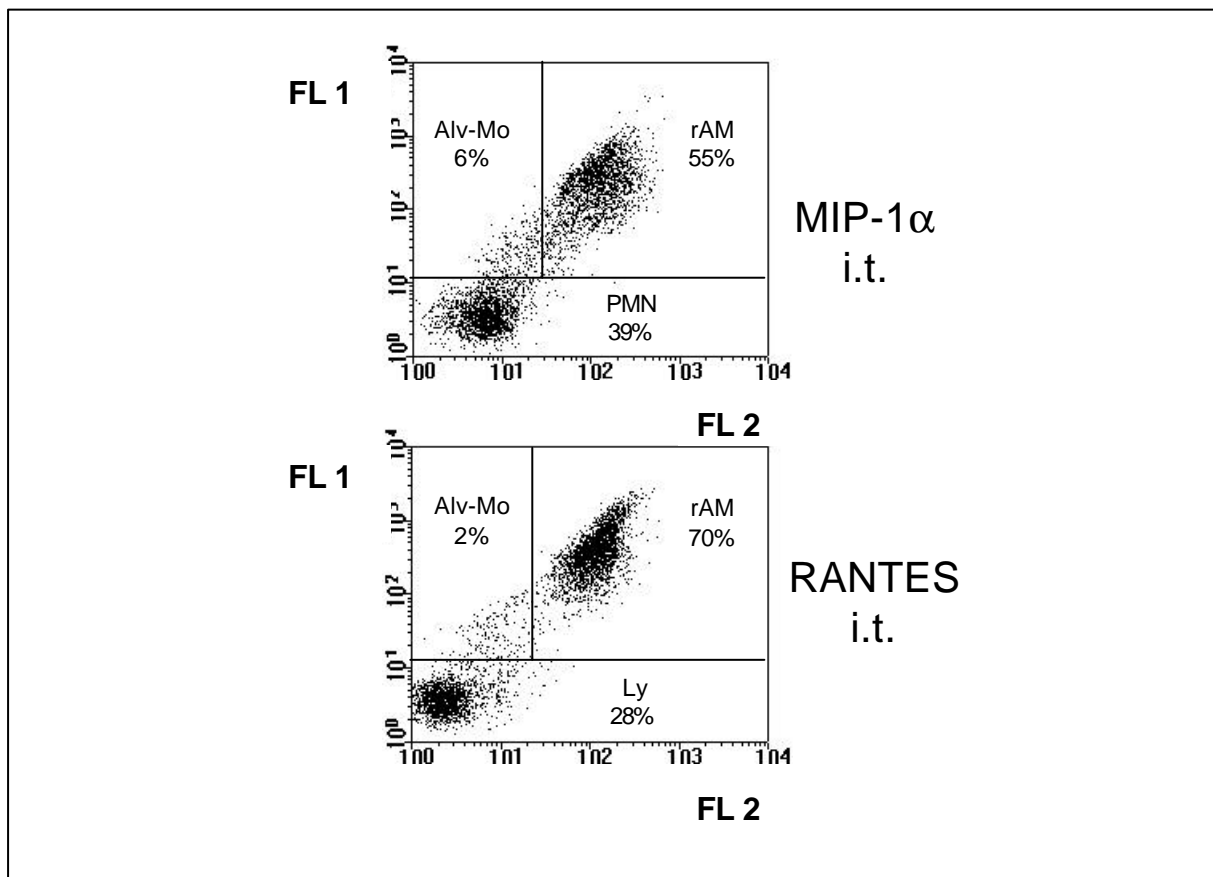


Abbildung 10. Durchflußzytometrische Analyse der Leukozytenpopulationen aus der BAL-Flüssigkeit von Mäusen nach intratrachealer Gabe von MIP-1 α bzw. RANTES.

3.4 Morphometrische Quantifizierung von Leukozyten in histologischen Lungenpräparaten

Um die genauere Lokalisation der mittels JE/MCP-1 rekrutierten Leukozyten im Lungengewebe zu ermitteln, wurden Lungen-Kryoschnitte von Mäusen untersucht, denen entweder nur der Farbstoff PKH26 intravenös appliziert oder zusätzlich JE/MCP-1 intratracheal instilliert wurde. Von jeder entnommenen Lunge wurde die Verteilung der rekrutierten Leukozyten im Lungengewebe bestimmt. Untersucht wurden vier Kompartimente: das peribronchiale und das perivaskuläre Kompartiment sowie das alveoläre und das Septum-Kompartiment. Dabei wurde in den Lungenschnitten von Mäusen mit PKH26-Injektion und JE/MCP-1-Instillation im Vergleich zu Tieren mit alleiniger PKH26-Injektion die größte Leukozytenakkumulation im Alveolarraum ermittelt (Abb. 11A) und gleichzeitig gegenüber Kontrollmäusen eine signifikant gesenkte Anzahl CD45-positiver Leukozyten im Septumkompartiment beobachtet (Abb. 11B). Im perivaskulären und peribronchialen Kompartiment PKH26- bzw. PKH26- und JE/MCP-1-behandelter Mäuse zeigte sich keine signifikant differierende Anzahl CD45-positiver Leukozyten (Abb. 11C-D). Diese Daten zeigen, daß die intratracheale Instillation von JE/MCP-1 primär zu einer intraalveolären Leukozytenrekrutierung führt, wobei auch zu geringem Anteil interstitiell lokalisierte Leukozyten über die alveoloepitheliale Barriere ko-rekrutiert werden.

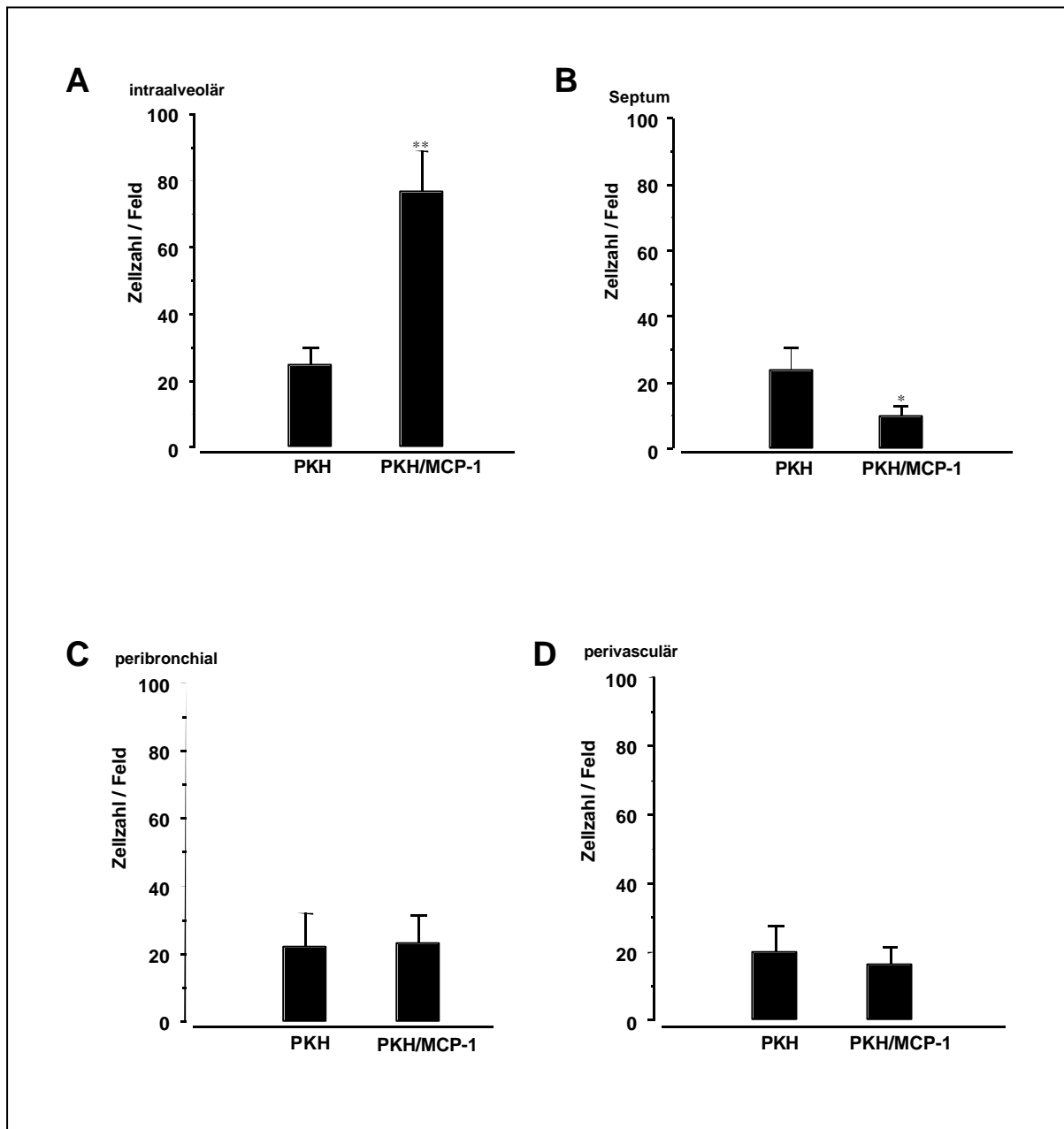


Abbildung 11A-D. Verteilung der mit JE/MCP-1 in die Lunge von Mäusen rekrutierten CD45-positiven Leukozyten im intraalveolären (A), septalen (B), peribronchialen (C) und perivascularären (D) Kompartiment.

3.5 Immunphänotypisches Profil von peripheren Blutmonozyten, alveolär rekrutierten Monozyten und residenten Alveolarmakrophagen

Die aus der bronchoalveolären Lavage 48 h nach JE/MCP-1-Instillation gewonnenen rekrutierten Monozyten und sessilen Alveolarmakrophagen wurden hinsichtlich ihres Antigenprofils durchflußzytometrisch analysiert und mit dem Antigenprofil der peripheren Blutmonozyten verglichen. Dabei wurde die Expression des Monozyten-/Makrophagen-Markers F4/80, des β_1 -Integrins CD49d, der β_2 -Integrine CD11a/CD18 und CD11b/CD18, des LPS/LBP-Rezeptors CD14 und des Leukozytenselektins CD62L evaluiert. Für die β_1 - und β_2 -Integrine ist eine Beteiligung an Rekrutierungsprozessen von Monozyten aus dem Intravasalraum ins Gewebe mehrfach gezeigt worden [70, 80, 122, 154].

Abb. 12A zeigt, daß sowohl periphere Blutmonozyten wie auch alveolär rekrutierte Monozyten und residente Alveolarmakrophagen den Monozyten/Makrophagen-spezifischen Marker F4/80 exprimieren. Ebenso findet sich eine regelhafte Expression des β_2 -Integrins CD11a/CD18 auf allen drei analysierten Zellpopulationen, wohingegen das β_2 -Integrin CD11b/CD18 sowie das β_1 -Integrin CD49d und das Selektin CD62L auf peripheren Blutmonozyten und alveolär rekrutierten Monozyten exprimiert waren, nicht jedoch auf residenten Alveolarmakrophagen (Abb. 12C-G). Interessanterweise zeigte sich, daß bei allen durchgeführten Analysen eine stark ausgeprägte Expression von CD14 auf frisch rekrutierten alveolären Monozyten nachgewiesen werden konnte, wohingegen aus dem Blut isolierte Monozyten sowie residente Alveolarmakrophagen keine CD14-Expression aufwiesen (Abb. 12B).

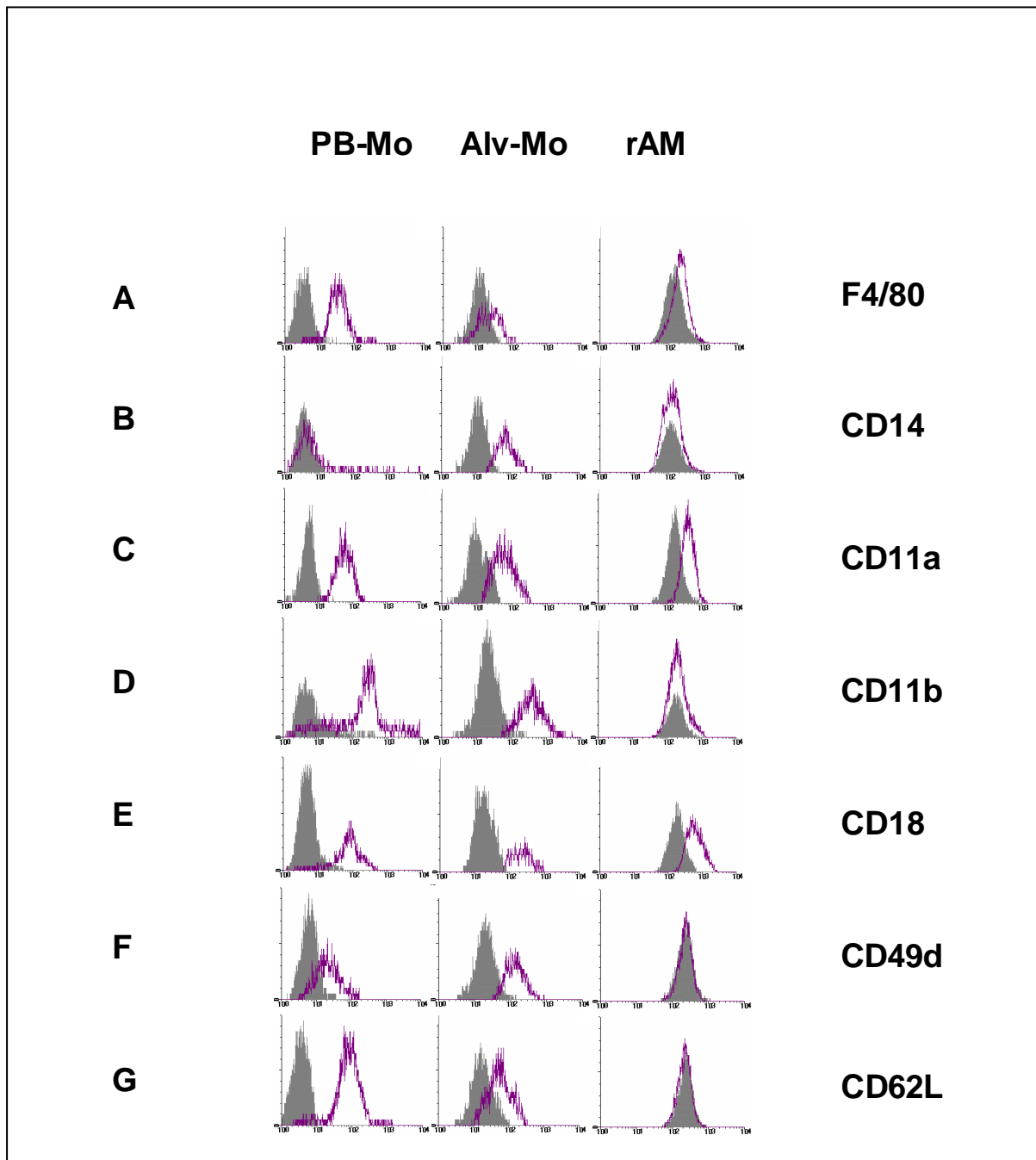


Abbildung 12A-G. Antigenprofil von peripheren Blutmonozyten (PB-Mo), alveolär rekrutierten Monozyten (Alv-Mo) und residenten Alveolarmakrophagen (rAM) von Mäusen nach PKH26- und JE/MCP-1-Applikation. Die linken Histogramme zeigen die FL 2-Intensitäten (F488/575 nm) der Negativkontrollen (unmarkiert; grau) und die spezifische Antigenexpression (weiß) auf der X-Achse (logarithmische Skalierung) und die relativen Zellzahlen auf der Y-Achse (lineare Skalierung). Die mittleren und rechten Histogramme zeigen entsprechend die FL 1-Intensitäten (F488/535 nm) auf der X-Achse.

3.6 Durchflußzytometrische Separation peripherer Blutmonozyten, alveolär rekrutierter Monozyten und residenter Alveolarmakrophagen zur Analyse der TNF- α -Zytokingenexpression und –Proteinsekretion

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden CD14-positive alveolär rekrutierte Monozyten (nach Transmigration) sowie CD14-negative periphere Blutmonozyten (vor Transmigration) einer Analyse der spontanen TNF- α -Genexpression unterzogen und diese mit der von residenten Alveolarmakrophagen verglichen. Hierfür wurden alveolär rekrutierte Monozyten und residente Alveolarmakrophagen aus BAL-Proben von Mäusen nach PKH26-Injektion und JE/MCP-1-Instillation, sowie periphere Blutmonozyten des selben Tieres einer FACS-Separation unterworfen. Ebenso wurden residente Alveolarmakrophagen von Kontrollmäusen (PBS/HSA-Instillation) und Tieren nach alleiniger PKH26-Injektion aus BAL-Proben separiert. Abbildung 13 illustriert eine repräsentative Separation von Alveolarmakrophagen und alveolären Monozyten aus der BAL-Flüssigkeit einer Maus nach PKH26- und JE/MCP-1-Gabe. Die durchflußzytometrische Separation dieser Zellpopulationen mit Hilfe der unterschiedlichen Fluoreszenz 1- und 2-Charakteristika der alveolär rekrutierten Monozyten, peripheren Blutmonozyten, residenten Alveolarmakrophagen und Lymphozyten lieferte > 96% aufgereinigte Zellpopulationen.

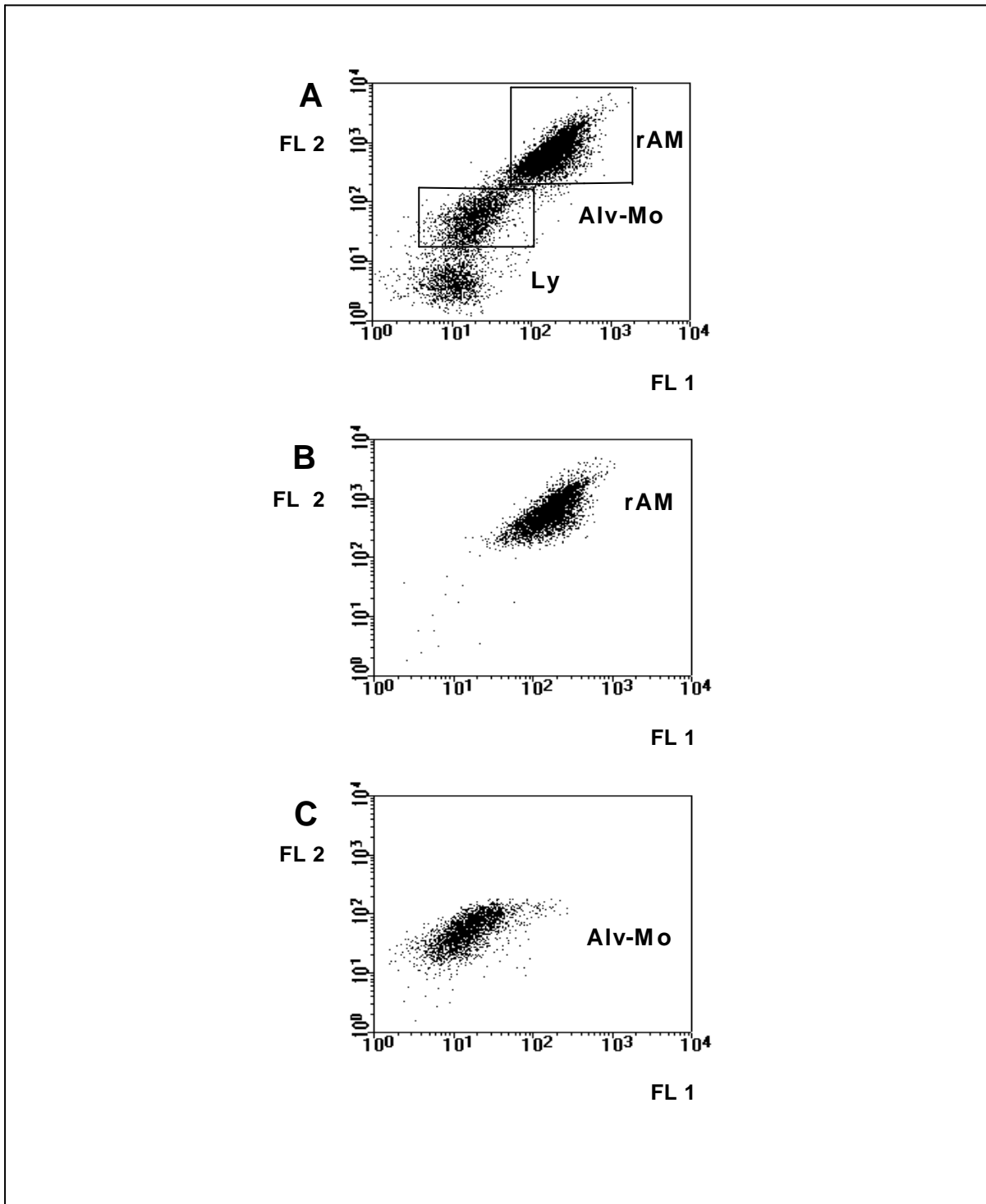


Abbildung 13A-C. Durchflußzytometrische Zellseparation von alveolär rekrutierten Monozyten und Alveolarmakrophagen. Die Dot plot-Diagramme zeigen ein repräsentatives Separationsexperiment mit den FL 1- Charakteristika (F488/535 nm) auf der X-Achse und den FL 2-Charakteristika (F488/575 nm; PKH26-Fluoreszenz) auf der Y-Achse.

3.6.1 Quantifizierung der TNF- α -Genexpression

Aus der gesteigerten Expression des LPS/LBP-Rezeptors CD14 auf alveolär rekrutierten Monozyten ergab sich die Fragestellung, ob diese Zellpopulation auch weitere Akute-Phase-Genprodukte wie TNF- α verstärkt in vivo exprimiert. Zur Quantifizierung der TNF- α -Genexpression wurden periphere Blutmonozyten, alveolär rekrutierte Monozyten und residente Alveolarmakrophagen vom selben Tier nach PKH26-Injektion und JE/MCP-1-Instillation durchflußzytometrisch separiert und mit Alveolarmakrophagen von Mäusen nach Applikation von PKH26 oder PBS/HSA als Negativkontrolle mittels real-time-PCR-Analytik verglichen. Als Positivkontrolle dienten durchflußzytometrisch separierte Alveolarmakrophagen LPS-stimulierter, PKH26-behandelter Mäuse. Es zeigte sich, daß weder residente Alveolarmakrophagen noch periphere Blutmonozyten PKH26- und JE/MCP-1-behandelter Mäuse eine signifikant erhöhte TNF- α -Genexpression im Vergleich zu residenten Alveolarmakrophagen von Negativkontrollmäusen, bzw. PKH26-behandelten Tieren aufwiesen. Im Vergleich zu peripheren Blutmonozyten und residenten Alveolarmakrophagen zeigte sich interessanterweise jedoch eine signifikant erhöhte TNF- α -Genexpression bei alveolär rekrutierten Monozyten vom selben Tier (Abb. 14).

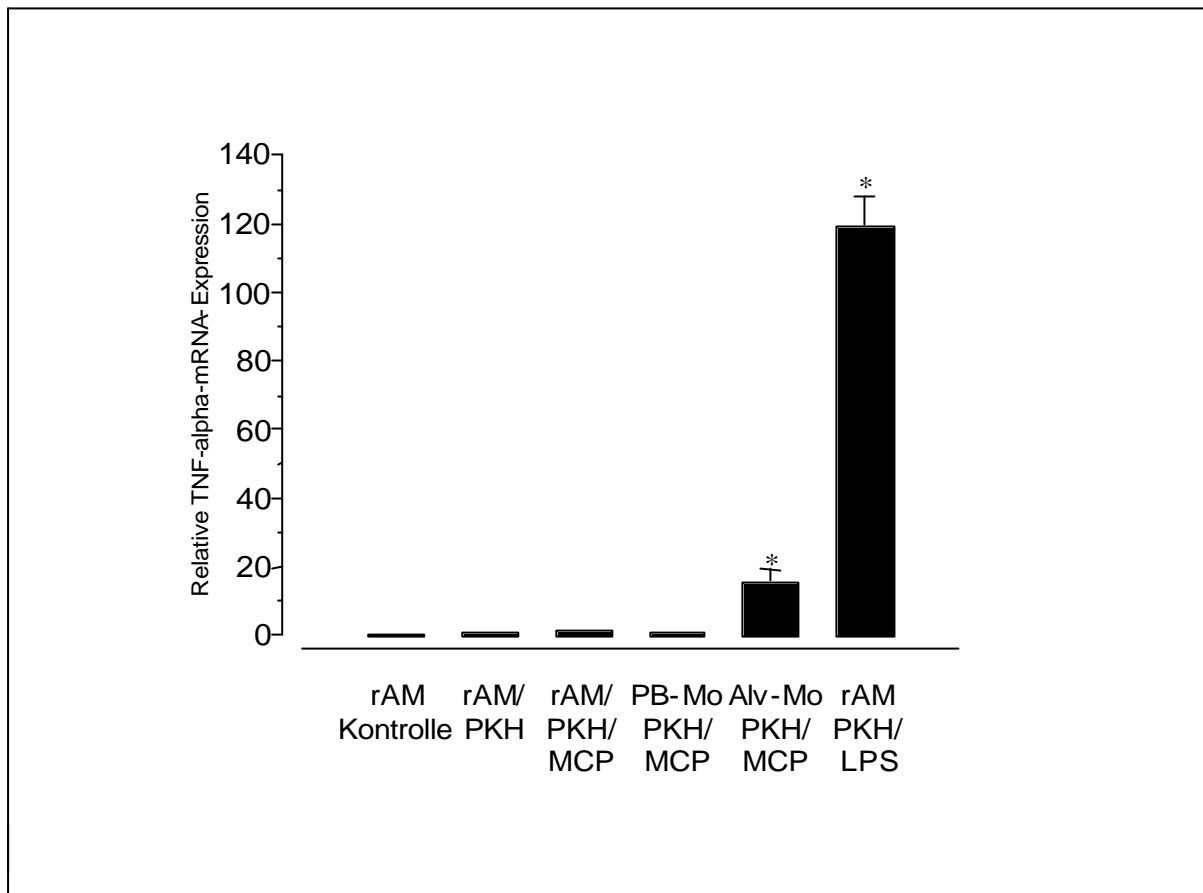


Abbildung 14. RT-PCR-Analyse der TNF- α -Genexpression von residenten Alveolarmakrophagen von Kontrollmäusen und Mäusen nach PKH26-Injektion, von alveolär rekrutierten Monozyten, peripheren Blutmonozyten und residenten Alveolarmakrophagen nach PKH26- und JE/MCP-1-Gabe vom selben Tier und von residenten Alveolarmakrophagen von Positivkontrollen.

3.6.2 Evaluierung der funktionellen Relevanz gesteigerter CD14-Expression auf alveolär rekrutierten Monozyten

Um die funktionelle Bedeutung der erhöhten CD14-Expression auf alveolär rekrutierten Monozyten im Vergleich zu den CD14-negativen zirkulierenden Blutmonozyten zu analysieren, wurden beide Zellpopulationen aus dem selben Tier durchflußzytometrisch separiert, in vitro für 4 h mit 1 ng/ml LPS stimuliert und ihre TNF- α -Sekretion im ELISA quantifiziert (Abb. 15). Die CD14-positiven alveolär rekrutierten Monozyten zeigten hierbei eine annähernd vierfach höhere TNF- α -Liberierung als Antwort auf die LPS-Stimulation im Vergleich zu CD14-negativen peripheren Blutmonozyten. Dies zeigt, daß alveolär rekrutierte CD14-positive Monozyten eine höhere Endotoxininduzierbarkeit zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine aufweisen als CD14-negative zirkulierende Blutmonozyten.

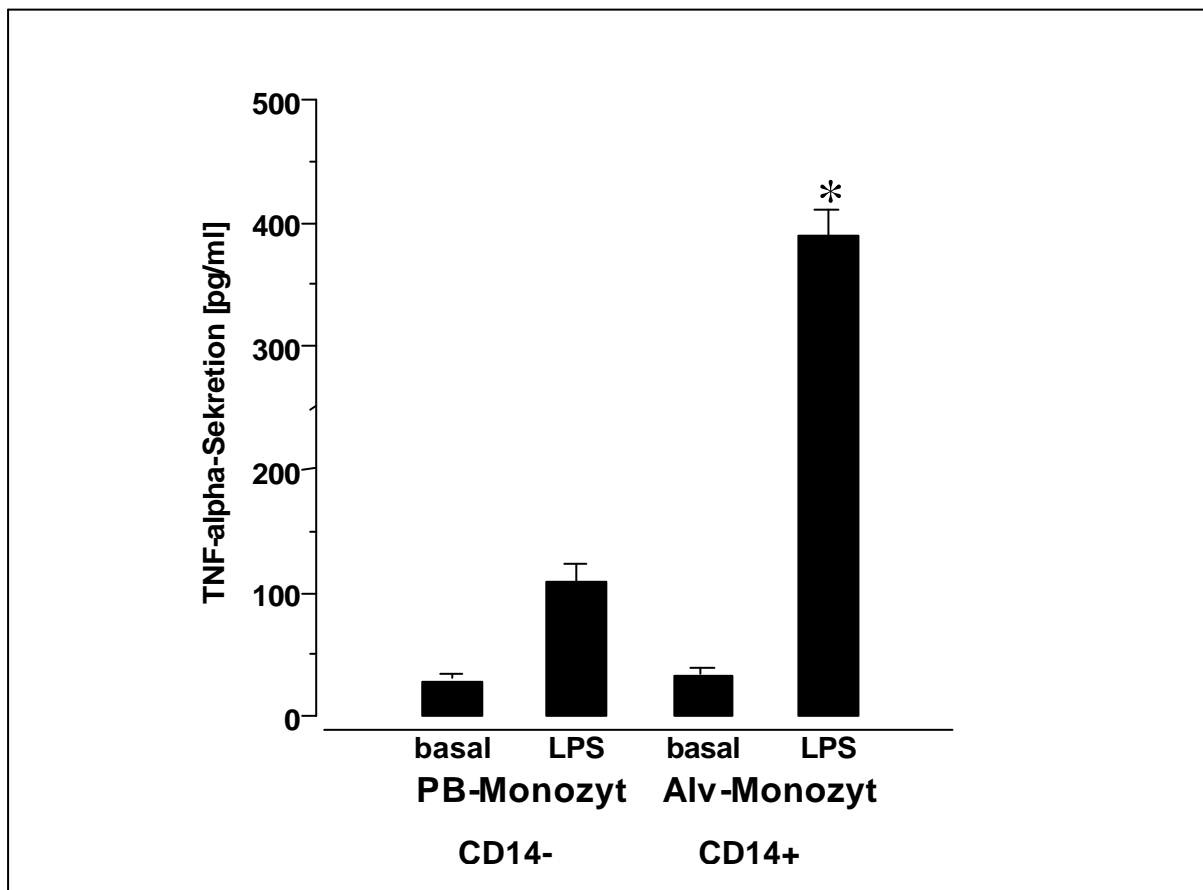


Abbildung 15. LPS-induzierte und basale TNF- α -Sekretion CD14-positiver alveolär rekrutierter Monozyten und CD14-negativer peripherer Blutmonozyten.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die intratracheale Instillation des monozytenspezifischen Chemokins JE/MCP-1 zur pulmonalen Rekrutierung von Monozyten führte, welche nach transendo-/epithelialer Passage im intraalveolären Kompartiment der Lunge akkumulierten. Die immunphänotypische und funktionelle Charakterisierung dieser frisch evadierten Zellen zeigte, daß sie ein Oberflächenantigenprofil ähnlich dem peripherer, zirkulierender Monozyten aufwiesen, jedoch ließ sich auf diesen Zellen eine signifikant gesteigerte Oberflächenexpression des LPS/LBP-Rezeptors CD14 nachweisen. Darüberhinaus zeigten alveolär rekrutierte Monozyten eine signifikante Steigerung der TNF- α -Genexpression verglichen mit zirkulierenden Blutmonozyten. Passend zur gesteigerten CD14-Expression fand sich nach LPS-Provokation *in vitro* eine signifikant verstärkte TNF- α -Sekretion alveolär rekrutierter Monozyten im Vergleich zu peripheren Blutmonozyten. Diese Befunde entsprechen einem transmigrationsassoziierten "Priming" transendo-/transepithelial rekrutierter Monozyten und scheinen den alveolär rekrutierten Monozyten in einen proinflammatorischen Aktivierungsstatus im Sinne einer gesteigerten pulmonalen "Host-Defense" zu versetzen.

Die beschriebene Methodik der alveolären Rekrutierung von Monozyten und deren Diskriminierung von residenten Alveolarmakrophagen basiert auf zwei Schritten:

- 1) *In vivo* Fluoreszenzmarkierung des residenten Alveolarmakrophagenpools durch intravenöse Injektion des rotfluoreszenten Intravitalfarbstoffes PKH26.
- 2) Intratracheale Instillation von murinem rekombinantem JE/MCP-1 zur chemotaktischen transendo-/epithelialen Rekrutierung von Monozyten in den Alveolarraum von Mäusen.

4.1 Alveoläre Rekrutierung von Monozyten und deren Diskriminierung von residenten Alveolarmakrophagen

4.1.1 PKH26-Markierung residenter Alveolarmakrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die intravenöse Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 spezifisch in residenten Alveolarmakrophagen akkumulierte, wohingegen weder zirkulierende Blutmonozyten noch zirkulierende polymorphkernige neutrophile Granulozyten oder Lymphozyten diesen Farbstoff aufnahmen. Diese selektive Anreicherung von PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen konnte anschließend durchflußzytometrisch zur Diskriminierung frisch rekrutierter Leukozyten vom residenten Alveolarmakrophagenpool genutzt werden.

Die Inkorporation des Intravitalfarbstoffes PKH26 folgte einer dosis- und zeitabhängigen Charakteristik: Eine für die Abgrenzung zu alveolär rekrutierten Monozyten ausreichende Steigerung der Rotfluoreszenz residenter Alveolarmakrophagen ergab sich bei einer in vivo Konzentration des Farbstoffes von 12-15 μM ; die maximale in vivo Akkumulation von PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen war nach ca. 24 h erreicht. Die Rotfluoreszenz der Alveolarmakrophagen blieb über 120 h stabil, so daß neu rekrutierte ungefärbte Zellen noch nach mehreren Tagen problemlos von fluoreszierenden residenten Alveolarmakrophagen im Durchflußzytometer diskriminiert werden konnten. Dieses Phänomen der Langzeitakkumulation wurde bereits von Beavis et al. genutzt, die zeigten, daß in vitro markierte Lymphozyten PKH26 über mindestens 28 d stabil inkorporierten und mittels dieser Farbstoffintensität Analysen über Zellteilungsraten der markierten Zellpopulationen durchgeführt werden konnten, da die Tochterzellen genau die Hälfte der Farbstoffintensität ihrer Progenitorzellen aufwiesen [10, 65]. Melnicoff et al. zeigten, daß auch über „mehrere Wochen“ in Kultur genommene PKH-markierte Peritonealmakrophagen den Farbstoff nicht an unmarkierte Nachbarzellen abgeben [65, 119, 120].

Zum Mechanismus der Farbstoffakkumulation in Makrophagen ist bekannt, daß eine Inkorporation des aliphatischen Phagozyten-Linker-Moleküls von PKH26 in den Lipid-Bilayer der Plasmamembran erfolgt [10, 65, 120]. Außerdem fanden Melnicoff et al. eine lysosomale Farbstoffakkumulation in Makrophagen aufgrund von sowohl Phagozytose aggregierter PKH-Moleküle als auch durch Endozytose farbstoffmarkierter

Zellmembrananteile [120]. Obwohl diese Internalisierungsmechanismen die erfolgreiche in vivo Färbung von Peritonealmakrophagen nach intraperitonealer Injektion des Fluorochroms erklären [119, 120], bleibt jedoch die Frage offen, warum der Farbstoff nur von Alveolarmakrophagen, nicht aber von Blutmonozyten nach intravenöser Injektion aufgenommen wurde. Interessant in diesem Zusammenhang erscheint, daß in Anwesenheit von Serumkomponenten eine zelluläre Akkumulation des Farbstoffes in peripheren Leukozyten oder residenten Alveolarmakrophagen in vitro unterbleibt. Dies könnte die fehlende Akkumulation von PKH26 in peripheren Leukozyten in vivo erklären. In Abwesenheit von Serumkomponenten ist demgegenüber eine Markierung von peripheren Leukozyten in vitro problemlos möglich.

Aufgrund mehrerer Experimente ließ sich ausschließen, daß die Aufnahme von PKH26 die physiologischen Funktionen von Alveolarmakrophagen beeinträchtigt:

- 1) Die Akkumulation von PKH26 per se induzierte keine gesteigerte TNF- α -Genexpression in residenten Alveolarmakrophagen.
- 2) Sowohl PKH26-markierte, als auch unmarkierte Alveolarmakrophagen zeigten nach der intratrachealen Applikation von *S. abortus equi* Endotoxin vergleichbar erhöhte TNF- α -mRNA-Level, was darlegt, daß die Akkumulation von PKH26 die Alveolarmakrophagen-Antwort auf Endotoxinprovokation nicht negativ beeinflusst hatte.
- 3) Es wurden vergleichbare basale und LPS-induzierte Mengen an TNF- α -Protein von separierten und in Kultur genommenen Alveolarmakrophagen PKH26-vorbehandelter und unbehandelter Mäuse ermittelt, was darauf hinweist, daß der Farbstoff das sekretorische Potential der Alveolarmakrophagen auf einen inflammatorischen Stimulus hin in vitro nicht verändert hatte.
- 4) Es zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Antigenprofils PKH26-markierter und unmarkierter Alveolarmakrophagen, was darlegt, daß PKH26 keinen Einfluß auf das Ausmaß der Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle hatte. Zusätzlich zeigte die histologische Untersuchung von Lungenschnitten PKH26-behandelter und unbehandelter Mäuse eine vergleichbare morphologische Architektur.

Die Punkte 1) bis 4) belegen, daß die intravenöse Injektion von PKH26 in Mäuse weder eine Schrankenstörung im Kapillarbett der Lunge induzierte, noch daß die Akkumulation von

PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen wesentliche Funktionen dieser Zellpopulation negativ beeinflusste. Eine mechanistisch plausible Erklärung zur transendo-/epithelialen Akkumulation von PKH26 in residenten Alveolarmakrophagen liegt bis dato nicht vor. Als Arbeitshypothese erscheint aber am wahrscheinlichsten, daß die Passage von PKH26 als niedermolekulare Verbindung zwischen den interzellulären Spalten der endo-/epithelialen Barriere ohne Verursachung einer funktionellen Schrankenstörung verläuft und der Farbstoff anschließend per Phagozytoseprozess sowie Membraninternalisierung in residenten Alveolarmakrophagen akkumuliert.

4.1.2 Rekrutierung von Monozyten aus der Lungenstrombahn in den Alveolarraum mittels intratrachealer Instillation von JE/MCP-1

Die gerichtete Transmigration von Leukozyten aus dem Intravasalraum in das entzündlich veränderte Lungenparenchym wird durch Chemokine vermittelt, welche aufgrund inflammatorischer Aktivierung von Endothel, Epithel oder von Entzündungszellen sezerniert werden. Chemokine sind niedermolekulare Proteine, welche sich nach der Stellung ihrer N-terminalen Cysteingruppen in die Subfamilien der C-, CC-, C-X-C- und C-X₃-C-Chemokine unterteilen lassen, wobei die CC-Chemokine die Chemotaxis v. a. von mononukleären Zellen vermitteln [6, 7, 12, 175]. Hierzu gehört das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), welches dem Genprodukt des murinen JE-Gens entspricht [142]. Neben der Funktion als monozytenrekrutierendes Chemokin vermittelt MCP-1 auch die Rekrutierung von Makrophagen, CD4-positiven T-Lymphozyten und NK-Zellen (natural killer cells) und beeinflusst die Affinität von Adhäsionsmolekülen der zu rekrutierenden Zellen zum jeweiligen Rezeptor [1, 19, 42, 51, 75, 144, 181, 193].

In dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mausmodell zeigte sich, daß eine intratracheale Applikation von > 10 µg JE/MCP-1 ausreichend war, um einen intraalveolären Monozyteninflux zu erreichen, wobei erst bei einer Gabe von 50 µg JE/MCP-1 nach einem Zeitintervall von 24 h eine signifikante Akkumulation von Monozyten und, in weitaus geringerem Ausmaß, CD4-positiver Lymphozyten zu messen war. Nach 48 h war die ermittelte Zellzahl in den gewonnenen BAL-Flüssigkeiten am höchsten mit $1,6 \times 10^6$ Zellen/Maus mit > 25% frisch rekrutierten Monozyten. Es ist aufgrund der Daten von Gunn et al. [51] anzunehmen, daß die Gesamtzellzahl bei der Applikation größerer Mengen von

JE/MCP-1 noch weiter ansteigt. Experimente mit transgenen Mäusen, welche MCP-1 in Typ II Alveolarepithelzellen überexprimierten, zeigten einen Anstieg der BAL-Gesamtzellzahlen auf bis zu 5×10^6 Zellen/Tier mit einer ca. 500fach vergrößerten Monozytenzahl gegenüber Normaltieren.

Die morphometrische Analyse der Lungenschnitte JE/MCP-1-behandelter Mäuse zeigte, daß der Alveolarraum das einzige Kompartiment darstellte, in dem sich die Leukozytenzahl, erfaßt durch das Panleukozytenantigen CD45, auf den chemotaktischen Stimulus JE/MCP-1 hin signifikant erhöhte. Im peribronchialen und perivaskulären Kompartiment hingegen zeigte sich keine Akkumulation CD45-positiver Zellen, und in den Alveolarsepten verringerte sich die Leukozytenzahl sogar. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß die in der Lungenstrombahn zirkulierenden Monozyten, die durch JE/MCP-1 chemotaktisch gelockt werden, sowohl die endotheliale als auch die epitheliale Barriere überwinden, und daß möglicherweise auch partiell interstitielle Makrophagenpools aus den Alveolarsepten ko-rekrutiert werden. Durch die *in vitro* Fluoreszenzmarkierung und Reinjektion isolierter Blutleukozyten konnte nachgewiesen werden, daß die im Alveolarraum akkumulierenden Monozyten tatsächlich überwiegend aus dem Pool zirkulierender Blutmonozyten rekrutiert wurden. Interessanterweise zeigt ein Vergleich mit der Literatur, daß bei chemokininduzierter Monozytenrekrutierung im Vergleich zur Monozytenrekrutierung, wie sie z. B. nach intratrachealer Instillation von LPS in die Lunge zu beobachten ist, rekrutierte Monozyten primär intraalveolär akkumulieren, wohingegen nach LPS-Instillation rekrutierte Monozyten sich primär im Interstitium der Lunge anreichern [103]. Dieser Befund deutet darauf hin, daß bei der Rekrutierung mononukleärer Zellen je nach inflammatorischem Stimulus unterschiedliche molekulare Pathways beteiligt sind. Auch bei der Rekrutierung von mononukleären Zellen durch MCP-1 zeigen sich Differenzen im Hinblick auf verschiedene Organkompartimente. In diversen transgenen Mausmodellen mit Überexpression von MCP-1 in verschiedenen Geweben konnten ein unterschiedliches Ausmaß und unterschiedliche Lokalisationen von Monozytenakkumulationen ermittelt werden, sowie eine verschieden stark ausgeprägte Rekrutierung von T-Lymphozyten. So fanden Fuentes et al. in einem transgenen Mausmodell mit Überexpression von MCP-1 im ZNS in den perivaskulären Zonen eine erhöhte Anzahl mononukleärer Zellen, jedoch kaum in den parenchymatösen Zonen, und kaum CD4-positive T-Zell-Infiltrate. Mäuse, die MCP-1 in Thymuszellen überexprimierten, zeigten dort lediglich geringe mononukleäre Infiltrate [42]. Gunn et al. fanden alveoläre

Monozytenakkumulationen und T-Zell-Infiltrate im Alveolarraum von Mäusen, die das Chemokin in Alveolarepithelzellen überexprimierten [51], und Grewal beschrieb ein Mausmodell mit MCP-1-Überexpression in pankreatischen Inselzellen und einhergehendem parenchymatösem mononukleärem und T-Zell-Infiltrat [47]. Ähnliche Daten resultierten aus Experimenten mit Mäusen, die eine Überexpression von MCP-1 in Keratinozyten aufwiesen mit der Folge einer Rekrutierung von Langerhanszellen und - nach Allergenkontakt - einer ausgeprägten Akkumulation von Monozyten und T-Lymphozyten in der Epidermis [126]. Diese unterschiedliche Ausprägung und Lokalisation der mononukleären Akkumulation, ebenso wie das variierende Ausmaß der T-Zellrekrutierung in den verschiedenen Mausmodellen läßt sich durch eine differierende Ausprägung der Expression der für die Rekrutierung der Leukozyten notwendigen Adhäsionsmoleküle in den diversen Geweben erklären. Ebenso könnte die unterschiedlich starke Gewebsexpression von Matrixproteasen das Ausmaß der Zellrekrutierung beeinflussen. Die Variabilität der Zellrekrutierung ist möglicherweise auch durch eine differierende Expression des MCP-1-Rezeptors CCR2 auf den jeweiligen Leukozyten bedingt. Dieser Rezeptor unterliegt bei Zellaktivierung einer Hochregulation, wobei eine inflammatorische Aktivierung der Leukozyten nicht bei jedem Rekrutierungsmechanismus stattfindet. Transgene Mäuse, welche eine systemische MCP-1-Überexpression aufwiesen, zeigten in den MCP-1-überexprimierenden Organen keine Monozytenrekrutierung, was bei einer solch massiven systemischen chemotaktischen Wirkung zum einen durch eine reaktive Downregulation von CCR2-Rezeptoren begründet werden kann, zum anderen durch einen fehlenden chemotaktischen Gradienten des MCP-1 [47, 149].

4.2 Verifizierung der Monozytenspezifität von JE/MCP-1

Der alveoläre Monozyteneinstrom und das "Priming" der rekrutierten Monozyten ist eine spezifische Eigenschaft des Chemokins JE/MCP-1 und wird nicht beobachtet, wenn andere CC-Chemokine wie MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) und RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) Mäusen anstelle von JE/MCP-1 intratracheal instilliert werden. Beide Chemokine gehören wie MCP-1 zur Familie der CC-Chemokine und vermitteln in vitro die Rekrutierung von Leukozyten [12, 15, 121, 158, 175, 179, 185, 188]. Von RANTES ist bekannt, daß es in einem Rattenmodell Monozyten in die

Alveole und das Lungenparenchym rekrutiert und diese Monozyten wiederum dazu befähigt, durch eigene Sekretion von Zytokinen weitere Zellpopulationen zu rekrutieren [15, 82, 104]. Interessanterweise zeigte die intratracheale Instillation von RANTES in der vorliegenden Arbeit eine von CD4-positiven T-Lymphozyten dominierte alveoläre Zellakkumulation, wohingegen eine signifikante Akkumulation von Neutrophilen (>30%) im alveolären Kompartiment nach intratrachealer MIP-1 α -Gabe gefunden werden konnte. Keines dieser beiden CC-Chemokine vermochte also nach intratrachealer Applikation die unter JE/MCP-1-Instillation beobachtete Monozytenakkumulation zu induzieren, so daß die MCP-1-Spezifität der Monozytenrekrutierung klar belegt werden konnte.

4.3 Antigenprofil der alveolär rekrutierten Monozyten

Monozyten sind an vielen inflammatorischen Reaktionen beteiligt: Sie haben die Fähigkeit, Zytokine zu sezernieren, Antigene zu präsentieren, Fremdpartikel zu phagozytieren und proteolytische Enzyme sowie Sauerstoffradikale freizusetzen [136, 183, 187]. Um aus der Blutbahn in das entzündlich veränderte Parenchym, bzw. den Alveolarraum zu gelangen, müssen die Monozyten zuerst an Endothelzellen adhären, um schließlich ins Gewebe und durch das Epithel in die Alveole zu transmigrieren. Dies wird durch diverse Adhäsionsmoleküle vermittelt; auf der Seite der Monozyten sind dies in erster Linie die Integrine und Selektine, auf dem Endothel die Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie wie ICAM und VCAM. Die Familie der Selektine (P-, E- und L-Selektin [CD62L]) vermittelt das initiale Rolling von Monozyten, welches im Kapillarbett der Lunge nur eine untergeordnete Rolle spielt [91, 101, 135, 161, 173, 174, 184]. Die Integrine stellen eine große Gruppe heterodimerer Glykoproteine der Zelloberfläche dar, welche aus einer schweren α - und einer leichten β -Kette bestehen und Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte vermitteln. Zur Gruppe der Integrine gehören u. a. β_1 - und β_2 -Integrine. Von den vier bis dato beschriebenen β_2 -Integrinen spielen für die Emigration von Monozyten folgende eine Rolle: LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) und p150,95 (CD11c/CD18); weiterhin exprimieren Monozyten das β_1 -Integrin VLA-4 (CD49d/CD29) [23, 60, 79, 122]. Diese β_1 - und β_2 -Integrine interagieren mit den vasculären und interzellulären Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1, welche beide auf pulmonal-vasculären Endothelzellen und auf Alveolarepithelzellen exprimiert sind, und ebenso mit extrazellulären Matrixproteinen wie

Fibronectin. Ligand für LFA-1 und Mac-1 ist ICAM-1, Liganden für VLA-4 sind VCAM-1 und Fibronectin. Zytokine, die während des inflammatorischen Prozesses sezerniert werden, können die Expression von Adhäsionsmolekülen hochregulieren [73, 154, 164].

Die immunphänotypische Charakterisierung alveolär rekrutierter Monozyten zeigte die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b, CD18, CD49d und CD62L, wohingegen ausdifferenzierte residente Alveolarmakrophagen diese Oberflächenmarker mit Ausnahme von CD11a und CD18 nicht mehr aufwiesen. Auf peripheren Blutmonozyten PKH26/JE/MCP-1-vorbehandelter Mäuse konnten die Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b, CD18, CD49d und CD62L ebenfalls detektiert werden. Dies deutet darauf hin, daß die alveolär rekrutierten Monozyten einen Monozyten-ähnlichen Phänotyp beibehalten und nicht innerhalb 48 h spontan in residente Alveolarmakrophagen ausdifferenzieren. Diese Beobachtung, die auf immunologischen Kriterien beruht, d. h. auf der Expression von charakteristischen Oberflächenmarkern, ergänzt die Daten von Gunn et al. [51], welche zeigen konnten, daß in den Alveolarraum transmigierte Monozyten morphologisch nicht spontan in Alveolarmakrophagen ausdifferenzieren. Die allein MCP-1-vermittelte Diapedese von Monozyten in die Alveole scheint also kein adäquater Stimulus für die Ausdifferenzierung in Makrophagen zu sein. Offensichtlich benötigt der Prozess der Differenzierung zu ortsständigen Makrophagen weitere kompartimentspezifische Stimuli.

Die auf peripheren sowie frisch rekrutierten, noch nicht ausdifferenzierten Monozyten detektierten Adhäsionsmoleküle sind für die alveoläre Monozytentransmigration in vivo unerlässlich: So konnte Issekutz in einem Rattenmodell zeigen, daß die gleichzeitige Blockade der Adhäsionsmoleküle Mac-1 (CD11b), LFA-1 (CD11a) und VLA-4 (CD49d) die Monozytenrekrutierung in die Haut nach intradermaler Applikation verschiedener inflammatorischer Stimuli zu über 98% reduzierte [73]. Allerdings zeigen Rekrutierungspaths in der systemischen versus pulmonalen Mikrozirkulation viele Unterschiede. Li et al. demonstrierte in einem Tiermodell, daß die Transmigration von Monozyten aus der Lungenstrombahn über die endotheliale Barriere in das Lungeninterstitium nach intratrachealer LPS-Applikation unabhängig von CD11/CD18 und VLA-4 abläuft, der Weg über die alveolo-epitheliale Barriere in das alveoläre Kompartiment jedoch nur mit β_1 - und β_2 -Integrinen möglich ist [103].

4.4 Bedeutung der CD14-Expression auf alveolär rekrutierten Monozyten

Ein zentraler Befund der vorliegenden Untersuchungen war, daß frisch in den Alveolarraum rekrutierte Monozyten im Gegensatz zu peripheren Blutmonozyten und residenten Alveolarmakrophagen eine signifikant gesteigerte CD14-Expression auf ihrer Zelloberfläche aufwiesen. CD14 ist ein 55kDa-Glykoprotein, das auf myeloischen Zellen zu finden ist [37]. Es existiert in zwei unterschiedlichen Formen: Zum einen als Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Membranprotein (mCD14) und zum zweiten als lösliches Plasmaprotein ohne GPI-Anker [196]. Beide Formen sind in das LPS-Signaling involviert: Das membrangebundene CD14 dient als Rezeptor für das LPS-bindende Protein LBP, welches mit freiem Endotoxin einen Komplex bildet und mit hoher Affinität an mCD14 bindet und so die Zellaktivierung in Gang setzt [113, 153]. Lösliches sCD14 dient dagegen zum einen als opsonisierender Rezeptor für LPS-tragende Partikel [32, 88], zum anderen kann es durch Interaktion mit per se CD14-negativen Zellen wie Endo- und Alveolarepithelzellen deren Suszeptibilität für LPS-Stimulation herbeiführen. Somit kommt CD14 eine tragende Rolle in der Erkennung von LPS und Initiation einer adäquaten Zellantwort auf einen Endotoxinstimulus zu [87, 94, 134, 176, 190]. In verschiedenen Tiermodellen konnte bisher eine CD14-vermittelte vermehrte Sensitivität gegenüber LPS gezeigt werden: Die Transfektion von CD14 in per se CD14-negative murine B-Zellen, die CD14-Expression auf Ovarialfibroblasten von Hamstern und die CD14-Überexpression in transgenen Mäusen bewirkte eine verstärkte Reaktivität der jeweiligen Zellpopulationen auf Endotoxinprovokation [39, 44, 93].

Im Maussystem, in welchem unter Bedingung der Homöostase CD14 auf peripheren Blutmonozyten nicht exprimiert ist, wird die Expression von membranständigem CD14 dosis- und zeitabhängig durch inflammatorische Aktivierung mit LPS auf myeloischen [106] und nicht myeloischen Zellen verschiedener Gewebe heraufreguliert. So fanden Fearn et al. in einem Mausmodell innerhalb von 2 h nach intraperitonealer LPS-Gabe sowohl erhöhte CD14-mRNA-Level, als auch eine verstärkte CD14-Oberflächenexpression auf myeloischen Zellen, sowie auch auf Epithelzellen innerhalb von 8-16 h [37]. Diese LPS-bedingte CD14-Expression ist zytokinvermittelt und als TNF- α -, IL-1 β - oder IL-6-vermittelter Prozess beschrieben [36, 37, 134].

Die gesteigerte CD14-Expression auf alveolär rekrutierten Monozyten weist auf eine zumindest partielle Aktivierung der Zellpopulation im Sinne eines "Priming" hin. Gegen eine Vollaktivierung spricht der Befund, daß die Monozyten nach Transmigration noch immer das Adhäsionsmolekül CD62L (L-Selektin) exprimieren. L-Selektin wird unter inflammatorischer Stimulation einem raschen "Shedding" unterworfen, d. h. von der Zelloberfläche der exprimierenden Leukozyten proteolytisch abgespalten. Untersuchungen von Kishimoto et al. konnten zeigen, daß verschiedene inflammatorische Stimuli (C5a, Leukotrien B₄, PMA, TNF- α , IL-1, LPS) L-Selektin auf Neutrophilen innerhalb von 1 bis 5 min durch shedding herunterregulieren und daß aktivierte murine Neutrophile nach Extravasation in entzündetes Gewebe kein L-Selektin mehr tragen [82]. Ähnliche Daten von Griffin et al. zeigten, daß auch das Zytokin GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor), welches u. a. als Chemokin bei inflammatorischen Prozessen wirkt, die L-Selektin-Expression auf humanen Monozyten und Granulozyten innerhalb von Minuten komplett herunterreguliert [48]. Das Fehlen einer Downregulation von L-Selektin auf alveolär rekrutierten Monozyten spricht dafür, daß sich alveolär rekrutierte Monozyten nach Transmigration in das alveoläre Kompartiment nicht im Zustand der vollen Zellaktivierung befinden. Interessanterweise konnte auch in verschiedenen transgenen Mausmodellen mit Überexpression von MCP-1 in Alveolarepithelzellen oder pankreatischen Inselzellen nachgewiesen werden, daß die ins Gewebe rekrutierten Monozyten nicht voll aktiviert sind: Zum einen waren sie ebenfalls noch CD62L-positiv, zum anderen lösten die in die Inselzellen evadierten Monozyten bei diesen Mäusen keine klinischen Symptome eines Diabetes aus [47, 51]. Die transendo-/transepitheliale Migration von Monozyten geht also nicht zwingend mit einer vollen inflammatorischen Zellaktivierung einher; diese ist offensichtlich abhängig vom transmigrationsinduzierenden Stimulus. Die partielle Aktivierung von Monozyten bei JE/MCP-1-induzierter Transmigration im Sinne des "Priming" scheint jedoch ein wichtiger Zwischenschritt zu sein für eine effektive pulmonale "Host-defense" bei Inflammation bzw. Infektion des Bronchoalveolarraumes.

Hierfür spricht, daß CD14-positive frisch rekrutierte Monozyten nicht nur eine signifikant erhöhte TNF- α -Genexpression zeigten, sondern darüberhinaus wesentlich stärker auf einen LPS-Stimulus *in vitro* reagierten als CD14-negative periphere Monozyten: Sie sezernierten eine vierfach höhere Menge des Akute-Phase-Zytokins TNF- α . TNF- α fungiert als endogener Mediator für LPS [9, 111, 129, 138] und ist gemeinsam mit IL-1 β das

wichtigste proinflammatorische Zytokin im LPS-assoziierten inflammatorischen Geschehen [90, 98, 178]. Als Ursache des in alveolär rekrutierten Monozyten beobachteten "Priming"-Mechanismus, d. h. die gesteigerte CD14-Expression sowie die erhöhte TNF- α -Genexpression, bzw. die vermehrte TNF- α -Proteinsekretion nach Stimulation, lassen sich folgende Ursachen ausschließen:

- 1) Ein direkter Einfluß des PKH26 auf alveolär rekrutierte Monozyten kann ausgeschlossen werden, da periphere Blutmonozyten, welche ebenfalls Kontakt zu dem Fluoreszenzfarbstoff hatten, keine CD14-Expression und lediglich eine basale TNF- α -mRNA-Expression aufwiesen. Daneben zeigten Daten von Melnicoff, daß sich PKH-markierte Peritonealmakrophagen in ihrem Aktivierungszustand nicht veränderten [120].
- 2) Ebenso wenig kann ein direkter Einfluß des Chemokins JE/MCP-1 auf die transmigrierten Monozyten für das "Priming" verantwortlich sein, denn die in vitro Inkubation isolierter Blutmonozyten von BALB/c-Mäusen mit dem Chemokin zeigten weder gesteigerte TNF- α -Genexpression noch CD14-Expression.

Es ist hingegen sehr wahrscheinlich, daß die transendo-/epitheliale Migration von Monozyten in das alveoläre Kompartiment für das beobachtete "Priming" verantwortlich ist. Denton et al. zeigten in vitro, daß der Prozess der Transmigration den transmigrierenden Monozyten funktionell moduliert: Bei Graft-versus-Host-Reaktionen in vitro bewirkte die Diapedese von Monozyten durch stimulierte Endothel eine monozytäre Zytokinsekretion und damit einen kostimulatorischen Effekt des Monozyten, der sich positiv auf die Rekrutierung weiterer Zellpopulationen auswirkte [29]. Dies unterstützt die Hypothese einer endothelial induzierten Beeinflussung der monozytären Funktion im Verlauf der Transmigration. Eine Beteiligung weiterer Faktoren des regionalen Mikromilieus kann aber nicht ausgeschlossen werden. So könnte das beobachtete "Priming" alveolär rekrutierter Monozyten auch durch Surfactant-Komponenten des alveolären Kompartiments bedingt sein, auf welche frisch invadierende Monozyten inflammatorisch reagieren, wohingegen residente Alveolarmakrophagen nicht oder nicht mehr ansprechen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die funktionelle Bedeutung von Monozyten bei akuten Entzündungsreaktionen der Lunge ist aufgrund der Tatsache, daß in den Alveolarraum evadierte Monozyten vom residenten Alveolarmakrophagenpool bislang nicht differenziert werden konnten, unzureichend untersucht. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung eines tierexperimentellen Modells, in welchem die Kinetik der Monozytenrekrutierung in den Alveolarraum erstmals suffizient untersucht werden konnte. Dies gelang durch in vivo Fluoreszenzmarkierung des residenten Alveolarmakrophagenpools zur Differenzierung rekrutierter Monozyten von sessilen Alveolarmakrophagen und durch intraalveoläre Deposition des murinen Chemokins JE/MCP-1. Dieses Modell erlaubt darüberhinaus die immunphänotypische Charakterisierung alveolär rekrutierter Monozyten, deren durchflußzytometrische Separation sowie die funktionelle Charakterisierung ihres inflammatorischen Potentials im Vergleich mit peripheren, zirkulierenden Blutmonozyten sowie residenten, ausdifferenzierten Alveolarmakrophagen.

Der Fluoreszenzfarbstoff PKH26 akkumulierte nach intravenöser Injektion sowohl dosis- als auch zeitabhängig selektiv in residenten Alveolarmakrophagen, ohne dabei zirkulierende Blutleukozyten oder alveolär rekrutierte Monozyten anzufärben. Mit Hilfe dieser selektiven in vivo Markierung ließ sich eine Methodik etablieren, die geeignet ist, neu rekrutierte Monozyten im Alveolarraum klar zu identifizieren, sie zu isolieren und einer funktionellen Analyse zuzuführen.

Als Stimulus für die intraalveoläre Rekrutierung von Monozyten wurde murines rekombinantes JE/MCP-1 intratracheal in gesunde Balb/c Mäuse instilliert. Mittels bronchoalveolärer Lavage ließen sich nach verschiedenen Zeitintervallen alveoläre Zellpopulationen gewinnen. Durch durchflußzytometrische Quantifizierung der hierin enthaltenen Monozyten ließ sich eine detaillierte Kinetik des alveolären Monozyteneinstroms erstellen.

Die ergänzende morphometrische Analytik histologischer Lungenpräparate von Tieren nach JE/MCP-1-Applikation zeigte, daß nach intraalveolärer JE/MCP-1-Deposition Monozyten nahezu ausschließlich im intraalveolären Kompartiment akkumulierten, wohingegen sich im peribronchialen und perivascularären Kompartiment keine Monozytenakkumulation nachweisen ließ. Es erfolgte demnach in diesem Modell vorwiegend

eine Monozytentransmigration aus dem Gefäßbett in die Alveole. Interessanterweise zeigte sich aber darüberhinaus auch eine signifikante Reduktion der im Alveolarseptum lokalisierten Leukozytenpopulationen, was darauf hindeutet, daß die intraalveoläre Deposition von JE/MCP-1 zusätzlich einen chemotaktischen Effekt auf intraseptal lokalisierte interstitielle Makrophagen hat.

Der Immunphänotyp alveolär rekrutierter Monozyten entsprach für die meisten untersuchten Antigene dem Phänotyp zirkulierender Monozyten des peripheren Blutes ohne Hinweis für eine spontane Differenzierung in residente Alveolarmakrophagen. Interessanterweise zeigten alveolär rekrutierte Monozyten jedoch eine starke Hochregulation des LPS/LBP-Rezeptors CD14, welcher für die Erkennung von Endotoxin und das LPS-Signaling eine tragende Rolle spielt. Mittels real-time PCR ließ sich darüberhinaus eine erhöhte basale TNF- α -Genexpression in alveolär rekrutierten Monozyten nachweisen. Zusätzlich zeigten alveolär rekrutierte Monozyten im Vergleich zu peripheren Blutmonozyten eine signifikant gesteigerte Endotoxin-induzierbare TNF- α -Proteinsekretion in vitro. Damit ließen sich distinkte immunphänotypische und funktionelle Charakteristika detektieren, welche alveolär rekrutierte Monozyten sowohl von zirkulierenden Blutmonozyten als auch von residenten Alveolarmakrophagen unterschieden.

Die signifikant gesteigerte Expression den LPS/LBP-Rezeptors CD14, die vermehrte basale Genexpression und Endotoxin-induzierbare Sekretion des Akute-Phase-Zytokins TNF- α sprechen für ein transmigrationsassoziiertes "Priming" transendo-/epithelial rekrutierter Monozyten. Die präsentierten Daten stützen das Konzept, daß die transendo-/transepitheliale Rekrutierung in Monozyten einen proinflammatorischen Aktivierungsstatus induziert, was deren Funktion bei der "Host-defense" im Rahmen akut pulmonaler Inflammation verbessert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Allavena, P., G. Bianchi, D. Zhou, J. van Damme, P. Jelinek, S. Sozzani, and A. Mantovani.** Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2, and -3. *Eur. J. Immunol.* 24:3233-3236, 1994.
2. **Akahoshi, T., C. Wada, H. Endo, K. Hirota, S. Hosaka, K. Takagishi, H. Kondo, S. Kashiwazaki, and K. Matushima.** Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 36:762-771, 1993.
3. **Annenkov, A.Y., and F.S. Baranova.** Lipopolysaccharide-dependent and lipopolysaccharide-independent pathways of monocyte desensitization to lipopolysaccharides. *J. Leukocyte Biol.* 50:215-227, 1991.
4. **Antoniades, H.N., J. Neville-Golden, T. Galanopoulos, R.L. Kradin, A.J. Valente, and D.T. Graves.** Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5371-5375, 1992.
5. **Austyn, J.M., and S. Gordon.** F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11:805-815, 1981.
6. **Baggiolini, M., B. DeWald, and B. Moser.** Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *J. Clin. Invest.* 71:812-814, 1993.
7. **Baggiolini, M.** Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568, 1998.
8. **Balkwill, F.R., and F. Burke.** The cytokine network. *Immunol. Today* 10:299-304, 1989.
9. **Bauss, F., W. Droge, and D.N. Mannel.** Tumor necrosis factor mediated endotoxic effects in mice. *Infect. Immun.* 55:1622-1625, 1987.
10. **Beavis, A.J., and K.J. Pennline.** Tracking of murine spleen cells in vivo: detection of PKH26-labeled cells in the pancreas of non-obese diabetic (NOD) mice. *J. Immunol. Meth.* 170:57-65, 1994.

11. **Beutler, B., and A. Cerami.** The biology of cachectin/TNF: a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* 7:625-655, 1989.
12. **Bless, N.M., M. Huber-Lang, R.-F. Guo, R.L. Warner, H. Schmal, B.J. Czermak, T.P. Shanley, L.D. Crouch, A.B. Lentsch, V. Sarma, M.S. Mulligan, H.P. Friedl, and P.A. Ward.** Role of CC chemokines (Macrophage inflammatory protein-1 β , Monocyte chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *J. Immunol.* 164:2650-2659, 2000.
13. **Blusse van oud Alblas, A., R. van Furth.** The origin, kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.* 149:1504-1518, 1979.
14. **Boring, L., J. Gosling, S.W. Chensue, S.L. Kunkel, R.V.J. Farese, H.E. Broxmeyer, and I.F. Charo.** Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C Chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 100:2552-2561, 1997.
15. **Braciak, T.A., K. Bacon, Z. Xing, D.J. Torry, F.L. Graham, T.J. Schall, C.D. Richards, K. Croitoru, and J. Gauldie.** Overexpression of RANTES using a recombinant adenovirus vector induces the tissue-directed recruitment of monocytes in the lung. *J. Immunol.* 157:5076-5084, 1996.
16. **Brieland, J.K., M.L. Jones, S.J. Clarke, J.B. Baker, J.S. Warren, and J.C. Fantone.** Effekt of acute inflammatory lung injury on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat pulmonary alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:134-139, 1992.
17. **Brieland, J.K., R.G. Kunkel, and J.C. Fantone.** Pulmonary alveolar macrophage function during acute inflammatory lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:1300-1306, 1987.
18. **Butcher, E.C.** Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036, 1991.
19. **Carr, M.W., S.J. Roth, E. Luther, S.S. Rose, and T.A. Springer.** Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3652-3656, 1994.

20. **Chensue, S.W., K.S. Warmington, J.H. Ruth, P.S. Sanghi, P. Lincoln, and S.L. Kunkel.** Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (Mycobacterial) and Th2 (Schistosomal) antigen-induced granuloma formation. *J. Immunol.* 157:4602-4608, 1996.
21. **Chomczynski, P., and N. Sacchi.** Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1987.
22. **Chuluyan, H.E., T.J. Schall, T. Yoshimura, and A.C. Issekutz.** IL-1 activation of endothelium supports VLA-4 (CD49d/CD29)-mediated monocyte transendothelial migration to C5a, MIP-1 alpha, RANTES, and PAF but inhibits migration to MCP-1: a regulatory role for endothelium-derived MCP-1. *J. Leukocyte Biol.* 58:71-79, 1995.
23. **Chuluyan, H.E., and A.C. Issekutz.** VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18-independent transendothelial migration of human monocytes. *J. Clin. Invest.* 92:2768-2777, 1993.
24. **Colotta, F., A. Borré, J.M. Wang, M. Tattanelli, F. Maddalena, N. Polentarutti, G. Peri, and A. Mantovani.** Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 148:760-765, 1992.
25. **Colotta, F., F.L. Sciaccia, M. Sironi, W. Luini, M.J. Rabiet, and A. Mantovani.** Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am. J. Pathol.* 144: 975-985, 1994.
26. **Debs, R.J., H.J. Fuchs, R. Philip, B. Montgomery, E.N. Brunette, D. Liggitt, J.S. Patton, and J.E. Shellito.** Lung specific delivery of cytokines induces sustained pulmonary and systemic immunomodulation in rats. *J. Immunol.* 140:3482-3488, 1988.
27. **Deforge, L.E., D.T. Nguyen, S.L. Kunkel, and D.G. Remick.** Regulation of the pathophysiology of tumor necrosis factor. *J. Lab. Clin. Med.* 116:429-438, 1990.
28. **Dentener, M.A., V. Brazil, E.J.U. von Asmuth, M. Ceska, and W.A. Buurman.** Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* 150:2885-2891, 1993.

-
29. **Denton, M.D., C.S. Geehan, S.I. Alexander, M.H. Sayegh, and D.M. Briscoe.** Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4+ T cell alloactivation. *J. Exp. Med.* 190:555-566, 1999.
 30. **Dinareello, C.A., J.G. Cannon, S.M. Wolff, H.A. Bernheim, B. Beutler, A. Cerami, I.S. Figari, M.A. Palladino jr, and J.V. O'Connor.** Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J. Exp. Med.* 163:1433-1450, 1986.
 31. **Doerschuk, C.M., R.K. Winn, H.O. Coxson, and J.M. Harlan.** CD18-dependent and -independent mechanisms of neutrophil emigration in the pulmonary and systemic microcirculation of rabbits. *J. Immunol.* 144:2327-2333, 1990.
 32. **Durieux, J.-J., N. Vita, O. Popescu, F. Guette, J. Calzada-Wack, R. Munker, R.E. Schmidt, J. Lupker, P. Ferrera, H.W.L. Ziegler-Heitbrock, and M.O. Labeta.** Two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal monocytes. *Eur. J. Immunol.* 24:2000-2012, 1994.
 33. **Ermert, L., M. Ermert, M. Goppelt-Struebe, D. Walmrath, F. Grimminger, W. Steudel, H.A. Ghofrani, C. Homberger, H.-R. Duncker, and W. Seeger.** Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 18:479-488, 1998.
 34. **Ermert, L., H.-R. Duncker, S. Rosseau, H. Schütte, and W. Seeger.** Morphometric analysis of pulmonary intracapillary leukocyte pools in ex-vivo perfused rabbit lungs. *Am. J. Physiol.* 267 (Lung Cell. Mol. Physiol. 11):L64-69, 1994.
 35. **Ernst, C.A., Y.J. Zhang, P.R. Hancock, B.J. Rutledge, C.L. Corless, and B.J. Rollins.** Biochemical and biologic characterization of murine chemoattractant protein-1. Identification of two functional domains. *J. Immunol.* 152:3541-3549, 1994.
 36. **Fearns, C., and D.J. Loskutoff.** Role of tumor necrosis factor alpha in induction of murine CD14 gene expression by lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 65:4822-4831, 1997.
 37. **Fearns, C., V.V. Kravchenko, R.J. Ulevitch, and D.J. Loskutoff.** Murine CD14 gene expression in vivo: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 181:857-866, 1995.

38. **Ferrero, E., A. Bondanza, B. Leone, S. Manici, A. Poggi, and M. Zocchi.** CD14⁺CD34⁺ peripheral blood mononuclear cells migrate across endothelium and give rise to immunostimulatory dendritic cells. *J. Immunol.* 160:2675-2683, 1998.
39. **Ferrero, E., D. Jiao, B.Z. Tsuberi, L. Tesio, G.W. Rong, A. Haziot, and S.M. Goyert.** Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2380-2384, 1993.
40. **Fink, L., W. Seeger, L. Ermert, J. Hänze, U. Stahl, F. Grimminger, W. Kummer, and R.M. Bohle.** Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nature Med.* 4:1329-1333, 1998.
41. **Flory, C.M., M.L. Jones, and S. Warren.** Pulmonary granuloma formation in the rat is partially dependent on monocyte chemoattractant protein 1. *Lab. Invest.* 69:369-374, 1993.
42. **Fuentes, M.L., S.K. Durham, M.R. Swerdel, A.C. Lewin, D.S. Barton, J.R. Megill, R. Bravo, and S.A. Lira.** Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J. Immunol.* 155:5769-5776, 1995.
43. **Garcia-Zepeda, E.A., C. Combadiere, M.E. Rothenberg, M.N. Sarafi, F. Lavigne, Q. Hamid, P.M. Murphy, and A.D. Luster.** Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J. Immunol.* 157:5613-5626, 1996.
44. **Golenbock, D.T., Y. Liu, F.H. Millham, M.W. Freeman, and R.A. Zoeller.** Surface expression of human CD14 in Chinese hamster ovary fibroblasts imparts macrophage-like responsiveness to bacterial endotoxin. *J. Biol. Chem.* 268:22055-22059, 1993.
45. **Gordon, S., L. Lawson, S. Rabinowitz, P.R. Crocker, L. Morris, and V.H. Perry.** Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 181:1-36, 1992.
46. **Gordon, S., S. Keshav, L.-P. Chung.** Mononuclear phagocytes: tissue distribution and functional heterogeneity. *Curr. Opin. Immunol.* 1:26-35, 1988a

-
47. **Grewal, I.S., B.J. Rutledge, J.A. Fiorillo, L. Gu, R.P. Gladue, R.A. Flavell, and B.J. Rollins.** Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes - abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *J. Immunol.* 159:401-408, 1997.
 48. **Griffin, J.D., O. Spertini, T.J. Ernst, M.C. Belvin, H.B. Levine, Y. Kanakura, and T.F. Tedder.** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J. Immunol.* 145:576-584, 1990.
 49. **Grunfeld, C.G., and M.A. Palladino.** Tumor necrosis factor: immunologic, antitumor, metabolic, and cardiovascular activities. *Adv. Intern. Med.* 35:45-72, 1990.
 50. **Gu, L., Y. Okada, S.K. Clinton, C. Gerard, G.K. Sukhova, P. Libby, and B.J. Rollins.** Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell.* 2:275-281, 1998.
 51. **Gunn, M.D., N.A. Nelken, X. Liao, and L.T. Williams.** Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J. Immunol.* 158:376-383, 1997.
 52. **Hackett, S.P., and D.L. Stevens.** Streptococcal toxic shock syndrome: Synthesis of tumor necrosis factor and interleukin-1 by monocytes stimulated with pyrogenic exotoxin A and streptolysin O. *J. Infect. Dis.* 165:879-885, 1992.
 53. **Hakkert, B.C., T.W. Kuijpers, J.F.M. Leeuwenberg, J.A. van Mourik, and D. Ross.** Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells: the contribution of CD18, ELAM-1, and VLA-4. *Blood* 78:2721-2726, 1991.
 54. **Haraldsen, G., D. Kvale, B. Lien, I.N. Farstad, and P. Brandtzaeg.** Cytokine-related expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 156:2558-2565, 1996.
 55. **Harigai, M., M. Hara, T. Yoshimura, E.J. Leonard, K. Inoue, and S. Kashiwazaki.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 69:83-91, 1993.

-
56. **Harkins, K.R., and D.W. Galbraith** Factors governing the flow cytometric analysis and sorting of large biological particles. *Cytometry* 8:60-70, 1987.
 57. **Haskill, S., C. Johnson, D. Eiermann, S. Becker, and K. Warren** Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. *J. Immunol.* 140:1690-1694, 1988.
 58. **Havenith, C.E.G., A.J. Breedijk, P.P.M.C. van Miert, N. Blijleven, W. Calame, R.H.J. Beelen, and E.C.M. Hoefsmit.** Separation of alveolar macrophages and dendritic cells via autofluorescence: phenotypical and functional characterization. *J. Leukocyte Biol.* 53:504-510, 1993.
 59. **Heid, C.A., J. Stevens, J.K. Livak, and P.M. Williams.** Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994, 1996.
 60. **Hemler, M.E., C. Huang, Y. Takada, L. Schwarz, J.L. Strominger, and M.L. Clabby.** Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J. Biol. Chem.* 262:11478-11485, 1987.
 61. **Hemler, M.E., M.J. Elices, C. Parker, and T. Yoshikazu.** Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol. Rev.* 114:45-65, 1990.
 62. **Heumann, D., P. Gallay, C. Barras, P. Zaech, R.J. Ulevitch, P.S. Tobias, M.-P. Blauser, and J.D. Baumgartner.** Control of lipopolysaccharide (LPS) binding and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 148:3505-3512, 1992.
 63. **Hirsch, S., J.M. Austyn, S. Gordon** Expression of the macrophage-specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cells in culture. *J. Exp. Med.* 154:713-725, 1981.
 64. **Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand.** Detection of a specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:7276-7280, 1991.
 65. **Horan, P.K., and S.E. Slezak.** Stable cell membrane labelling. *Nature* 340:167-168, 1989.

-
66. **Huffnagle, G.B., R.M. Strieter, T.J. Standiford, R.A. McDonald, M.D. Burdick, S.L. Kunkel, and G.B. Toews.** The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4⁺ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol.* 155:4790-4797, 1995.
 67. **Hunt, J.S., H.-L. Chen, X.-L. Hu, T.-Y. Chen, and D.C. Morrison.** Tumor necrosis factor- α gene expression in the tissues of normal mice. *Cytokine* 4:340-346, 1992.
 68. **Issekutz, A.C., and T.B. Issekutz.** Monocyte migration to arthritis in the rat utilizes both CD11/CD18 and VLA-4 integrin mechanisms. *J. Exp. Med.* 181:1197-1203, 1995.
 69. **Issekutz, A.C., and T.B. Issekutz.** Quantitation and kinetics of blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, and IL-1 α , tumor necrosis factor- α , and IFN- γ . *J. Immunol.* 151:2105-2115, 1993.
 70. **Issekutz, A.C., and T.B. Issekutz.** The contribution of LFA-1 (CD11a/CD18) and MAC-1 (CD11b/CD18) to the in vivo migration of polymorphonuclear leukocytes to inflammatory reactions in the rat. *Immunology* 76:655-661, 1992.
 71. **Issekutz, T.B., A.C. Issekutz, and H.Z. Movat.** The in vivo quantitation and kinetics of monocyte migration into acute inflammatory tissue. *Am. J. Pathol.* 103:47-55, 1981.
 72. **Issekutz, T.B..** Dual inhibition of VLA-4 and LFA-1 maximally inhibits cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation. *Am. J. Pathol.* 143:1286-1293, 1993.
 73. **Issekutz, T.B..** In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. *J. Immunol.* 154:6533-6540, 1995.
 74. **Iyonaga, K., M. Takeya, N. Saita, O. Sakamoto, Y. Yoshimura, M. Ando, and K. Takahashi.** Monocyte chemoattractant protein-1 in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases. *Human Pathol.* 25:455-463, 1994.
 75. **Jiang, Y., D.I. Beller, G. Frendl, and T. Graves.** Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 148:2423-2428, 1992.

-
76. **Jones, M.L., and J.S. Warren** Monocyte chemoattractant protein-1 in a rat model of pulmonary granulomatosis. *Lab. Invest.* 66:498-503, 1992.
 77. **Jones, M.L., M.S. Mulligan, C.M. Flory, P.A. Ward, and J.S. Warren.** Potential role of monocyte chemoattractant protein 1/JE in monocyte/macrophage-dependent IgA immune complex alveolitis in the rat. *J. Immunol.*149:2147-2154, 1992.
 78. **Jutila, M.A., L. Rott, E.L. Berg, and E.C. Butcher.** Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: Comparison with LFA-1 and MAC-1. *J. Immunol.* 143:3318-3324, 1989.
 79. **Kanangat, S., A. Solomon, and B.T. Rouse.** Use of quantitative polymerase chain reaction to quantitate cytokine messenger RNA molecules. *Mol. Immunol.* 29:1229-1236, 1992.
 80. **Keizer, G. D., A.A. TeVelde, R. Schwarting, C.G. Figdor, and J.E. De Vries.** Role of p150,95 in adhesion, chemotaxis and phagocytosis of human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 17:1317-1322 1987.
 81. **Kelley, J..** Cytokines of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:765-788, 1990.
 82. **Kishimoto, T.K., M.A. Jutila, A.L. Berg, and E.C. Butcher.** Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245:1238-1241, 1989.
 83. **Kishimoto, T., T. Taga, and S. Akira.** Cytokine signal transduction. *Cell* 76:253-262, 1994.
 84. **Koch, A.E, S.L. Kunkel, L.A. Harlow, B. Johnson, H.L. Evanoff, G.K. Haines, M.D. Burdick, R.M. Pope, and R.M. Strieter.** Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 90:772-779, 1992.
 85. **Kradin, R.L., K.M. McCarthy, F.I. Preffer, and E.E. Schneeberger.** Flow-cytometric and ultrastructural analysis of alveolar macrophage maturation. *J. Leukocyte Biol.* 40:407-417, 1987.

-
86. **Kuziel, W.A., S.J. Morgan, T.C. Dawson, S. Griffin, O. Smithies, K. Ley, and N. Maeda.** Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12053-12058, 1997.
 87. **Labeta, M.O., J.-J. Durieux, G. Spagnoli, N. Fernandez, J. Wijdenes, and R. Herrmann.** CD14 and tolerance to lipopolysaccharide: biochemical and functional analysis. *Immunology* 80:415-423, 1993.
 88. **Labeta, M.O., J.-J. Durieux, N. Fernandez, R. Herrmann, and P. Ferrara.** Release from a monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur. J. Immunol.* 23:2144-2151, 1993.
 89. **Larrick, J.W., and S.C. Wright.** Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB J.* 4:3215-3223, 1990.
 90. **Larrick, J.W., and S.L. Kunkel.** The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response. *Pharmaceut. Res.* 5:129-139, 1988.
 91. **Lawrence, M.B., and T.A. Springer.** Leukocytes roll on selectins at physiological flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65:859-873, 1991.
 92. **Leenen, P.J., M.F. de Bruijn, J.S. Voerman, P.A. Campbell, and W. van Ewijk.** Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods.* 174:5-19, 1994.
 93. **Lee, J.D., K. Kato, P.S. Tobias, T.N. Kirkland, and R.J. Ulevitch.** Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J. Exp. Med.* 175:1697-1705, 1992.
 94. **Lee, J.D., V. Kravchenko, T.N. Kirkland, J. Han, N. Mackman, A. Moriarty, D. Leturcq, P.S. Tobias, and R. J. Ulevitch.** Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9930-9934, 1993
 95. **Lee, L.G., C.R. Connel, and W. Bloch.** Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl. Acid Res.* 21:3761-3766, 1993.

-
96. **Lee, S.H., P. Starkey, and S. Gordon.** Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J. Exp. Med.* 161:475-489, 1985.
 97. **Lehnert, B.E., Y.E. Valdez, D.A. Fillak, J.A. Steinkamp, and C.C. Stewart.** Flow cytometric characterization of alveolar macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 39:285-298, 1986.
 98. **Le, J., and J. Vilcek.** Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.* 56:234-248, 1987.
 99. **Leonard, E.J., and T. Yoshimura.** Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today* 11:97-101, 1990.
 100. **Lewinsohn, D.M., R.F. Bargatze, and E.C. Butcher.** Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanisms shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. *J. Immunol.* 138:4313-4321, 1987.
 101. **Ley, K., T.F. Tedder, and G.S. Kansas.** L-selectin mediates leukocyte rolling in untreated mesenteric venules in vivo independent of E or P-selectin. *Blood* 82:1632-1638, 1993.
 102. **Lira, S.A., P. Zalamea, J.N. Heinrich, M.E. Fuentes, D. Carrasco, A.C. Lewin, D.S. Barton, S. Durham, and R. Bravo.** Expression of the chemokine N51/KC in the thymus and epidermis of transgenic mice results in marked infiltration of a single class of inflammatory cells. *J. Exp. Med.* 180:2039-2048, 1994.
 103. **Li, X.C., M. Miysaka, and T. B. Issekutz.** Blood monocyte migration to acute lung inflammation involves both CD11/CD18 and very late activation antigen-4-dependent and independent pathways. *J. Immunol.* 161:6258-6264, 1998.
 104. **Locati, M., D. Zhou, W. Luini, V. Evangelista, A. Mantovani, and S. Sozzani.** Rapid induction of arachidonic acid release by monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. Role of Ca^{2+} influx, synergism with platelet activating factor, and significance for chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 269:4746-4753, 1994.

-
105. **Lohmeyer, J., J. Friedrich, S. Rosseau, H. Pralle, and W. Seeger.** Multiparameter flow cytometric analysis of inflammatory cells contained in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Immunol. Methods* 172:59-70, 1994.
 106. **Lu, B., B.J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N.W. Lukacs, S.L. Kunkel, R. North, C. Gerard, and B.J. Rollins.** Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein-1 deficient mice. *J. Exp. Med.* 187:601-608, 1998.
 107. **Luscinskas, F.W., G.S. Kansas, H. Ding, P. Pizcueta, B.E. Schleiffenbaum, T.F. Tedder, and M.A. Gimbrone.** Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J. Cell Biol.* 125:1417-1427, 1994.
 108. **Marchant, A., J. Duchow, J.-P. Delville, and M. Goldman** Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecules on monocytes in human whole blood. *Eur. J. Immunol.* 22:1663-1665, 1992.
 109. **Martin, T.R., J.C. Mathison, P.S. Tobias, D.J. Leturcq, A.M. Moriarty, R.J. Maunder, and R.J. Ulevitch** Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 90:2209-2219, 1992.
 110. **Mathison, J.C., E. Wolfson, and R.J. Ulevitch** Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced lung injury in rabbits. *J. Clin. Invest.* 81:1925-1937, 1988.
 111. **Mathison, J.C., G.D. Virca, E. Wolfson, P.S. Tobias, K. Glaser, and R.J. Ulevitch.** Adaption to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. *J. Clin. Invest.* 85:1108-1118, 1990.
 112. **Mathison, J.C., P.S. Tobias, E. Wolfson, and R.J. Ulevitch** Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. *J. Immunol.* 149:200-206, 1992.
 113. **Matsushima, K., C.G. Larsen, G.C. DuBois, and J.J. Oppenheim.** Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.* 169:1485-1490, 1989.

-
114. **Maus, U., S. Herold, H. Muth, R. Maus, L. Ermert, M. Ermert, N. Weissmann, S. Rosseau, W. Seeger, F. Grimminger, and J. Lohmeyer.** Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)* 280:L58-L68, 2001.
115. **Maus, U., S. Rosseau, W. Seeger, and J. Lohmeyer.** Separation of human alveolar macrophages by flow cytometry. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)* 16) 272:566-571, 1997.
116. **McEver, R.P.** Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:840-849, 1992.
117. **McKnight, A. J., A. J. Macfarlane, P. Dri, L. Turley, A.C. Willis, and S. Gordon.** Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J. Biol. Chem.* 271:486-489, 1996.
118. **Meerschaert, J., and M.B. Furie.** Monocytes use either CD11/CD18 or VLA-4 to migrate across human endothelium in vitro. *J. Immunol.* 152:1915-1926, 1994.
119. **Melnicoff, M.J., P.K. Horan, E.W. Breslin, and P.S. Morahan.** Maintenance of peritoneal macrophages in the steady state. *J. Leukocyte Biol.* 44:367-375, 1988.
120. **Melnicoff, M.J., P.S. Morahan, B.D. Jensen, E.W. Breslin, and P.K. Horan.** In vivo labeling of resident peritoneal macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 43:387-397, 1988.
121. **Meurer, R., G. Van Riper, W. Feeney, P. Cunningham, D. Hora jr, M. Springer, D. Euan MacIntyre, and H. Rosen.** Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 α , or human interleukin 8. *J. Exp. Med.* 178:1913-1921, 1993.
122. **Miller, L.J., D.F. Bainton, N. Borregaard, and T.A. Springer.** Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J. Clin. Invest.* 80:535-544, 1987.
123. **Moser, R., B. Schleiffenbaum, P. Groscurth, and G. Fehr.** IL-1 and TNF stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J. Clin. Invest.* 83:444-455, 1989.

-
124. **Muller, W.A., and S. Weigl.** Monocyte-selective transendothelial migration: dissection of the binding and transmigration phases by an in vitro assay. *J. Exp. Med.* 176:819-828, 1992.
125. **Mulligan, M.S., C.W. Smith, D.C. Anderson, R.F. Todd III, M. Miysaka, T. Tamatani, T.B. Issekutz, and P.A. Ward.** Role of leukocyte adhesion molecules in complement-induced lung injury. *J. Immunol.* 150:2401-2406, 1993.
126. **Nakamura, K., I.R. Williams, and T.S. Kupper.** Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J. Invest. Dermatol.* 105:635-643, 1995.
127. **Nakano, Y., T. Kasahara, N. Mukaida, Y.-C. Ko, M. Nakano, and K. Matsushima.** Protection against lethal bacterial infection in mice by monocyte-chemotactic and -activating factor. *Infect. Immun.* 62:377-383, 1994.
128. **Nelken, N.A., S.R. Coughlin, D. Gordon, and J.N. Wilcox.** Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.* 88:1121-1127, 1991.
129. **Nelson, S., G.J. Bagby, B.G. Bainton, L.A. Wilson, J.J. Thompson, and W.R. Summer.** Compartmentalization of intraalveolar and systemic LPS-induced TNF and the pulmonary inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 159:189-194, 1989.
130. **Noris, M., S. Bernasconi, F. Casiraghi, S. Sozzani, E. Gotti, G. Remuzzi, and A. Mantovani.** Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab. Invest.* 73:804-809 1995.
131. **Overbergh, L., D. Valckx, M. Waer, and C. Mathieu.** Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transkriptase PCR. *Cytokine* 11:305-312, 1999.
132. **Pabst, R.** Compartmentalization and kinetics of lymphoid cells in the lung. *Regul. Immunol.* 3:62-71, 1990.
133. **Paine, R. III., M.W. Rolfe, and T.J. Standiford.** MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J. Immunol.* 150:4561-4570, 1993.

-
134. **Perera, P.-Y., S.N. Vogel, G.R. Detore, A. Haziot, and S.M. Goyert.** CD14-dependent and independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. *J. Immunol.* 158:4422-4429, 1997.
135. **Pizcueta, P., and F. W. Luscinskas.** Monoclonal antibody blockade of L-Selectin inhibits mononuclear leukocyte recruitment to inflammatory sites in vivo. *Am. J. Pathol.* 145:461-469, 1994.
136. **Proost, P., A. Wuyts, G. Opdenakker, and J. van Damme.** Monocyte chemoattractant proteins 1, 2 and 3. In *Cytokines*. A. Mire-Sluis and R. Thorpe, editors. Academic press, San Diego 489-506, 1998.
137. **Pugin, J., C.-C. Schurer-Maly, D. Leturcq, A. Moriarty, R.J. Ulevitch, and P.S. Tobias.** Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2744-2748, 1993.
138. **Remick, D.G., R.M. Strieter, M.K. Eskandari, D.T. Nguyen, M.A. Genord, C.L. Raiford, and S.L. Kunkel.** Role of tumor necrosis factor- α in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am. J. Pathol.* 136:49-60, 1990.
139. **Reynolds, H. Y.** Pulmonary host defenses. *Chest.* 95:223S-230S, 1989.
140. **Rollins, B.J., A. Walz, and M. Baggiolini.** Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78:1112-1116, 1991.
141. **Rollins, B.J.** Chemokines. *Blood.* 90:909-928, 1997.
142. **Rollins, B.J., E.D. Morrison, and C.D. Stiles.** Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3738-3742, 1988.
143. **Rollins, B.J.** JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer cells* 3:517-524, 1991.

-
- 144. Rollins, B.J.** Monocyte chemoattractant protein-1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* 2:198-204, 1996.
- 145. Rollins, B.J., P. Stier, T.E. Ernst, and G.G. Wong.** The human homologue of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol. Cell. Biol.* 9:4687-4695, 1989.
- 146. Rollins, B.J., T. Yoshimura, E.J. Leonard, and J.S. Pober.** Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol.* 136:1229-1233, 1990.
- 147. Rosen, H., and S. Gordon.** Adoptive transfer of fluorescence-labeled cells shows that resident peritoneal macrophages are able to migrate into specialized lymphoid organs and inflammatory sites in the mouse. *Eur. J. Immunol.* 20:1251-1258, 1990.
- 148. Rovin, B.H., N. Doe, and L.C. Tan.** Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. *Am J. Kidney Dis.* 27:640-646, 1996.
- 149. Rutledge, B.J., H. Rayburn, R. Rosenberg, R.J. North, R.P. Gladue, C.L. Corless, and B.J. Rollins.** High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. *J. Immunol.* 155:4838-4843, 1995.
- 150. Salyer, J.L., J.F. Bohnsack, W.A. Knape, A.O. Shigeoka, E.R. Ashwood, and H.R. Hill.** Mechanisms of TNF alteration of PMN adhesion and migration. *Am. J. Pathol.* 136:831-841, 1990.
- 151. Schall, T.J., and K.B. Bacon.** Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 6:865-873, 1994.
- 152. Schall, T.J., K. Bacon, K. Toy, and D. Goeddel.** Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669-671, 1990.
- 153. Schumann, R.R.** Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res. Immunol.* 143:11-15, 1992.

-
- 154. Shang, X.Z., and A.C. Issekutz.** Contribution of CD11a/CD18, CD11b/CD18, ICAM-1 (CD54) and -2 (CD102) to human monocyte migration through endothelium and connective tissue fibroblast barriers. *Eur. J. Immunol.* 28:1970-1979, 1998.
- 155. Shang, X.Z., and A.C. Issekutz.** Enhancement of monocyte transendothelial migration by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: requirement for chemoattractant and CD11a/CD18 mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 29:3571-3582, 1999.
- 156. Shang, X.Z., B.J. Lang, and A.C. Issekutz.** Adhesion molecule mechanisms mediating monocyte migration through synovial fibroblast and endothelium barriers: role for CD11/CD18, very late antigen-4 (CD49d/CD29), very late antigen-5 (CD49e/CD29), and vascular cell adhesion molecule-1 (CD106). *J. Immunol.* 160:467-174, 1998.
- 157. Shellito, J., C. Esparza, and C. Armstrong.** Maintenance of the normal rat alveolar macrophage cell population. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:78-82, 1987.
- 158. Shi, M.M., I.W. Chong, N.C. Long, J.A. Love, J.J. Godleski, and J.D. Paulauskis.** Functional characterization of recombinant rat macrophage inflammatory protein-1 alpha and mRNA expression in pulmonary inflammation. *Inflammation* 22:29-43, 1998.
- 159. Sica, A., J.M. Wang, F. Colotta, E. Dejana, A. Mantovani, J.J. Oppenheim, C.G. Larsen, C.O.C. Zachariae, and K. Matsushima.** Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 144:3034-3038, 1990.
- 160. Sozzani, S., W. Luini, M. Molino, P. Jilek, B. Bottazzi, C. Cerletti, K. Matsushima, and A. Mantovani.** The signal transduction pathway involved in the migration induced by a monocyte chemotactic cytokine. *J. Immunol.* 147:2215-2221, 1991.
- 161. Spertini, O., F.W. Luscinskas, M.A. Gimbrone jr, and T.F. Tedder.** Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under non-static conditions. *J. Exp. Med.* 175:1789-1792, 1992.
- 162. Sporn, S.A., D.F. Eiermann, C.E. Johnson, J. Morris, G. Martin, M. Ladner, and S. Haskill.** Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *J. Immunol.* 144:4434-4441, 1990.

-
163. **Springer, T.A.** Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434, 1990.
164. **Springer, T.A.** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314, 1994.
165. **Standiford, T.J., S.L. Kunkel, N.W. Lukacs, M.J. Grennberger, J.M. Danforth, R.G. Kunkel, and R.M. Strieter.** Macrophage inflammatory protein-1 α mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. *J. Immunol.* 155:1515-1524, 1995.
166. **Standiford, T.J., S.L. Kunkel, and S.H. Phan.** Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from pulmonary type II-like endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 266:9912-9918, 1991.
167. **Stefanová, I., M.L. Corcoran, E.M. Horak, L.M. Wahl, J.B. Bohlen, and I.D. Horak.** Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosin kinase p53/56^{lyn}. *J. Biol. Chem.* 268:20725-20728, 1993.
168. **Stone, K.C., R.R. Mercer, B.A. Freeman, L.-Y. Chang, and J.D. Crapo.** Distribution of lung cell numbers and volumes between alveolar and nonalveolar tissue. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146:454-456, 1992.
169. **Strieter, R.M., D.G. Remick, J.P. Lynch III, M. Genord, C. Raiford, R. Spengler, and S.L. Kunkel.** Differential regulation of tumor necrosis factor-alpha in human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes: A cellular and molecular analysis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1:57-63, 1989.
170. **Takeya, M., T. Yoshimura, and E.J. Leonard.** Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody. *Hum. Pathol.* 24:534-539, 1993.
171. **Taub, D.D., and J.J. Oppenheim.** Review of the chemokine meeting. The third international symposium of chemotactic cytokines. *Cytokine* 5:175-179, 1993.
172. **Teare, G.F., P.K. Horan, S.E. Slezak, C. Smith, and J.B. Hay.** Long-term tracking of lymphocytes in vivo: The migration of PKH-labeled lymphocytes. *Cell. Immunol.* 134:157-170, 1991.

-
173. **Tedder, T.F., D.A. Steeber, and P. Pizcueta.** L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J. Exp. Med.* 181:2259-2264, 1995.
174. **Tedder, T.F., W. Luskinskas, and G.S. Kansas.** Regulation of leukocyte migration by L-selectin: mechanisms, domains and ligands. *Behring Inst. Mitt.* 92:165-177, 1993.
175. **Uguccioni, M., M. D'Apuzzo, M. Loetscher, B. Dewald, and M. Baggiolini.** Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 25:64-68, 1995.
176. **Ulevitch, R.J.** Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Adv. Immunol.* 53:267-284, 1993.
177. **Ulich, T.R., J. del Castillo, M. Keys, G.A. Granger, and R.X. Ni.** Kinetics and mechanisms of recombinant human IL-1 and TNF α -induced changes in circulation numbers of neutrophils and lymphocytes. *J. Immunol.* 139:3406-3415, 1987.
178. **Ulich, T.R., L.R. Watson, S. Yin, K. Guo, P. Wang, H. Thang, and J. del Castillo.** The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am. J. Pathol.* 138:1485-1496, 1991.
179. **VanOtteren, G.M., R.M. Strieter, S.L. Kunkel, R. Paine III., J.M. Danforth, M.D. Burdick, and T.J. Standiford.** Compartmentalized expression of RANTES in a murine model of endotoxemia. *J. Immunol.* 154:1900-1908, 1995.
180. **Vaddi, K., and R.C. Newton.** A comparison of biological responses of human monocytes and THP-1 cells to chemokines of the integrin- β family. *J. Leukocyte Biol.* 55:756-762, 1994.
181. **Vaddi, K., and R.C. Newton.** Regulation of monocyte integrin expression by β -family chemokines. *J. Immunol.* 153:4721-4732, 1994.
182. **Valente, A.J., D.T. Graves, C.E. Vialle-Valentin, R. Delgado, and C.J. Schwartz.** Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by non-human primate vascular cells in culture. *Biochemistry* 27:4162-4168, 1988.

-
- 183. Van Furth, R.** Phagocytic cells: development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. J.I. Gallin, I.M. Goldstein, and R. Snyderman, editors. Raven Press, New York 281-295, 1988.
- 184. Walter, U.M., and A.C. Issekutz.** Role of E- and P-selectin in migration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes to cytokine and chemoattractant-induced cutaneous inflammation in the rat. *Immunology* 92:290-299, 1997.
- 185. Wang, J.M., B. Sherry, M.J. Fivash, D.J. Kelvin, and J.J. Oppenheim.** Human recombinant macrophage inflammatory protein-1 α and - β and monocyte chemotactic and activating factor utilize common and unique receptors on human monocytes. *J. Immunol.* 150:3022-3029, 1993.
- 186. Wang, Y.L., and M.B. Goren.** Differential and sequential delivery of fluorescent lysosomal probes into phagosomes in mouse peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* 104:1749-1754, 1987.
- 187. Welbourn, C.R.B., and Y. Young.** Endotoxin: septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br. J. Surg.* 79:998-1003, 1992.
- 188. Wiedermann, C.J., E. Kowald, N. Reinisch, C.M. Kaehler, I. Von Leuticau, J.M. Pattison, P. Huie, R.K. Sibley, P.J. Nelson, and A.M. Krensky.** Monocyte haptotaxis induced by the RANTES chemokine. *Curr. Biol.* 3:735-743, 1993.
- 189. Wilson, R.W., C.M. Ballantyne, C.W. Smith, C. Montgomery, A. Bradley, W.E. O'Brien, and A.L. Beaudet.** Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. *J. Immunol.* 151:1571-1578, 1993.
- 190. Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, and J.C. Mathison.** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433, 1990.
- 191. Yla-Herttuala, S., B.A. Lipton, M.E. Rosenfeld, T. Sarkioja, T. Yoshimura, E.J. Leonard, J.L. Witztum, and D. Steinberg.** Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5252-5256, 1991.

-
- 192. Yoshimura, T., and E.J. Leonard.** Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), the product of gene JE. *J. Immunol.* 144:2377-2383, 1990.
- 193. Yoshimura, T., and E.J. Leonard.** Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J. Immunol.* 145:292-297, 1990.
- 194. Yoshimura, T., N. Yuhki, S.K. Moore, E. Appella, M.I. Lerman, and E.J. Leonard.** Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): full length cloning, expression in mitogen stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 244:487-493, 1989.
- 195. Zachariae, C.O.C., A.O. Anderson, H.L. Thompson, E. Appella, A. Mantovani, J.J. Oppenheim, and K. Matsushima.** Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. *J. Exp. Med.* 171:2177-2182, 1990.
- 196. Ziegler-Heitbrock, H.W.L., and R. Ulevitch.** CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol. Today* 14:121-125, 1993.
- 197. Ziegler-Heitbrock, H.W.L.** Molecular mechanisms in tolerance to lipopolysaccharide. *J. Inflamm.* 45:13-26, 1995.
- 198. Zisman, D.A., S.L. Kunkel, R.M. Strieter, W.C. Tsai, K. Bucknell, J. Wilkowski, and T.J. Standiford.** MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. *J. Clin. Invest.* 99:2832-2836, 1997.

7. ANHANG

Verwendete Lösungen

| | | |
|---|---|----------------|
| PBS (Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung): | KCL | 0,20 g/l |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,20 g/l |
| | NaCl | 8,00 g/l |
| | Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O | 2,16 g/l |
| Paraformaldehydlösung: | Paraformaldehyd | 25,0 g/l |
| | KCl | 0,20 g/l |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,20 g/l |
| | NaCl | 8,00 g/l |
| | Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O | 2,16 g/l |
| Erythrozytenlysepuffer 10fach: | NH ₄ Cl | 82,6 g/l |
| | KHCO ₃ | 10,0 g/l |
| | Titriplex 3 | 0,42 g/l |
| TE-Puffer (PCR-Ansatz): | Tris-HCl 0,1 M | 100 ml, pH 8,0 |
| | EDTA 0,1 M | 10 ml |
| | Ad 800 ml Aqua dest. | |

Materialien und Bezugsquellen

| | |
|--|---|
| Abboath 26G Venenverweilkatheter | Abbott, Sligo, Irland |
| Aether zur Narkose | Riedel-deHaen, D-Seelze |
| Agarosegel NuSieve | Biozym, D-Oldendorf |
| Ammoniumchlorid | Sigma, D-München |
| Amöbozytenlysat-Assay Coatest | Chromogenix, Mölndal, Schweden |
| Anti-Maus CD45 Antikörper | Dako, D-Hamburg |
| Aqua destillata | Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen |
| Balb/c Mäuse | Charles River, D-Sulzfeld |
| Bepanthen Augensalbe | Hoffmann-LaRoche, D-Grenzach-Whylen |
| Blutprobenröhrchen mit EDTA | KABE Labortechnik, D-Nürnberg |
| Calibrite 3 Beads | Becton Dickinson, D-Heidelberg |
| Dithiotreitol (DTT) | Gibco, D-Karlsruhe |
| dNTP | Perkin Elmer, Norwalk, CA, USA |
| EDTA | Merck, D-Darmstadt |
| Einwegmaterial aus Polypropylen, Polyethylen, Polystyren | Eppendorf, D-Hamburg; Falcon, D-Heidelberg; Costar, D-Bodenheim |
| Ethanol 100% | Riedel-deHaen, D-Seelze |
| Ethidiumbromid | Sigma, D-München |
| Fc-Block (CD16/CD32) | Pharmingen, D-Hamburg |
| FCS (Fötales Kälberserum) | Gibco, D-Karlsruhe |
| FITC-konjugierter Ziege-anti-Ratte-Antikörper | Serotec, D-München |

| | |
|--|---|
| Giemsa-Lösung | Merck, D-Darmstadt |
| Guanidinthiocyanat | Roth, D-Karlsruhe |
| Hämatoxylin-Eosin | Merck, D-Darmstadt |
| HSA (Humanes Serumalbumin) | Sigma, D-München |
| Injekt F 1ml-Spritze | Braun, D-Melsungen |
| Isopropanol | Roth, D-Karlsruhe |
| Kaliumcarbonat | Sigma, D-München |
| Ketaminhydrochlorid (Ketavet [®]) | Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen |
| Levamisol | Dako, D-Hamburg |
| Magnesiumchlorid | Merck, D-Darmstadt |
| Maus TNF- α ELISA-Kit | R&D Systems, D-Wiesbaden |
| May-Grünwald-Lösung | Merck, D-Darmstadt |
| Methylgrünlösung | Merck, D-Darmstadt |
| MMLV Reverse Transkriptase | Gibco, D-Karlsruhe |
| Murines rekombinantes JE/MCP-1, MIP1- α und RANTES | R&D Systems, D-Wiesbaden |
| Natriumacetat | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Natriumchlorid 0,9% | Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen, Fresenius, D-Bad Homburg |
| Natriumhypochloridlösung | Becton Dickinson, D-Heidelberg |
| Natriumazid | Merck, D-Darmstadt |
| Omnican 30 1ml-Insulinspritze | Braun, D-Melsungen |
| Paraffin | Merck, D-Darmstadt |

| | |
|--|---|
| Paraformaldehyd | Sigma, D-München |
| PBS-/- 10% | PAA, D-Cölbe |
| PE-konjugierte und unkonjugierte Ratte-anti-Maus-Antikörper (CD11a, CD11b, CD14, CD49d, CD62L) | Pharmingen, D-Hamburg |
| Phenol/Chlorophorm | Roth, D-Karlsruhe |
| PKH26-PCL mit Verdünnungslösung | Sigma, D-München |
| Propidium-Iodid | Sigma, D-München |
| Random Hexanukleotide | Boehringer, D-Mannheim |
| Ratte-anti-Maus-Antikörper (F4/80, CD18, CD45, CD49d) | Serotec, D-München |
| RNAse-freie Deoxyribonuklease I | Sigma, D-München |
| RNAasin | Serva, D-Heidelberg |
| RPMI 1640 mit und ohne GlutaMAX I | Gibco, D-Karlsruhe |
| Salmonella abortus LPS | Sigma, D-München |
| SDS-Lösung | Sigma, D-München |
| Sekundärer Ziege-anti-Ratte-Antikörper (AP-konjugiert) | Biotrend, D-Köln |
| Softasept-Desinfektionslösung | Braun, D-Melsungen |
| Sterile Kanülen | Teruma, Leuven, Belgien; Becton Dickinson, Drogheda, Irland |
| Sterile Skalpelle | PFM, D-Köln |
| TaqMan™ PCR Reaction Kit | Perkin Elmer, D-Weiterstadt |
| TissueTek | Sigma, D-München |

| | |
|---|---------------------------|
| Titriplex 3 | Sigma, D-München |
| TRIS | USB, Cleveland, Ohio, USA |
| Trypanblaulösung | Sigma, D-München |
| Tween-20 (Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate) | Sigma, D-München |
| VectorRed Substrat Kit | Alexis, D-Grünberg |
| Xylazinhydrochlorid (Rompun [®]) | Bayer, D-Leverkusen |
| Ziege-anti-Maus-Serum | Calbiochem, D-Schwalbach |

Geräte und Herstellernachweis

| | |
|--|---|
| ABI PRISM 7700 Sequence Detection System | Perkin Elmer, D-Weiterstadt |
| Brutschrank | Heraeus, D-Hanau |
| ELISA-Plattenphotometer | Molecular Devices, D-Ismaning |
| ELISA-Washer | Tecan, D-Crailsheim |
| FACStar ^{PLUS} Durchflußzytometer | Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA |
| Gene Amp PCR System 2400 | Perkin Elmer, D-Weiterstadt |
| Lichtmikroskop | Leica, D-Wetzlar |
| Mikropräparierbesteck | Hammacher, D-Solingen; Aesculap, D- Tuttlingen |
| Orthoplan Hellfeldmikroskop | Leica, D-Wetzlar |
| PCLYSIS Software | Becton Dickinson, D-Heidelberg |
| pH-Meter | Scott, D-Hofheim |
| Photometer | Perkin Elmer, D-Weiterstadt |
| Pipetten | Eppendorf, D-Hamburg; Abimed, D- Langenfeld |
| Rüttelgerät | Janke & Kunkel, D-Staufen |
| Stereomikroskop Leica MS 5 | Leica, D-Wetzlar |
| Zentrifugen | Heraeus, D-Hanau |
| Zytozentrifuge | Shandon, D-Frankfurt |

DANKSAGUNG

Herrn Dr. U. Maus danke ich ganz besonders für die experimentelle Betreuung dieser Arbeit. Für die Etablierung der Tierversuche und die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken waren sein fachliches Wissen und seine stete Bereitschaft zur Diskussion unerlässlich.

Herrn Prof. J. Lohmeyer möchte ich meinen Dank für die Überlassung des Themas aussprechen. Seine Hilfsbereitschaft und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit haben diese in hohem Maße geprägt.

Frau R. Maus möchte ich sehr herzlich für ihre Hilfe bei der Durchführung zellbiologischer und immunologischer Methoden sowie für das angenehme Arbeitsklima danken, welches ihre freundliche und hilfsbereite Art maßgeblich beeinflußt hat.

Frau H. Muth danke ich für die Zusammenarbeit auf molekularbiologischem Gebiet.

LEBENS LAUF

| | |
|--------------------|---|
| 10.11.1975 | Geburt in Offenburg Eltern: Dr. med. dent. Wilfried Herold und Gerlinde Herold |
| 1982-1986 | Grundschule Berghaupten |
| 1986-1995 | Gymnasium Gengenbach |
| Juni 1995 | Abitur |
| Oktober 1995 | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig- Universität Giessen |
| August 1997 | Physikum |
| August 1998 | I. Staatsexamen |
| Oktober 1998 | Beginn der Dissertation als Mitarbeiterin des Sonderforschungsbereichs „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen (Leiter: Prof. Dr. Werner Seeger) im Projekt “Transmigration von Monozyten zur Expansion ortsständiger Makrophagenpopulationen in der Lunge: experimentelle und klinische Untersuchungen“ (Leiter: Prof. Dr. J. Lohmeyer) |
| April 2001 | II. Staatsexamen |
| Mai 2001-März 2002 | Praktisches Jahr am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Giessen und am Klinikum der University of Toronto, Kanada |
| Mai 2002 | III. Staatsexamen |
| Seit Juni 2002 | ÄiP im Zentrum für Innere Medizin der JLU Gießen |