

Pulmonale Effekte auf das synthetisch
hergestellte Lipopeptid 2S-MALP-2:
In vivo und *in vitro* Untersuchungen zur
Charakterisierung der
Leukozytenakkumulation in der
Rattenlunge

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl. Biol. Anke Lührmann
geboren am 09.01.1966 in Melle

2002

Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. med. R. Pabst

Tag der Promotion: 02.07.2002

Abstrakt

Die Lunge ist mit ihrer großen Schleimhautoberfläche der Eintrittsort vieler Antigene. Obwohl Untersuchungen im Tiermodell in den letzten Jahren Aufschluss über Immunreaktionen in der Lunge gegeben haben, bleiben viele Aspekte zur Auslösung und Regulation einer Immunantwort noch ungeklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einige neue Erkenntnisse zur Initiation und Charakterisierung einer Zellakkumulation in der Lunge wie sie bei Infektionen oder Allergien beobachtet werden.

Für die Experimente stand das ursprünglich aus einem *Mycoplasma fermentans* Klon isolierte, nun synthetisch hergestellte Lipopeptid 2S-MALP-2 zur Verfügung. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 2S-MALP-2 in der Lage ist, über die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 6, Makrophagen zu aktivieren. Diese Aktivierung führte zu einer Akkumulation von Immunzellen im Peritonealraum von Mäusen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Wirkung von 2S-MALP-2 in der Lunge durch durchflusszytometrische, histologische und molekularbiologische Untersuchungsmethoden in verschiedener Hinsicht charakterisiert werden. Die lokale Applikation von 2S-MALP-2 führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Akkumulation verschiedener Leukozytenpopulationen in der Lunge. Die Zellzahlerhöhungen in den verschiedenen Kompartimenten der Rattenlunge unterschieden sich deutlich voneinander. Waren im Lungeninterstitium und im marginalen Pool die Zellzahlen nur bei einigen Zellpopulationen angestiegen, so kam es zu einem dramatischen Anstieg fast aller untersuchter Zellpopulationen im bronchoalveolären Raum. Dass diese Wirkung durch einen lokalen Effekt erzielt wurde, konnte durch die systemische Gabe des 2S-MALP-2 gezeigt werden. Hierbei kam es im Vergleich zur intratrachealen Applikation zu einem wesentlich geringeren Zellzahlanstieg in der Lunge.

Bei der intratrachealen Behandlung von jungen Ratten war die Zellzahl im Vergleich zu adulten Ratten in der BAL mit Ausnahme der T-Lymphozyten nicht höher. Überraschend war dagegen, dass die Zellzahlen im Lungengewebe bei den jungen Tieren in allen untersuchten Zellpopulationen signifikant höher waren. *In vitro* Versuche zeigten, dass die Stimulation von Alveoloarmakrophagen mit 2S-MALP-2 zu einer schnellen und kurzdauernden Erhöhung der Expression der mRNA für den TLR2 führt. Die These, dass die Aktivierung über den TLR vermutlich zu einer

Änderung des Mikromilieus in der Lunge führt, konnte durch den Nachweis der Erhöhung der chemotaktischen Aktivität und des Chemokins MCP-1 im Überstand der bronchoalveolären Lavage sowie im Lungengewebe bekräftigt werden.

In Inhalationsversuchen mit 2S-MALP-2 über mehrere Wochen konnte die Zunahme von Bronchus-assoziiertem lymphatischem Gewebe in der Rattenlunge dokumentiert werden.

In einem Modell für Metastasierung in der Lunge wurde gezeigt, dass es bei gleichzeitiger Applikation von Tumorzellen und 2S-MALP-2 zu einer deutlichen Reduktion der Metastasenzahl kommt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass lokal appliziertes 2S-MALP-2 ein potenter Immunstimulator für die Lunge ist. Durch die lokale Anwendung von 2S-MALP-2 könnten in der Zukunft grundlegende Regulationsmechanismen zur Aufnahme und Wanderung von Immunzellen in der Lunge untersucht werden. Außerdem könnte möglicherweise durch gezielte Vorbehandlung der Lunge mit 2S-MALP-2, Vakzinierungsbehandlungen verbessert werden und 2S-MALP-2 könnte bei der Bekämpfung von Metastasenbildung in der Lunge zum Einsatz kommen.

Lunge – Immunreaktion - Lipopeptid

Abstract

The lung is continuously in contact with different inhaled antigens because of its great mucosal surface. Although immune mechanisms of the lung were investigated in animal models in the last few years, many aspects of induction and regulation of an immune response are unknown. The present data provide new information about the initiation of an immune response and characterise a cell accumulation in the lung comparable to infectious and allergic inflammation.

Previous studies had shown that the synthetic lipopeptide 2S-MALP-2 induces the activation of peritoneal macrophages via the Toll-like receptor 2 and 6 and causes an influx of immune cells after intraperitoneal injection in mice.

The purpose of the present study was to investigate the effect of 2S-MALP-2 after local application in the lung. For better differentiation of compartment-specific effects the rat model was used. The accumulated cells were characterised by flow cytometry, histology and molecular methods. The intratracheal instillation of 2S-MALP-2 induced a dose and time dependent differential increase of leukocyte numbers in lung compartments of Lewis rats. In the lung interstitium and the marginal vascular pool the number of cells were increased in certain populations, whereas a dramatic increase of all subsets was observed in the bronchoalveolar space. This had obviously been caused by the local administration, because after intraperitoneal application of 2S-MALP-2 the cell counts in the BAL were significantly lower. The chemotactic activity in the supernatant of the BAL was elevated, as was the concentration of the chemokine MCP-1 in the supernatant and the lung interstitium. In weaned rats the number of leukocytes in the BAL were not usually increased. Unexpectedly, the cellularity in this lung tissue was significantly increased. In vitro experiments documented the transient increase of TLR2 mRNA after 2S-MALP-2 stimulation. These results support the hypothesis that the activation via the TLR causes a change in the microenvironment of the lung compartments. Repetitive inhalation of 2S-MALP-2 lead to hyperplasia of bronchus-associated lymphatic tissue, and pulmonary administration of 2S-MALP-2 reduced lung micrometastases in a rat-metastasis-tumor model.

In conclusion, the present study showed that 2S-MALP-2 is a potent immune stimulator after local application in the lung. In future 2S-MALP-2 can be used to investigate fundamental principles of regulatory mechanisms in lung immunity. 2S-

MALP-2 might be of relevance in vaccination strategies and in defence against micrometastases in the lung.

lung – immune reaction - lipopeptide

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immunreaktionen in der Lunge	1
1.1.1	Unspezifische Immunabwehr	1
1.1.2	Spezifische Immunabwehr	3
1.2	Kompartimentierung der Lunge im Rattenmodell	5
1.3	Immunzellen in der Lunge	8
1.4	Toll-like Rezeptoren (TLR) auf Makrophagen und dendritischen Zellen	9
1.5	Das synthetisch hergestellte Lipopeptid MALP-2	10
1.6	Die Wirkung von 2S-MALP-2 in einem Metastasierungsmodell	11
1.7	Fragestellungen	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Chemikalien	15
2.2	Puffer und Medien für Versuchstierbehandlung, Präparation, Zellisolation und charakterisierung	15
2.3	Puffer und Medien für <i>in vitro</i> Versuche	17
2.4	Geräte	18
2.5	Versuchstiere	19
2.6	MALP-2	19
2.7	Behandlungsarten und Zeitpläne	20
2.8	Organentnahme und Zellisolation	22
2.9	Zytopräparate und Paraffinschnitte	24
2.10	Durchflusszytometrische Detektion von Oberflächenantigenen	24
2.11	Nachweis von Oberflächenantigenen auf Zytopräparaten	25
2.12	Nachweis von 2S-MALP-2 im Lungengewebe: NO Freisetzungstest	25
2.13	Nachweis der TLR 2 mRNA auf stimulierten BAL Zellen	27
2.14	Bestimmung der chemotaktischen Aktivität im BAL Überstand	29
2.15	Bestimmung des MCP-1 Gehaltes	29
2.16	Semiquantitative Auswertung der Lungenhistologien mit BALT	30
2.17	Untersuchungen im Metastasierungsmodell	30
2.18	Statistische Auswertung	31

3	Ergebnisse	32
3.1	Charakterisierung der Wirkung und Wirkungsweise nach Applikation von 2S-MALP-2 in der Ratte	32
3.1.1	Leukozyten akkumulieren nach der Applikation von 2S- MALP-2 im bronchoalveolären Raum	
3.1.2	Die effektive 2S-MALP-2 Aktivität im Lungengewebe	34
3.1.3	Dosis abhängige Leukozyten-Akkumulation im bronchoalveolären Raum nach i.t. 2S-MALP-2 Applikation	36
3.1.4	Lungenmorphologie nach verschiedenen Dosen 2S-MALP-2 an Tag 3	37
3.1.5	Zeitabhängige Leukozyten-Akkumulation im bronchoalveolären Raum nach 2.5 µg 2S-MALP-2 Applikation	39
3.1.6	Zellverteilung in den verschiedenen Lungenkompartimenten und im Blut nach Applikation von 2.5 µg 2S-MALP-2	40
3.1.7	Charakterisierung von MHC II und Ox62 ⁺ DC	42
3.1.8	Leukozytenzahlen in den drainierenden Lymphknoten nach 2S-MALP-2 Applikation	44
3.2	<i>In vitro</i> Effekte von 2S-MALP-2	45
3.2.1	2S-MALP-2 abhängige Expression der TLR2 mRNA in AM aus der Rattenlunge	45
3.2.2	Chemotaktische Aktivität im BAL Überstand	46
3.2.3	MCP-1 in der Lunge von 2S-MALP-2 behandelten Tieren und in der Zellkultur von 2S-MALP-2 stimulierten BAL Zellen	47
3.3	Induktion von BALT durch die mehrmalige Inhalation von 2S-MALP-2 über 6 Wochen	49
3.4	Vergleich von jungen mit adulten Ratten	52
3.4.1	Morphologische Unterschiede bei jungen und adulten Ratten in der Lungenstruktur	52
3.4.2	Unterschiedliche Zellpopulationen in der BAL und im Lungeninterstitium von jungen und adulten Ratten	53
3.4.3	Zellpopulationen in der BAL und im Lungeninterstitium von jungen Ratten im Vergleich zu adulten Ratten nach i.t. Applikation von 2S-MALP-2	55
3.5	Auswirkungen der Aktivierung des unspezifischen Immunsystems durch 2S-MALP-2 auf die Bildung von Mikrometastasen in der Lunge	59

4	Diskussion	60
4.1	In einem Rattenmodell kann durch die Applikation des Lipopeptids 2S-MALP-2 ein Anstieg von Immunzellen in der Lunge beobachtet werden	60
4.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen geben Aufschluss über den Wirkmechanismus von 2S-MALP-2 mit den Immunzellen der Lunge	65
4.3	Nach wiederholter Applikation von 2S-MALP-2 kann BALT induziert werden	67
4.4	Nach der Behandlung mit 2S-MALP-2 kann eine Zellakkumulation in der Lunge von jungen Ratten beobachtet werden	69
4.5	Die Bildung von Mikrometastasen kann durch 2S-MALP-2 reduziert werden	70
4.6	2S-MALP-2 im Vergleich zu bekannten Lungenimmunstimulanzien	71
4.7	Die Immunstimulanz 2S-MALP-2: Der Einsatz eines Lipopeptid ermöglicht die Untersuchung von Initiation und Regulation einer Leukozytenakkumulation in der Rattenlunge	72
4.8	Ausblick	73
5	Literaturverzeichnis	74
6	Abkürzungsverzeichnis	87

1 Einleitung

1.1 Immunreaktionen in der Lunge

Das Immunsystem des Menschen wird täglich mit einer großen Zahl von mikrobiellen Erregern (Bakterien, Viren, Protozoen und Pilzen) konfrontiert. Neben der Haut und dem Darm stellt die Lunge mit einer Oberfläche von etwa 150 m² eine relativ große Angriffsfläche für Antigene dar. Da sie täglich mit etwa 10.000 L (52) Außenluft in Verbindung kommt, können Partikel und Keime unterschiedlicher Größe in den Respirationstrakt gelangen und eine Immunreaktion auslösen. Je nach Balance zwischen Virulenz des Antigens und Stärke des Immunsystems verläuft eine Immunreaktion ohne oder mit Krankheitszeichen und kann in einigen Fällen entweder zu einer zeitlich begrenzten oder permanenten Immunität führen. Spezifische Regelmechanismen müssen gewährleisten, dass es zu keiner überschießenden Immunreaktion nach Antigenaufnahme kommt. Eine Fehlregulation könnte u.a. zu Krankheiten wie Asthma bronchiale und Sarkoidose führen (36, 22; 61). Grundlegende Untersuchungen sind notwendig, um Regelmechanismen von Immunreaktionen in der Lunge zu verstehen. Im folgenden Abschnitt soll deshalb zunächst ein kurzer Überblick über das unspezifische und spezifische Immunsystem gegeben werden.

1.1.1 Unspezifische Immunabwehr

Die Zuleitung der Luft in die Lunge geschieht über die Trachea, die sich zunächst in zwei Stammbronchien, dann weiter in Lappenbronchien bis hin zu den Alveolen verzweigt. Der gesamte Respirationstrakt ist mit einer Schleimhautschicht ausgekleidet, die eine Barrierefunktion gegenüber Antigenen ausübt. Im oberen Respirationstrakt wird sie durch ein mehrreihiges Flimmerepithel in der Abwehr unterstützt. Der Flimmerschlag gewährleistet den Abtransport von Staubteilchen und Schleim aus den Atemwegen (94).

Zusätzlich dazu bildet das aus Lipiden und spezifischen Proteinen bestehende Surfactantsystem eine oberflächliche Barriere zwischen exogenen Stimuli und dem Bronchialepithel (35). Das Surfactantsystem ist in der Lage, die Zellproliferation, die Produktion von reaktiven Oxidantien und die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren zu inhibieren. Diese Effekte unterstützen die Aufrechterhaltung der normalen Lungenphysiologie und bewirken einen Schutz gegenüber eindringenden Antigenen (27). Zum unspezifischen Immunsystem werden außerdem die Defensine gezählt. Sie werden von neutrophilen Granulozyten und interstitiellen Paneth-Zellen (alpha-Defensine) und auch von Epithelzellen (beta-Defensine) sezerniert. Aus *in vitro* Studien über beta-Defensine ist bekannt, dass sie chemotaktisch auf unreife dendritische Zellen (DC), Makrophagen und „Memory“ T-Zellen (97, 87) wirken. Welche Mechanismen der Antigene zum Überwinden der Schleimhautbarriere führt, ist im Einzelnen noch unklar.

Makrophagen und DC zählen zu den sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APC) und gelten als zelluläre Werkzeuge der unspezifischen Abwehr. Es ist bekannt, dass durch die Anlagerung von Enzymen des Komplementsystems (Opsonierung) die Phagozytose effizienter werden (1). Zusätzlich zur Präsentation über die MHC Moleküle können die dendritischen Zellen den B-Zellen native Antigene präsentieren. Antigene, die in der Lunge von APC aufgenommen werden, gelangen durch die APC über die Lymphbahnen in die drainierenden Lymphknoten (47, 49). Hier werden sie den spezifischen T-Lymphozyten präsentiert. Durch die Freisetzung von Zytokinen sind die Makrophagen zusätzlich in der Lage chemotaktisch auf Lymphozyten, Neutrophile und andere Immunzellen einzuwirken (84, 19). Zellen der unspezifischen Immunabwehr sind sowohl für die Beseitigung von eindringenden Antigenen zuständig, als auch für die Beseitigung von Zellen und Zellfragmenten, die bei physiologischen Zellalterungen entstehen (8). Über genaue Regelmechanismen und über die Verbindung des unspezifischen mit dem spezifischen Immunsystems in der Lunge gibt es nur wenige Daten.

1.1.2 Spezifische Immunabwehr

Für eine spezifische zelluläre Immunreaktion sind in der Hauptsache die T-Lymphozyten zuständig. Die APC gelangen mit einem prozessierten Antigen in den parakortikalen Bereich (hier vorwiegend T-Zellen vorhanden) der drainierenden Lymphknoten und präsentieren den vorbeiströmenden naiven Lymphozyten die in den MHC Molekülen eingebundenen Peptidfragmenten. Nur ein für das Antigen spezifischer T-Lymphozyt ist in der Lage über seinen Rezeptor (TCR) fest an das MHC-Molekül zu binden. Ein T-Lymphozyt kann nur ein oder eine kleine Anzahl ähnlicher spezifischer Peptide erkennen (2). Der zusätzliche Kontakt mit verschiedenen Korezeptoren führt zu einer Aktivierung des Lymphozyten, in deren Verlauf es zu einer Proliferation der antigenspezifischen Zelle kommt. Dieser Vorgang wird als klonale Expansion bezeichnet (1), aus dem als Produkt aktivierte Lymphozyten hervorgehen. Die spezifischen Effektorzellen gelangen über die efferenten Lymphbahnen in den Blutkreislauf und können somit in den Respirationstrakt zurückkehren (6). Ob oder inwieweit dies eine gerichtete Migration ist und wodurch die Rückkehr der Effektorzellen reguliert wird, ist für die Lunge im Einzelnen unbekannt.

Antigene aus den verschiedenen zellulären Kompartimenten werden von unterschiedlichen MHC Molekülen erkannt und agieren mit unterschiedlichen T-Zellen. MHC Klasse I Moleküle sind überwiegend für die Präsentation von Viren zuständig, die sich im Zytosol vermehren. Die MHC Klasse I Moleküle werden hauptsächlich von den zytotoxischen T-Zellen erkannt, die durch das Vorhandensein des CD8 Korezeptoren charakterisiert sind. Sie sind in der Lage, infizierte Zellen direkt zu zerstören. MHC Klasse II Moleküle präsentieren Peptidfragmente von Antigenen, die in intrazellulären Vesikeln abgebaut werden. Sie agieren mit den CD4 Korezeptor tragenden T-Helferzellen, die wiederum die Makrophagen durch Ausschüttung verschiedener Zytokine aktivieren und so zu einer erfolgreicherer Bekämpfung des Antigens verhelfen können (1).

B-Zellen sind ein weiterer wichtiger Bestandteil der spezifischen Immunabwehr und charakterisieren das humorale Abwehrsystem. Sie sind in

der Lage natives, für sie spezifisches Antigen aufzunehmen, was ihnen von den interdigitierenden dendritischen Zellen im Lymphknoten präsentiert wird. Nach ihrer Bindung transportieren sie das Antigen in ihr Zellinneres, bauen es ab und präsentieren es auf MHC Klasse II Molekülen an ihrer Zelloberfläche. Nur die Bindung mit einer spezifischen T-Helferzelle (T_H), die Bindung des CD40 mit dem CD40 Liganden und die Ausschüttung von Zytokinen durch die T-Helferzellen führt zu einer Aktivierung der B-Zellen. Diese sind dann in der Lage spezifische Antikörper zu bilden, die durch Neutralisierung Antigene eliminieren können (1). Experimente mit Hunden in der Arbeitsgruppe von Bice haben gezeigt, dass die Anzahl der Antikörper bildenden Zellen nach einer lokalen Immunisierung mit Schaferythrozyten (SRBC) in einem Teil der Lunge deutlich höher ist als im Kontrollbereich derselben Lunge. Es wird vermutet, dass das periphere Blut die Quelle der Antikörper bildenden Zellen ist (9). Warum die Antikörper bildenden Zellen über Jahre in den mit SRBC behandelten Bereichen in höherer Zahl vorliegen und durch welche Mechanismen dies reguliert wird ist unklar.

Um eine überschießende Reaktion auf mikrobielle Antigene zu verhindern, müssen die Mechanismen der zellulären und humoralen Immunabwehr herabreguliert werden. Einige spezifische T-Lymphozyten überleben und werden als Gedächtniszellen („Memory-Zellen“) bezeichnet. Sie zeichnen sich durch veränderte Expression ihrer Oberflächenmoleküle und verminderter Zytokinausschüttung gegenüber den naiven Zellen aus. Bei einem zweiten Kontakt des Organismus mit dem gleichen Antigen gewährleisten die T-Gedächtniszellen eine schnellere und stärkere Reaktion, da sie schneller in der Lage sind zu proliferieren (1). Die Bildung von Antikörper nach dem ersten Antigenkontakt verläuft über die Lungen-drainierenden Lymphknoten (9, 10). Die zweite Immunreaktion auf das spezifische Antigen findet wahrscheinlich unabhängig von den drainierenden Lymphknoten statt. Es ist wahrscheinlich, dass B-Zellen in der Lunge direkt Antikörper bilden. Hierbei ist unklar, durch welchen Mechanismus oder Stimulus die B-Zellen in die Lunge gelangen (11). Für die Regulation der Vorgänge sind wahrscheinlich Zytokine und andere

Mediatoren verantwortlich. Hierbei handelt es sich häufig um ein ganzes Netzwerk von Reaktionen, die sich gegenseitig beeinflussen.

Aus didaktischen Gründen wurde in dieser Arbeit zwischen „unspezifischen“ und „spezifischen“ Immunsystem unterschieden. Bei fast allen Immunreaktionen gibt es Interaktionen zwischen beiden Systemen, z.B. würden die Lymphozyten ihre Funktionen nicht ohne die APC ausüben können. Entsprechend ist inzwischen auch deutlich geworden, dass das „zelluläre“ und „humorale“ Immunsystem nicht unabhängig voneinander betrachtet werden darf. Ohne die T_H -Lymphozyten würde eine effektive B-Lymphozytenantwort mit der entsprechenden Antikörperproduktion nicht möglich sein.

1.2 Kompartimentierung der Lunge im Rattenmodell

Untersuchungen in der humanen Lunge müssen sich in der Regel aus ethischen Gründen auf die Zellen des bronchoalveolären Raumes, die durch eine Lavage gewonnen werden können und auf Lungengewebe, das nach operativen Eingriffen oder Obduktionen zur Verfügung steht, beschränken. Im Tiermodell ist es dagegen möglich und sinnvoll die Lunge in verschiedene Kompartimente einzuteilen (66). Hierbei kann zwischen dem Bronchialepithel, dem bronchoalveolären Raum, dem bronchialen Gefäßbett (marginaler Pool) und dem Lungeninterstitium unterschieden werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Qualität und Quantität der Zellpopulationen in den Kompartimenten differiert (68, 31, 25). Es gibt wenig Daten darüber, inwieweit die Zellen zwischen den verschiedenen Kompartimenten migrieren können oder eine Differenzierung in spezifische Subpopulationen eintritt. Weiter ist unklar, wodurch die Wanderung initiiert und reguliert wird. Bei wenigen Spezies findet sich zusätzlich zu den genannten Kompartimenten das sogenannte Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT) in der Schleimhaut (67). Ähnlich wie die Peyerschen Plaques im Darm wird ihm eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Antigenen zugeschrieben (16, 13, 12,

80, 86). Beim BALT handelt es sich um eine Ansammlung von Lymphozyten in Form eines Lymphfollikels. BALT ist in der Lamina propria der Bronchialschleimhaut zu finden, besitzt keine Kapsel und kann daher von den bronchialen Lymphknoten unterschieden werden. Das Gewebe besteht aus einem Keimzentrum, das sich aus B-Lymphozyten und Makrophagen zusammensetzt, und T-Lymphozyten, die um diese Region herum angeordnet sind (34). Die Eintrittspforte für Lymphozyten in das BALT sind die hochendothelialen Venulen (HEV), der Austritt geschieht über Lymphgefäße (63). Im Epithel über dem BALT befinden sich M-Zellen, dies sind spezifische Epithelzellen, die eine effektive Antigenaufnahme ermöglichen und damit eine Immunantwort auslösen können. Damit kann BALT, ähnlich wie die Peyerschen Plaques in der Darmwand, eine strukturelle Grundvoraussetzung für Immunreaktionen der Lunge sein. Lymphatisches Gewebe sollte nur als BALT bezeichnet werden, wenn eine enge Verbindung zur Bronchus-schleimhaut besteht. Die im peripheren Lungengewebe liegenden lymphoiden Ansammlungen dürfen dagegen nicht als BALT bezeichnet werden. BALT ist regelmäßig in Kaninchen zu finden (67). Im humanen Lungengewebe wurde ein Auftreten im Kindes- und Jugendalter beobachtet, im Erwachsenenalter trat BALT nur noch mit wenigen Ausnahmen auf (34, 18).

Über die frühkindliche Morphologie der Lunge (86) und die Entwicklung des Lungenimmunsystems gibt es beim Menschen und auch in Tiermodellen nur sehr wenige Daten (23). Die Prägung durch verschiedene Antigene in den ersten Lebensjahren scheint einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems zu haben. Epidemiologische Daten zeigen, dass es eine enge Verbindung zwischen Antigenexposition in der frühen Kindheit und der Entstehung von allergischen Lungenerkrankungen wie dem Asthma bronchiale gibt (33). Hierbei wird die Hypothese vertreten, dass, wenn in der Kindheit vermehrt T_H2 -Lymphozyten mit dem typischen dazugehörigen Zytokinmuster (u.a. Interleukin (IL) 4 und IL 13) gebildet werde, die Wahrscheinlichkeit wesentlich größer ist an Asthma zu erkranken. Muss sich das Immunsystem in der Kindheit dagegen mit Antigenen auseinandersetzen, die zu einer T_H1

Antwort führen, so ist die Wahrscheinlichkeit im späteren Lebensalter an Asthma zu erkranken geringer (15, 92, 73). Um diese Hypothese in einem Tiermodell zu untersuchen, sollten in dieser Arbeit zunächst grundlegende Informationen über die Zusammensetzung und Verteilung von Immunzellen in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge junger Ratten erarbeitet werden. Außerdem soll die Reaktion auf das Lipopeptid 2S-MALP-2 charakterisiert werden und mit den Daten aus Versuchen mit adulten Ratten verglichen werden. Die zum frühest möglichen Zeitpunkt vom Muttertier abgesetzten Ratten wurden in dieser Arbeit als „junge Ratten“ bezeichnet. Die Tiere hatten ein Gewicht von etwa 80 g, im Vergleich dazu wogen die adulten Tiere etwa 250 g.

1.3 Immunzellen in der Lunge

Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und Lymphozyten werden als Hauptinitiatoren und -regulatoren einer Immunantwort in der Lunge angesehen. Sie reagieren mit veränderter Expression ihrer Oberflächenmoleküle und Ausschüttung von Stoffwechselprodukten auf eine Veränderung ihrer physiologischen Umgebung (8).

Makrophagen nehmen den größten Anteil der Zellpopulationen in der Lunge ein. Morphologisch und funktionell unterscheiden sich Makrophagen stark voneinander (59, 78, 38). Aus dem Tiermodell ist bekannt, dass die Zellen, die durch eine bronchoalveoläre Lavage gewonnen werden, einerseits aus Alveolarmakrophagen (AM) bestehen, andererseits aber auch Makrophagen aus dem Bereich der Bronchien und Bronchiolen beinhalten (52). Interstitielle Makrophagen (IM) unterscheiden sich wahrscheinlich auf Grund des spezifischen Mikromilieus und physiologischen Aufgabe gegenüber den AM. Dies wird durch voneinander unterschiedliche Expression der Oberflächenmoleküle deutlich (64). Die Erneuerung der Makrophagenpopulation wird durch zwei Mechanismen gewährleistet. Die meisten AM differenzieren sich aus Blutmonozyten, die durch die Chemokine Makrophage inflammatory

protein- (MIP-) 1 und 2 und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) angelockt werden und durch die pulmonalen Gefäße in die Lunge gelangen. Ein geringerer Anteil an AM entsteht durch lokale Proliferation der bereits vorhandenen AM (14). Durch ihre Funktion als akzessorische Zellen bei einer Immunantwort bilden sie mit anderen APC ein Schutzschild gegenüber eindringenden Mikroorganismen. Die Fähigkeit zu phagozytieren und im aktivierten Zustand Mediatoren zu synthetisieren und freizusetzen, lassen AM zu einer gefährlichen Waffe gegenüber Antigenen werden. Eine spezifische Regulation muss zusätzlich dazu verhindern, dass diese Mediatoren zu einer Schädigung des Lungengewebe führen. Über diese Regulationsmechanismen ist im Einzelnen nur wenig bekannt.

DC sind in allen Bereichen des Respirationstraktes zu finden. Einzelne DC bilden hier häufig zusammen ein Netzwerk antigenpräsentierender Zellen (60, 37). Ihre einzigartige Morphologie spiegelt die vielseitige, spezifische Funktion wider. Die ausgedehnte Oberfläche ermöglicht die Erkennung, die Interaktion mit Antigenen und die Aktivierung der antigenspezifischen T-Lymphozyten (42, 46, 93). Eine im Knochenmark gebildete pluripotente Stammzelle bildet die Vorläuferzelle der DC, die sich in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge aufhalten (37). Die DC exprimieren je nach Aktivierungszustand unterschiedliche Moleküle auf ihrer Oberfläche. Der jeweilige Aktivierungszustand ist wahrscheinlich abhängig von dem lokalen Mikromilieu des Gewebes, welches durch die dort exprimierten Zytokine bestimmt wird (37).

Lymphozyten spielen zusammen mit den APC bei der Immunabwehr eine große Rolle (72). Aus Untersuchungen im Rattenmodell (70) ist bekannt, dass Lymphozyten kontinuierlich durch den Organismus zirkulieren. Sie gelangen durch das Blut in die lymphatischen und nicht lymphatischen Organe und über die Lymphgefäße zurück ins Blut. Intratracheal applizierte Lymphozyten haben den bronchoalveolären Raum z.T. bereits 15 min später verlassen und sind im interstitiellen Alveolargewebe zu finden. Bereits 6 h nach der Instillation konnten die Zellen in den drainierenden Lymphknoten (LK) der

Lunge wiedergefunden werden (48). Die Zahl der Lymphozyten in der Lunge ist abhängig von der Eintritts- und Austrittsrate und ihrem Schicksal während der Passage (69). In der gesunden Lunge ist die Proliferations- und Apoptoserate gering. Im Gegensatz dazu kommt es während einer Inflammation, einer toxischen oder allergischen Reaktion zu einem raschen Anstieg der Lymphozytenzahl. Dies wird einerseits durch einen verstärkten Eintritt aber auch durch eine Erhöhung der Proliferationsrate dort vorhandener Lymphozyten verursacht. Durch einen verstärkten Ausstrom oder durch lokale Apoptose kann sich die Zahl der Lymphozyten ebenso schnell wieder verringern (69). Über die für diese Beobachtungen wichtigen Wirkmechanismen und regulierenden Faktoren wie z.B. Zytokine und Chemokine gibt es nur wenige Erkenntnisse aus Studien am Menschen und aus dem Tiermodell.

1.4 Toll-like Rezeptoren (TLR) auf Makrophagen und dendritischen Zellen

Als Mediatoren spielen die TLR eine große Rolle bei der Detektion von verschiedenen mikrobiellen Mikroorganismen (89). Makrophagen und DC exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene TLR. Im humanen System wurden bis heute zehn verschiedene TLR beschrieben, die häufig konstitutiv exprimiert werden (50). Untersuchungen haben ergeben, dass die TLR Familie spezifische Rezeptoren zur Aktivierung des Immunsystems besitzen. „Pathogen-associated molecular-pattern“ (PAMP) z.B. Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan, Lipoteichonsäuren, Lipoproteine und bakterielle CpG DNA sind in der Lage Immunreaktionen direkt über den TLR hervorzurufen (41, 90). In der Lunge ist die Wirkung von LPS nach der i.t. Applikation untersucht. Nach der Behandlung mit LPS kann das Auftreten einer starken intraalveolären Entzündungsreaktion beobachtet werden (88). Diese wird durch die Aktivierung von Makrophagen über den TLR 4 verursacht (81), die infolge dessen proinflammatorische Zytokine und andere Mediatoren

freisetzen, die wiederum den gesamten Organismus in einen Zustand des septischen Schocks bringen und ihn schädigen können. Diese Reaktion auf LPS bleibt aus, wenn die Behandlung an TLR 4 „knock-out“ Mäusen durchgeführt wird (71, 53). Es ist bekannt, dass ein synthetisch hergestelltes Lipopeptid (2*S*-MALP-2) über TLR Makrophagen aktivieren kann (82, 83). Ob es nach i.t. Applikation dieses Lipopeptids zu einer Aktivierung von Lungen-spezifischen Makrophagen kommt, ist unklar und soll in dieser Arbeit untersucht werden. Über Interaktionen von anderen TLR mit Zellen des Immunsystems in der Lunge ist wenig bekannt.

1.5 Das synthetisch hergestellte Lipopeptid MALP-2

Das ursprünglich aus einem hochaktiven Klon von *Mycoplasma fermentans* isolierte 2 kDa große Lipopeptid MALP-2 kann seit 1997 synthetisch hergestellt werden (58). Das membrangebundene Lipopeptid besitzt im Vergleich zu anderer Lipopeptiden einen freien N-Terminus und setzt sich demzufolge aus nur zwei Fettsäuren zusammen (58) (Abb. 1.1). Das synthetisch hergestellte MALP-2 tritt in unterschiedlichen stereoisomeren Konfigurationen als 2*S*-MALP-2 und 2*R*-MALP-2 auf. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass die biologische Aktivität des 2*S*-MALP-2 im Vergleich zum 2*R*-MALP-2 mehr als 100fach höher ist (82). Über die *in vivo* Wirkung des 2*R*-MALP-2 gibt es noch keine Erkenntnisse. Dagegen haben Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Mühradt gezeigt, dass 2*S*-MALP-2 in der Lage ist, Makrophagen *in vitro* effektiv zu stimulieren (75, 58, 28). Im *in vivo* Mausmodell konnten Deiters und Mühradt (20) nach intraperitonealer (i.p.) Applikation von 2*S*-MALP-2 eine stark aktivierende Wirkung auf Makrophagen unter Ausschüttung verschiedener Zytokine und Chemokine feststellen. Für diese hohe Makrophagen-stimulierende Aktivität wird der freie N-Terminus verantwortlich gemacht. Die Peptidsequenz, bestehend aus 14 Aminosäuren, hat auf die Aktivierung dagegen keinen Einfluss (58). Untersuchungen von Takeuchi haben gezeigt, dass die Aktivierung der

Makrophagen spezifisch über die TLR 2 und 6 verläuft (82, 83). Ein NO Freisetzungstest gibt Aufschluss über die Stärke der Aktivierung der Makrophagen (75). In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob i.t. appliziertes 2S-MALP-2 über die TLR Makrophagen aktiviert werden und dadurch eine Zellakkumulation im bronchoalveolären Raum hervorrufen kann. Die Untersuchung verschiedener Leukozytenpopulationen in den unterschiedlichen Kompartimenten der Ratten soll zu einer Charakterisierung einer Immunreaktion in der gesamten Lunge beitragen.

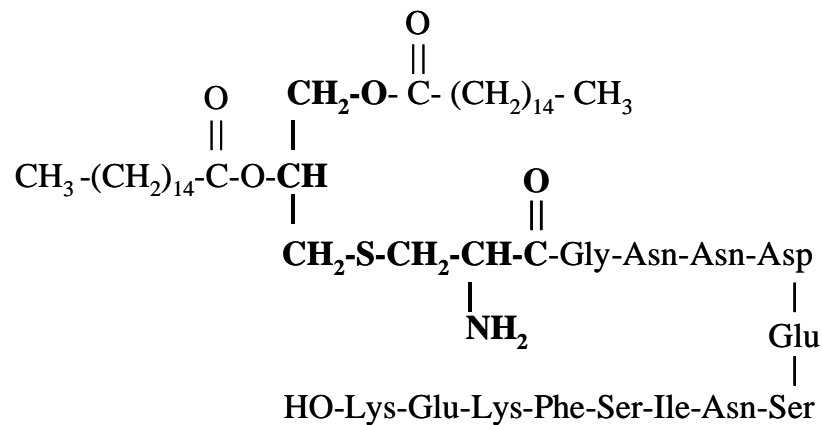


Abb. 1.1 Strukturformel von 2S-MALP-2 (aus Mühlradt et al., 1997, J. Exp. Med. 185: 1951-1958)

1.6 Die Wirkung von 2S-MALP-2 in einem Metastasierungsmodell

Falls 2S-MALP-2 in der Lage ist, Zellen des unspezifischen Immunsystems in der Lunge zu aktivieren, so besteht die Möglichkeit, dass diese Stimulation einen funktionellen Effekt auf die Lunge hat. Dies soll in einem ersten Versuch in einem etablierten Lungenmetastasierungsmodell untersucht werden. Werden MADB 106 Tumorzellen (syngene Zelllinie eines Mamma Karzinoms) intravenös (i.v.) injiziert, so bilden Mikrometastasen, die durch makroskopische Auswertung auf der Pleura der Lunge quantifiziert werden können (79). Es ist bekannt, dass in einem unbehandelten Tier von den

injizierten Tumorzellen in den ersten 1 bis 5 h bereits mehr als 70% der Tumorzellen nach der Applikation zerstört werden (5). Hierfür werden die Zellen des unspezifischen Immunsystems, insbesondere die NK-Zellen verantwortlich gemacht (29, 24). Wenn es durch die Applikation von 2S-MALP-2 möglich ist, Immunzellen zu aktivieren, könnte möglicherweise die Bildung von Mikrometastasen in der Lunge verhindert werden. In der vorliegenden Arbeit soll die Mikrometastasenbildung nach der gleichzeitigen Applikation von MADB 106 Tumorzellen mit dem 2S-MALP-2 untersucht werden.

1.7 Fragestellungen

Das Lipopeptid 2S-MALP-2 löst nach der Injektion in das Peritoneum von Mäusen einen starken Einstrom von Immunzellen aus (20). In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung von 2S-MALP-2 auf die Rattenlunge charakterisiert werden. Die Wirkung soll außerdem bezüglich eines funktionellen Effektes auf das Immunsystem der Lunge untersucht werden.

Die Arbeit unterteilt sich in fünf Teilziele, die sich wie folgt aufgliedern:

1. Im Rattenmodell soll zunächst die Wirkung von 2S-MALP-2 und 2R-MALP-2 in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge und den lungen-drainierenden Lymphknoten untersucht werden. Dabei sollen in immunzytologischen und durchflusszytometrischen Analyseverfahren die verschiedenen Leukozytensubpopulationen qualifiziert und quantifiziert werden. Es soll geklärt werden, ob eine Leukozytenakkumulation durch die Applikation von 2S-MALP-2 hervorgerufen werden kann und ob diese Zellakkumulation von verschiedenen Dosen und Zeitpunkten abhängig ist.
2. In verschiedenen *in vitro* Modellen sollen Fragen zum Wirkmechanismus beantwortet werden. Hierbei soll untersucht werden, ob die Initiation einer Immunantwort über den Toll-like Rezeptor auf den Lungenmakrophagen vermittelt wird. Zusätzlich soll der BAL Überstand auf seine chemotaktische Aktivität und auf lösliche Chemokine hin charakterisiert werden.
3. Durch mehrmalige lokale Applikation von 2S-MALP-2 soll geklärt werden, ob es möglich ist, die Entstehung von BALT im Gewebe von Ratten zu induzieren.

-
4. Untersuchungen in jungen Ratten sollen zeigen, ob und inwieweit sich die Anzahl und die Verteilung von Immunzellen in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge von den adulten Tieren unterscheiden. Außerdem soll geprüft werden, ob sich das Immunsystem der jungen Ratte anders bzw. besser von 2S-MALP-2 stimuliert lässt.

 5. In einem möglichen therapeutischen Ansatz soll überprüft werden, ob und wie die von 2S-MALP-2 verursachte lokale Stimulation des Lungenimmunsystems einen Effekt auf die Eliminierung von Tumorzellen im MADB 106 Lungenmetastasierungsmodell hat.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.A.-Reinheit von Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Puffer und Medien für Versuchstierbehandlung, Präparation, Zellisolation und -charakterisierung

Allgemein

NaCl 0.9% (Braun, Melsungen)

PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, Biochrom KG, Berlin)

Perfusionsmedium: RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) mit 35 g/ml Dextran (Molekulargewicht 70000, Sigma, Deisenhofen)

Heparin (Braun, Melsungen)

Hämolysepuffer: 150 mM NH_4Cl , 250 μM EDTA, 10 mM KHCO_3

Türks Lösung (Merck, Darmstadt)

OCT Compound (Tissue-Tek, Sakura, USA)

Formalin: 4% gelöst in PBS (pH 7.2)

Das MALP-2 wurde freundlicherweise von Prof. P. Mühlradt, Braunschweig zur Verfügung gestellt.

Durchflusszytometrie

Waschmedium: PBS mit 1% BSA, 1% Na_3N

Messmedium: PBS mit 1% BSA, 0.1% Na_3N

Streptavidin-Red670TM (Gibco, Eggenstein)

Immunhistologische und immunzytologische Untersuchungen

TBS (Tris gepufferte Salzlösung, Serva, Heidelberg)

TTBS (TBS mit 0.05% Tween 20, Merck, Darmstadt)

APAAP-Komplex: Alkalische Phosphatase anti-alkaline Phosphatase-Komplex (Dako, Hamburg)

PAP: Peroxidase-Anti-Peroxidase (Dako, Hamburg)

Mayer Hämalaun (Merck, Darmstadt)

Eosin (Sigma, Deisenhofen)

Glycergel (Dako, Hamburg)

Eukitt (Fluka, Buchs)

Tab. 2.1 A Primärantikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Kojugat	Verdünnung
¹ T-Lymphozyten (alpha beta)	R73	IgG1	unkonjugiert	1:1000 (D, H)
¹ B-Zellen	Ox12	IgG1	unkonjugiert FITC	1:1000 (D, H) 1:2000 (D)
² B-Zellen	His 14	IgG1	unkonjugiert	1:100 (H)
¹ CD8 ⁺	Ox8	IgG1	unkonjugiert FITC	1:500 (D) 1:5000 (H) 1:500 (H)
¹ CD4 ⁺	W3/25	IgG1	unkonjugiert biotinyliert	1:1000 (D, H) 1:5000 (D)
¹ CD45 RC ⁺ Lymphozyten	Ox22	IgG1	FITC	1:100 (D)
¹ DC spezifisches Integrin	Ox62	IgG1	FITC	1:10 (D)
¹ Makrophagen	ED1	IgG1	unkonjugiert	1:1000 (H)
¹ MHC II	Ox6	IgG1	biotinyliert	1:50 (D)
¹ NK-Zellen	3.2.3	IgG1	unkonjugiert	1:500 (D)
³	Isotyp Ko	IgG1	unkonjugiert	1:5000 (D)

Tab. 2.1 B Sekundärantikörper/Tertiärantikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	Verdünnung
⁴ anti-Maus	Ratte	IgG1	Kappa PE	1:50 (D)
³ anti-Maus Ig	polyklonal Kaninchen	IgG1	unkonjugiert	1:50 (H)
³ anti-Maus Ig	AP7/6/7	IgG1	mit APAAP konjugiert	1:50 (H)
³ anti Maus	polyklonal Kaninchen	IgG1	unkonjugiert	1:50 (H)

D: Durchflusszytometer, H: Histologie, PE: Phycoerythrin

¹ Serotec Ltd. Oxford, UK; ² Euro Diagnostica, Arnhem, NL; ³Dako, Hamburg, ⁴ BD, Heidelberg

Metastasierungsmodell

Die Tumorzellen wurden freundlicherweise von Prof. S. Ben-Eliyahu, Tel Aviv, Israel zur Verfügung gestellt.

Bouin Lösung: 72% gesättigte Pikrinsäure, 23% Formaldehyd, 5% Eisessig

2.3 Puffer und Medien für *in vitro* Versuche*Stimulation von BAL Zellen*

Kulturmedium: RPMI 1640 Kulturmedium + 20% FCS (Gibco, Eggenstein) + 2% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Eggenstein)

NO-Freisetzungstest

Lysepuffer: 0.9% NaCl mit 5% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail für Mammalia Zellen (Sigma, Deisenhofen)

Kulturmedium: 5% hitzeinaktiviertes FCS, 2mM Glutamin, 2.5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol

rIFN-gamma (Boehringer, Wien, A)

Griess Reagenz: Stammlösung A:	Naphtylethylendiamin x HCl	3.9 mM
Stammlösung B:	Sulfanilamid	58.1 mM
	in H ₃ PO ₄	510.2 mM

Die beiden Stammlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch 1:1 gemischt.

MCP-1 Bestimmung

Kulturmedium: DMEM mit 2 mM Glutamin, 5% hitzeinaktiviertes FCS, 2.5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol, 5 U/ml Penicillin G, 5 µg/ml Streptomycin-sulfat (Antibiotika: Fertiglösung von Gibco)

Molekularbiologische Methode

TriZol™ Reagenz (Gibco/BRL, Gaithersburg, USA)

first-strand-Puffer: 250 mM Tris-HCL, pH 8.3

Reverse Transkriptase (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe)

Tab. 2.2 Alle Primer wurden von der Firma MWG-BIOTECH AG, Ebersberg bezogen.

Primer	Sequenz 5'-3'	Fragmentgröße
GAPDH <i>Forward</i>	ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG	528 bp
GAPDH <i>Reverse</i>	CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC	
TLR2 <i>Forward</i>	TGT CAG TGG CCA GAA AAG ATG	956 bp
TLR2 <i>Reverse</i>	GCA GAA GCG CTG GGG AAT GGC	

50 x TAE-Stammlösung: 40 mM Tris-HCl, pH 8,2; 2 mM EDTA; 20 mM Eisessig, in H₂O gelöst und autoklaviert

DNA-Probenpuffer: 50% (v/v) Glycerol, 100 mM EDTA, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylen-Cyanol

DNA-Leiter: 75 bp - 12216 bp, Fa. Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Geräte

Bio-Rad Quantity One-software (Bio-Rad, München)

Brutschrank, (Heraeus, Hanau)

Densitometer (Gel Doc 2000, Bio-Rad, Hercules, USA)

Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg)

ELISA Reader „Spectra“, (SLT-Labinstruments)

Mikroskop (Carl-Zeiss, Jena)

Videodokumentationssystem (Gel-Doc 2000, Bio-Rad, München)

Zentrifugen (Hettich, Tuttlingen, Heraeus, Hanau)

Zytozentrifuge (Cytospin 3, Shandon, Frankfurt/M.)

2.5 Versuchstiere

Die im nachfolgenden beschriebenen Versuche wurden durch die Bezirksregierung Hannover (AZ 42502-98/52) genehmigt. Der Autorin wurde eine Ausnahmegenehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren gemäß § 9 Absatz 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes durch die Bezirksregierung erteilt. Es wurden Inzuchtrattenstämme verwendet, die in den Räumen des Zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten wurden (Leitung: Prof. Dr. med. vet. H.J. Hedrich). Für alle Versuche wurden männliche Lewis-Inzuchtstämme verwendet, mit Ausnahme der Versuche im Tumormodell, die mit Fischerratten durchgeführt wurden. Für die Bestimmung der chemotaktischen Aktivität wurden Knochenmarkzellen aus C57BL/6 Mäusen gewonnen. Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. J.E. Gessner in seinem Labor durchgeführt. Die Peritonealzellen aus C3H/HeJ-LPS-low responder Mäusen wurden im Labor von Herrn Prof. Mühlradt gewonnen. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Tiere unter pathogen-freien Bedingungen (SPF) im Tierhaus gehalten, sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.6 MALP-2

Für die Mehrzahl der Versuche wurde das synthetisch hergestellte, biologisch aktivere 2*S*-MALP-2 ((*S*) - S - [2,3 - bisacyloxypropyl] cysteinyl-GNNDESNISFKEK) Stereoisomer verwendet. Um unspezifische Reaktionen auf das Lipopeptid auszuschließen wurde im Versuch 3.1.1 das weniger aktive 2*R*-MALP-2 ((*R*) - S - [2,3 - bisacyloxypropyl] cysteinyl-GNNDESNISFKEK) i.t. appliziert. Für die i.p. Applikation wurde den Ratten 2*S*-MALP-2 injiziert. Beide Verbindungen wurden wie beschrieben synthetisiert, gereinigt (58) und in einer Stammlösung in 33% 2-Propanol/H₂O aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Die Stammlösung wurde mit pyrogenfreien NaCl 0.9% kurz vor der Applikation verdünnt, so dass ein Endvolumen von 500 µl (Versuch 3.1.1) bzw. 250 µl i.t. oder i.p.

appliziert werden konnte. Für die Lösungsmittelkontrolle wurde 33% 2-Propanol/H₂O im gleichen Volumen wie das verwendete MALP-2 eingesetzt.

2.7 Behandlungsarten und Zeitpläne

Die i.t. Applikation wurde unter einer kurzen Diethylethernarkose durchgeführt. Hierfür wurden die Ratten an einer schiefen Ebene an einem Gummiband untraumatisch für etwa 30 sec aufgehängt. Die Tieren wurden mit einer feinen Plastikkanüle (17G, Braun, Melsungen) durch den Mundraum intubiert, bevor 500 µl bzw. 250 µl Volumen appliziert werden konnte. Die korrekte Lage des Tubus wurde durch kurzes Hineinblasen von Luft mittels eines modifizierten Peleusballs kontrolliert.

Für die Inhalation wurden die Tiere unter kurzer Diethylethernarkose (Baker, Deventer, NL) in eine Plexiglasröhre geschoben. Diese wurde über einem kurzen Schlauch mit dem Inhalationsgerät verbunden.

Folgende Tiere wurden für die verschiedenen Versuchsteile (Verweise auf Kapitel im Ergebnisteil) verwendet:

Charakterisierung der Leukozytenpopulation:

Ratten (n=6) mit einem Gewicht von 259 ± 56 g wurden 2.5 µg 2S-MALP-2 i.t. appliziert. Die Tiere wurden nach 3 Tagen getötet (Kapitel: 3.1.1, 3.1.6, 3.1.7, 3.1.8).

Dosisabhängige Reaktion:

Ratten (n=3) mit einem Gewicht von $201 \text{ g} \pm 12 \text{ g}$ wurde i.t. 0.25 µg, 2.5 µg bzw. 25 µg 2S-MALP-2 i.t. appliziert. Die Tiere wurden an Tag 3 nach Behandlung getötet (Kapitel 3.1.3).

Zeitabhängige Reaktion:

Ratten (n=5) mit einem Gewicht von $271 \text{ g} \pm 3 \text{ g}$ wurde 2.5 µg jeweils zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, Tag 1, Tag 3 und Tag 10, 2.5 µg 2S-MALP-2 i.t. appliziert (Kapitel 3.1.5).

i.p. Applikation:

Lewisratten (n=5) mit einem Gewicht von $226 \text{ g} \pm 13 \text{ g}$ wurde jeweils $2.5 \text{ } \mu\text{g}$ 2S-MALP-2 i.p. appliziert. Die Tiere wurden an Tag 3 nach der Behandlung getötet (Kapitel 3.1.1, 3.1.6)

Junge Ratten:

Drei Wochen alten Lewisratten (n=5) mit einem Gewicht von $76 \text{ g} \pm 3.8 \text{ g}$ wurde unter Narkose 10% Ketamin (Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte e.g., Garbsen), 2% Rompun (Bayer Vital, Leverkusen) wurde $0.1 \text{ } \mu\text{g}$ 2S-MALP-2 pro g Körpergewicht i.t. appliziert. Die Tiere erwachten etwa 15 min nach Narkosebeginn und wurden bis dahin vor dem Auskühlen geschützt und engmaschig beobachtet. An Tag 3 nach der Behandlung wurden sie getötet (Kapitel 3.4).

Chemotaxis:

Ratten (n=4 behandelt, n=1 Kontrolle) mit einem Gewicht von $245 \pm 7 \text{ g}$ wurde $2.5 \text{ } \mu\text{g}$ 2S-MALP-2 i.t. appliziert. Die Tiere wurden sofort, nach 2 h, 4 h, 6 h bzw. 24 h getötet (Kapitel 3.2.2).

Nachweis von 2S-MALP-2 und MCP-1 im Lungengewebe:

Ratten (n=3) mit einem Gewicht von $257 \text{ g} \pm 14 \text{ g}$ wurden 0 h, 2 h und 24 h nach der 2S-MALP-2 Instillation getötet. Die gesamte Lunge wurde herauspräpariert, seitengetreunt über flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert (Kapitel 3.1.2, 3.2.3).

BALT Induktion:

Ratten (n=4) mit einem Gewicht von $353 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ wurde $25 \text{ } \mu\text{g}$ 2S-MALP-2 in einem Gesamtvolumen von 2 ml inhalativ appliziert (Inhalation über 15 min). Die Applikation wurde 6 mal im Wochenabstand wiederholt. Eine Woche nach der letzten Inhalation wurden die Tiere getötet (Kapitel 3.3).

Metastasierungsmodell:

Fischerratten (n=5) mit einem Gewicht von $335 \text{ g} \pm 14 \text{ g}$ wurde Tumorzellen i.v. und $2.5 \text{ } \mu\text{g}$ 2S-MALP-2 gleichzeitig appliziert. Nach 3 Wochen wurden die Tiere getötet (Kapitel 3.5).

2.8 Organentnahme und Zellisolation

Tierpräparation

In einer tiefen Diethylethernarkose wurde das Abdomen der Ratten durch einen Medianschnitt geöffnet. Die Bauchaorta wurde unterhalb der Nierenarterien freipräpariert und punktiert, so dass die Tiere vollständig ausbluteten. Die Zellen wurden aus den verschiedenen Kompartimenten gewonnen (s.u.), bei 400 x g für 10 min zentrifugiert und in eiskaltem PBS mit einem definierten Volumen aufgenommen. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde eine Verdünnung mit Türks Lösung (sie bewirkt die Lyse der Erythrozyten) hergestellt und mittels einer Neubauer Zählkammer lichtmikroskopisch ausgezählt. Die Zellen wurden nach dem Zählen mit 15 ml Hämolysepuffer für 10 min inkubiert. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 400 x g wurden die Zellen in einem definierten Volumen eiskaltem PBS aufgenommen.

Isolation der Blutleukozyten

Das durch die Punktion gewonnene Blut wurde in einer mit 0.5 ml Heparin gefüllten Spritze aufgefangen. Nach der Inkubation mit 25 ml Hämolysepuffer pro ml Blut für 10 min wurde die Zellsuspension für 10 min bei 400 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in einem definierten Volumen eiskaltem PBS resuspendiert und gezählt (s.o.).

Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Nach der Tötung der Tiere wurde das ventrale Halsfell abpräpariert und die Speicheldrüsen entfernt. Nach der Auseinanderschichten der prätrachealen Muskulatur konnte die Trachea freigelegt und durch einen kleinen Schnitt eröffnet werden. Ein Knopfkanüle wurden in die Trachea eingeführt und mit einem Faden befestigt. Bei den adulten Tieren wurden die Zellen des bronchoalveolären Raumes durch zehnmaliges Spülen mit 5 ml eiskaltem NaCl 0.9 % herausgespült. Die Zellen wurden bei den jungen Ratten mit zehnmaligem Spülen von 3 ml eiskaltem NaCl 0.9% gewonnen. Nach der

Vereinigung der einzelnen Fraktionen wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert (10 min, 400 x g). Der Überstand wurde für den Chemotaxis-Test aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Zellen des Lungengefäßbettes (Marginaler Pool)

Um die Zellen des Lungengefäßbettes zu gewinnen wurde die Lunge mit dem Herz aus dem Brustkorb herauspräpariert. Dazu wurde das Zwerchfell zunächst von kaudal vorsichtig geöffnet und das Sternum nach dem Durchtrennen der Rippen auf beiden Seiten abgehoben. Durch das Einbringen einer Kanüle in den Truncus abdominalis durch den rechten Ventrikel wurde das Lungengefäßbett 12 mal mit je 10 ml Perfusionsmedium gespült. Um einen ungehinderten Abfluss des Perfusates zu gewährleisten, wurde zuvor die linke Herzkammer eröffnet. Die ersten beiden Spülfraktionen wurden verworfen, die folgenden aufgefangen und vereinigt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 400 x g zentrifugiert.

Lungeninterstitium

Zur Untersuchung des Lungeninterstitiums wurde jeweils die linke Lunge über einem Metallsieb zerzupft und vorsichtig zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 400 x g). Die Lunge wurde über eine Trachealkanüle mit 5 ml OCT/PBS gefüllt und für die Paraffineinbettung in Formalin konserviert.

Drainierende Lymphknoten

Nach dem Entfernen des Sternums wurden die mediastinalen und thymischen Lymphknoten aufgesucht und vorsichtig mit einer gebogenen Pinzette aus dem umgebenden Gewebe herausgelöst. Die Lymphknoten wurden über einem Metallsieb vorsichtig zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden in eiskaltem PBS aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 400 x g).

2.9 Zytopräparate und Paraffinschnitte

Herstellung von Zytopräparaten

Etwa 100000 Zellen wurden in PBS aufgenommen und mit Hilfe einer Zytocentrifuge auf Objektträger geschleudert (für 8 min bei 200 x g). Die Zellpräparate wurden mehrere Stunden an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung in Aluminiumfolie bei -20°C eingefroren.

Herstellung von Paraffinschnitten

Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet (siehe Burak H. Histologische Techniken, Thieme 3. Auflage 1973). Schnitte von 7 μm Dicke wurden hergestellt, entparaffiniert, mit Hämalaun und Eosin (H&E) gefärbt und mit Eukitt eingedeckelt.

2.10 Durchflusszytometrische Detektion von Oberflächenantigenen

Für die Detektion von Oberflächenantigenen wurden 1×10^6 Zellen pro Färbung in einer 96 Loch/Mikrotiterplatte eingesetzt. Die Inkubationszeit für jeweils 50 μl Antikörperlösung betrug 25 min, dazwischen wurde jeweils zweimal mit Waschpuffer gewaschen und bei 400 x g für 1 min zentrifugiert.

Unkonjugierte Antikörper wurden mit PE-konjugierten Sekundärantikörpern, biotinylierte Primärantikörper mit Streptavidin Red670 detektiert. Die Kontrolle der Spezifität wurden mittels Isotyp-Kontroll-Antikörpern untersucht.

Die B- und NK-Zellen wurden jeweils in einer Einfachfärbung mit direkt konjugierten Antikörpern durchgeführt (s.o.). Die CD4^+ -, CD8^+ -Lymphozyten und Monozyten wurden durch eine Doppelfärbung detektiert (25). Die DC wurden durch eine Dreifachfärbung nach einem Protokoll von Lambrecht et al. (45) detektiert. Positive Zellen sind niedrig fluoreszente, Ox62 und MHC II positive Zellen nach Ausschluss der T- und B-Lymphozyten.

2.11 Nachweis von Oberflächenantigenen auf Zytopräparaten

Nach der Fixierung der Zellen bei -20°C für 10 min in einem 1:1 Methanol/Acetongemisch wurden die Zellen mit TTBS gewaschen. Alle Inkubationsschritte wurden, falls nicht anders beschrieben, in einer feuchten Kammer bei RT für 30 min durchgeführt. Gewaschen wurde nach jedem Inkubationsschritt 2 mal mit TTBS.

Nach der Inkubation mit dem Primär- und anschließend mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen mit dem APAAP-Komplex (s. Herstelleranleitung) inkubiert. Die letzten beiden Inkubationsschritte wurden für jeweils 15 min wiederholt. Vor dem Eindeckeln mit Eukitt, wurden die Zellkerne durch Mayer Hämalaunlösung schwach blau angefärbt

2.12 Nachweis von 2S-MALP-2 im Lungengewebe: NO Freisetzungstest

Aufarbeitung des Lungengewebes

Mit Hilfe von Mörser und Stößel wurde das bei -80°C gelagerte Lungengewebe in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Das homogenisierte Gewebe wurde dann zunächst in 1 ml Lysepuffer aufgetaut und der Mörser anschließend mit 2 x 0.5 ml Lysepuffer gespült. Jeweils 0.5 ml des gesamten Homogenisates wurden mit 0.5 ml Ocyglucosid (50 mM in 0.9 % NaCl) gemischt. Das sich im Gewebe befindliche 2S-MALP-2 wurde durch 5minütiges Kochen im Wasserbad extrahiert. Nach der Zentrifugation (15 min, $11000 \times g$, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und bis zum Nachweis der Makrophagen stimulierenden Aktivität im Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzungstest bei -20°C eingefroren.

Gewinnung von Peritonealzellen (PEC) aus C3H/HeJ-LPS-low responder Mäusen

Die Mäuse wurden mittels CO_2 Begasung getötet und mit Ethanol (70%) desinfiziert. Nach dem Entfernen des Bauchfells wurde das Peritoneum mit ca.

3 ml BSS (*balanced salt solution*) mit 1% FCS gespült. Durch das Massieren des Bauches wurde die Zellen suspendiert und anschließend mittels einer Pasteurpipette abgesaugt. Nach 2 maliger wiederholter Spülung mit 2 ml BSS mit 1% FCS wurde die gepoolte Suspension für 10 min bei 250 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden im Kulturmedium in einem definierten Volumen aufgenommen.

NO Freisetzungstest

Die Makrophagen stimulierende Aktivität einer Substanz kann mittels freigesetztem NO bestimmt werden. NO, ein Gas mit kurzer Halbwertszeit, entsteht in einer durch das Enzym NO-Synthase katalysierten Reaktion aus L-Arginin und wird unmittelbar nach der Synthese zu Nitrat und Nitrit oxidiert (56). In murinen Makrophagen kann die NO-Synthase u. a. durch IFN-gamma und LPS induziert werden (95). Die Makrophagen stimulierende Aktivität des Lungenhomogenisat-Überstandes (s.o.) konnte durch den NO-Freisetzungstest bestimmt werden. Der Überstand wurde zu diesem Zweck mit Kulturmedium vorverdünnt und in einer mit BSS mit 1% FCS vorgespülten 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte in einer 1:2 Verdünnungsreihe austitriert (Volumen: 50 µl/Loch). Frisch isolierte PEC von C3H/HeJ-LPS-low responder Mäuse wurden in einer Dichte von 1×10^5 Zellen in jeweils 50 µl/Loch zugefügt. Die PEC wurden gewonnen (s.o.) und unmittelbar vor dem Einsäen mit 60 U/ml murinem rIFN-gamma versetzt. Der Ansatz wurde für 45 bis 48 h bei 37°C und 7.5% CO₂ inkubiert. Das dabei durch Oxidation entstandenen NO₃⁻ wurde anschließend durch ein Gemisch aus Nitratreduktase (Endkonzentration: 20 mU/Loch) und NADPH (Endkonzentration: 100 µM/Loch) zu NO₂⁻ reduziert (10 min bei RT). Durch die Zugabe von 100 µl/Loch Griess-Reagenz wurde nach 10 min in einer Diazokopplungsreaktion bei 550 nm gegen 690 nm die Nitritkonzentration photometrisch bestimmt. Unter zur Hilfenahme eines laborinternen Standards (eine stabile Membranpräparation aus Mykoplasmen) konnte eine Unit Makrophagen stimulierende Aktivität als die Konzentration definiert werden, die eine

halbmaximale NO-Freisetzung induziert (58). Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 2S-MALP-2 Charge entsprach eine Unit Makrophagen stimulierender Aktivität 2.5 µg 2S-MALP-2.

2.13 Nachweis der TLR 2 mRNA auf stimulierten BAL Zellen

Stimulation von Zellen aus der BAL

Für den Nachweis des TLR 2 wurde aus 6 unbehandelten männlichen Lewisratten (267 g ± 12 g) Zellen der BAL gewonnen, gepoolt und gezählt (s. 2.7). Es wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 3.5 cm verwendet. Pro Schale wurden 2 x 10⁶ Zellen in Kulturmedium eingesetzt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 10 ng/ml 2S-MALP-2 pro Kulturschale stimuliert. Für die Kontrolle wurde das gleiche Volumen Kulturmedium + Zusätze zugegeben. Die Zellen wurden nach 0.5 h, 1 h und 3 h in ein Röhrchen überführt und bei 400 x g für 10 min bei RT zentrifugiert.

RNA Isolation

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden die stimulierten Zellen zunächst durch den Einsatz von TriZolTM Reagenz (Bestandteil: Phenol/Guanidinisothiocyanat) und durch Chloroform-Extraktion nach Herstellerprotokoll gewonnen (Gibco/BRL, Gaithersburg, USA).

Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Im ersten Schritt wird mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase die einzelsträngige RNA als Matrize für die Erstellung einer einzelsträngigen DNA-Kopie (first-strand) verwendet. Diese wird laut Herstellerprotokoll (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe) mit 1 µg der Gesamt-RNA durchgeführt. Dazu wurden in ein 0.5 ml Reaktionsgefäß 1 µg Gesamt-RNA, 1 µl oligo-d(T)Primer (18 mer, 0.5 µg/ml) und 12.5 µl mit DEPC-(Diethylpyrocarbonat)-H₂O (H₂O mit 0.1% (v/v) Diethylpyrocarbonat eingestellt, ü.N. gerührt und autoklaviert) pipettiert. Der Reaktionsansatz wird bei 42°C im Wasserbad für 5 min inkubiert. Zu dem Reaktionsgemisch werden dazugegeben: 4 µl 5facher

first-strand-Puffer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix (aus 100 mM dNTP-Stammlösung in DEPC-Wasser verdünnt), 2 µl 100 mM DTT 0.5 µl (60 Units) Reverse Transkriptase. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 42°C, daran schloss sich die Inaktivierung des Enzyms durch die Inkubation für 15 min bei 70°C an. Die cDNA wurde 1:4 mit sterilem H₂O verdünnt. Durch die anschließende semiquantitative PCR ist es möglich, die Induktion der Transkription des TLR2 zu untersuchen. Damit gleiche Mengen an cDNA synthetisiert werden, wurde die Induktion der Transkription über die Normalisierung gegen ein *housekeeping* Gen, dem GAPDH durchgeführt. Folgendes Reaktionsgemisch wurde hergestellt: 14 µl H₂O, 2 µl 10facher PCR-Reaktionspuffer (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe), 0.5 µl dNTP-Mix (10 mM), 0.5 µl *Forward Primer* (20 µM), 0.5 µl *Reverse Primer* (20 µM), 5 µl cDNA, 1 U Taq-Polymerase. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: ein initialer Denaturierungsschritt für 10 s bei 94°C, 24 Zyklen (GAPDH) bzw. 31 Zyklen (TLR2) 15 s 95°C (Denaturierung), 30 s 57°C (Annealing) und 30 s 72°C (Extension), abschließend 10 min 72°C. Das Produkt wird anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s.u.).

DNA-Agarosegelelektrophorese

Ein 1% (w/v) Agarosegel in 50 ml 1fach TAE wurde in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf 60°C wurde 0.5 µg Ethidiumbromid hinzugegeben. Zur Verfestigung wurde das Gel in eine Gelkammer gegossen und bei RT inkubiert. Das PCR Produkt wurde mit 1/10 DNA-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Eine 1 Kb DNA-Leiter (75 bp – 12216 bp) wurde als Längenstandard eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mittels Densitometer ausgewertet. Die Aufnahme mittels eines Videodokumentationssystem unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm ermöglichte die anschließende Auswertung mit der Bio-Rad Quantity One-software.

2.14 Bestimmung der chemotaktischen Aktivität im BAL Überstand

Gewinnung von „polymorphonuclear granulocytes“ (PMN) aus dem Knochenmark von Mäusen

Nach der Tötung der Mäuse durch die Inhalation mit CO₂ wurden Ober- und Unterschenkelknochen herauspräpariert. Nach der Eröffnung des Knochenschaftes wurde das Knochenmark durch mehrmaliges spülen mit PBS herausgespült, zerkleinert und 2 mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation für 10 min bei RT mit 400 x g). Für den Chemotaxis-Test wurden eine Konzentration von 7.5 x 10⁶ Zellen pro ml Medium (RPMI 1640 mit 0.5% BSA) eingestellt.

Chemotaxistest

Für die Bestimmung der Chemotaxis wurde eine Transwell Chemotaxis Polycarbonat Kammer (6.5 mm Durchmesser, 3 µm Poren, Corning Life Science, Schiphol, NL) verwendet. Der Boden wurde mit 600 µl BAL Überstand gefüllt (Doppelansatz), die „Inserts“ wurden mit 100 µl der PMN Zellsuspension (s.o.) pro Kammer gefüllt (Inkubation für 2 h, 37°C, 5% CO₂). Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurde mit 50 µl 70 mM EDTA für 30 min bei 4°C inkubiert. Die „Inserts“ wurden entfernt und die transmigrierten Zellsuspension wurde im Durchflusszytometer analysiert. Die Chemotaxis wurde durch den Anteil an migrierten PMN bestimmt (17).

2.15 Bestimmung der MCP-1 Konzentration

Im Lungenhomogenisat nach in vivo Stimulation

Den Ratten wurde 2S-MALP-2 i.t. appliziert (s. 2.6) und nach 0 h, 2h und 24 h getötet. Die Lungen wurden entnommen und bis zur Aufarbeitung bei -80°C eingefroren (s. 2.7). Die Lungen wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert (s. 2.11). Das Lungenhomogenisat wurde anschließend in jeweils 2 ml Lysepuffer aufgenommen und bei 11000 x g für 15 min zentrifugiert). Der Überstand wurde abgenommen und bis zum Nachweis von MCP-1 mittels

ELISA (Pharmingen, San Diego, USA) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Durchführung des ELISA erfolgte entsprechend den Vorschriften des Herstellers.

Im BAL Überstand nach in vitro Stimulation

BAL Zellen wurden gewonnen (s. 2.7) und 10 min bei $250 \times g$ (4°C) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen auf eine Konzentration von 2.4×10^5 Zellen/ml eingestellt. 3×10^5 Zellen/Loch wurden dann in eine mit BSS, 1 % FCS vorgespülten 24-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät (Volumen: 1.25 ml/Loch) und mit 0.3 ng/ml 2S-MALP-2 für 24 h bei 37°C , 7.5% CO_2 stimuliert. Bis zum Nachweis von MCP-1 mittels ELISA (laut Herstelleranleitung s.o.) wurde der Kulturüberstand bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Von den BAL Zellen jeder einzelnen Ratte wurden jeweils drei Parallelansätze angelegt.

2.16 Semiquantitative Auswertung der Lungenhistologien mit BALT

Pro Tier wurden jeweils 10 Paraffinschnitte in einem Abstand von etwa $70\text{ }\mu\text{m}$ im Bereich der großen Bronchien hergestellt. Zunächst wurde die Fläche an BALT mit Hilfe eines Zählgitters mikroskopisch bestimmt (erster Versuchsansatz). Außerdem wurde der Anteil an BALT im Bereich der verschieden großen Bronchien ermittelt (zweiter Versuchsansatz).

2.17 Untersuchungen im Metastasierungsmodell

Die Tumorzellen aus einer syngenen Zelllinie eines Mamma Karzinoms (MADB 106) wurden wie früher beschrieben kultiviert (5) und in der logarithmischen Wachstumsphase für den Versuch verwendet. Je 1×10^6 Zellen wurden für pro Tier i.v. in die laterale Schwanzvene appliziert. Unmittelbar danach wurde den Ratten $2.5\text{ }\mu\text{g}$ 2S-MALP-2 bzw. Lösungsmittelkontrolle i.t. appliziert. Innerhalb der Inkubationszeit wurde das Gewicht in wöchentlichem Abstand kontrolliert. Nach 3 Wochen wurden die

Tiere getötet. Die Lunge wurde entnommen und mit Bouin Lösung durch Spülung fixiert. Für die Quantifizierung wurden die Metastasen auf der Oberfläche der Lunge über einem Raster makroskopisch ausgezählt (91).

2.18 Statistische Auswertung

Die Statistik wurde mit Hilfe des Programms SPSS 10.0 für Windows durchgeführt. Für die verschiedenen Versuchsgruppen und Zeitpunkte wurden Mittelwerte (MW) und Standardfehler (SF) ermittelt. Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test errechnet, wobei ein p-Wert ≤ 0.05 als statistisch signifikant angesehen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Wirkung und Wirkungsweise nach Applikation von 2S-MALP-2 in der Ratte

Um die pulmonale Immunreaktion zu charakterisieren, wurde den Ratten unter kurzer Narkose 500 µl Volumen intratracheal appliziert. In der ersten halben Stunde nach der Instillation traten Atmungsprobleme auf. Eine deutliche Verbesserung stellte sich nach der Reduktion des Volumens auf 250 µl ein. Im späteren Zeitraum nach der Behandlung mit MALP-2 zeigten die Tiere keine Unverträglichkeiten, sie nahmen an Körpergewicht im gleichen Maße zu wie die mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Tiere.

3.1.1 Leukozyten akkumulieren nach der Applikation von 2S- MALP-2 im bronchoalveolären Raum

Drei Tage nach der i.t. Applikation von 2.5 µg 2S-MALP-2 versechsfachte sich die Gesamtzellzahl in der BAL gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. AM, Neutrophile und Lymphozyten waren signifikant angestiegen (Abb. 3.1 A,C). Die Gesamtzellzahl war nach der Applikation des 2R-MALP-2 gegenüber der Lösungsmittelkontrolle nicht erhöht, gegenüber der 2S-MALP-2 Gruppe ergab sich ein 3.8facher Anstieg (Abb. 3.1 A,C). Nach i.p. Applikation der gleichen Dosis 2S-MALP-2 stieg die Gesamtzellzahl in der BAL gegenüber der i.t. Kontrolle etwa um den Faktor 1.5 an. Der Anstieg war nach i.t. Applikation der gleichen Menge an 2S-MALP-2 bei der Gesamtzellzahl etwa 4fach, bei den Makrophagen/Monozyten etwa 3fach (Abb. 3.1 B), bei den Lymphozyten etwa 14fach und bei den Neutrophilen etwa 5fach (Abb. 3.1 D) gegenüber der i.p. Applikation erhöht.

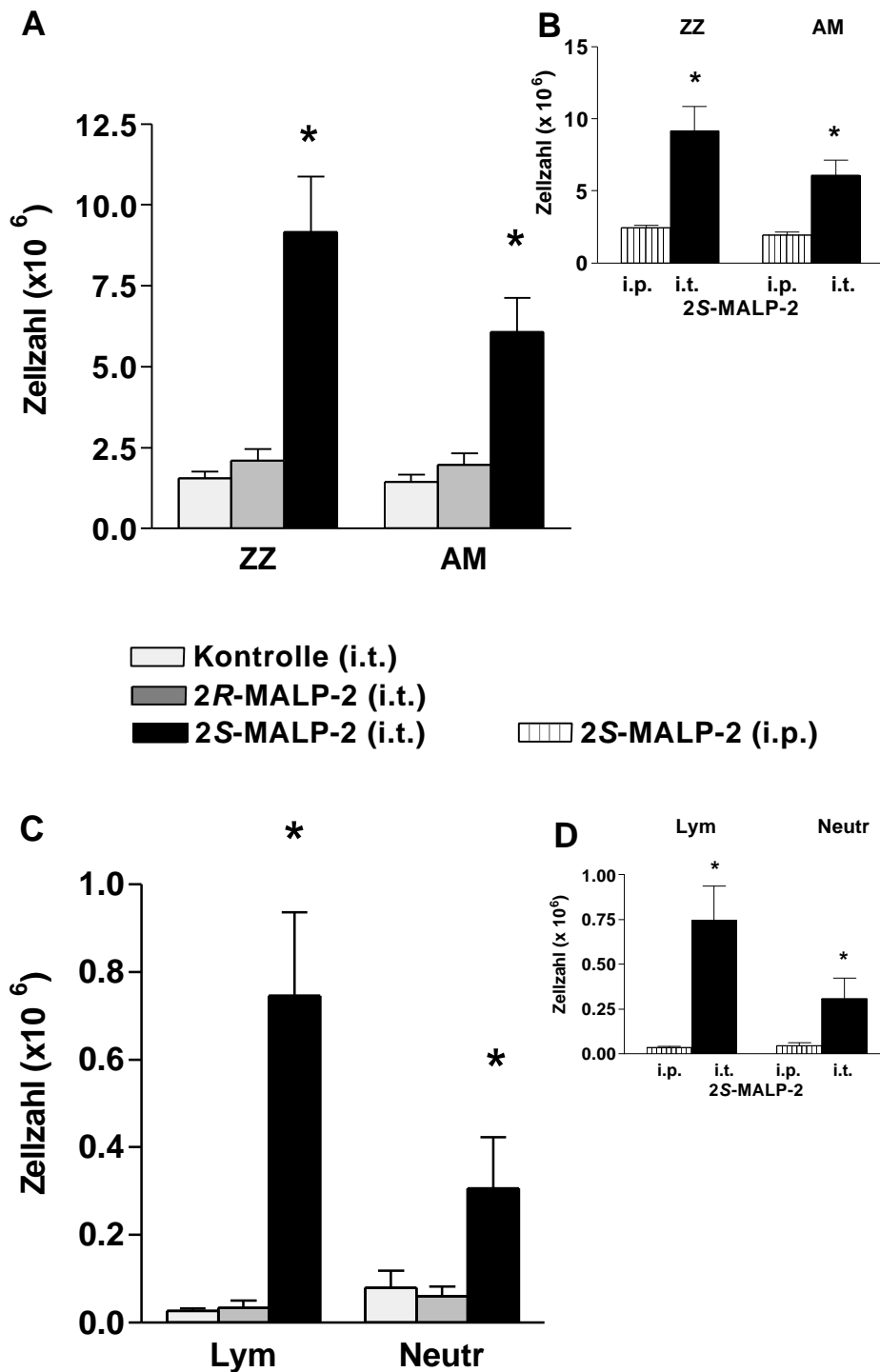


Abb. 3.1 Leukozyteninfiltration nach i.t. Applikation von 2S-MALP-2, 2R-MALP-2 und der Lösungsmittelkontrolle (2-Propanol 33%) (A,C). Vergleich Leukozyteninfiltration nach i.p. und i.t. Applikation (B,D). Zellen der BAL an Tag 3: Gesamtzellzahl (ZZ), alveolare Makrophagen/Monozyten (AM) (A,B), Neutrophile (Neutr) und Lymphozyten (Lym) (C,D). Daten sind MW \pm SF (n=5), *p \leq 0.01 gegenüber der Kontrolle (A,C) bzw. der i.p. Applikation (B,D).

3.1.2 Die effektive 2S-MALP-2 Aktivität im Lungengewebe

Nach der i.t. Applikation kann die teilweise Aspiration der instillierten Flüssigkeit beobachtet werden. Um festzustellen, wieviel 2S-MALP-2 für die Auslösung der unter 3.1.1 beschriebenen Leukozytenakkumulation verantwortlich ist, wurde die Aktivität von 2S-MALP-2 im homogenisierten Lungengewebe durch einen NO Freisetzungstest unmittelbar und 24 h nach Instillation bestimmt. Am Zeitpunkt 0 konnte $10.2\% \pm 1.2\%$ des ursprünglich verabreichten 2S-MALP-2 im gesamten Lungenhomogenisat nachgewiesen werden (Tab. 3.1). Dies entspricht etwa 250 ng 2S-MALP-2. Nach 24 h war dagegen kaum noch eine Makrophagen stimulierende Aktivität zu messen ($0.3\% \pm 0.1\%$). Die etwa um die Hälfte leichtere linke Lunge wies eine etwa 1.5fache höhere Aktivität gegenüber der rechten Lunge auf (Tab. 3.1).

Zeit nach Instillation (h)	Ratte	Linke Lunge		Rechte Lunge	
		Gewicht (mg)	MALP Aktivität (% vom Original)	Gewicht (mg)	MALP Aktivität (% vom Original)
0	1	501	8.3	946	4.6
	2	494	5.2	971	3.9
	3	531	5.8	921	3.7
		$509 \pm 11^*$	$6.4 \pm 1.0^*$	$946 \pm 14^*$	$4.1 \pm 0.3^*$
24	4	515	0.3	893	0.2
	5	476	0.1	866	0.06
	6	465	0.1	857	0.07
		$485 \pm 15^*$	$0.2 \pm 0.1^*$	$872 \pm 11^*$	$0.1 \pm 0.1^*$

Lunge gesamt			
Zeit nach Instillation (h)	Ratte	Gewicht (mg)	MALP Aktivität (% vom Original)
0	1	1447	12.9
	2	1465	9.1
	3	1452	9.5
		$1455 \pm 5^*$	$10.5 \pm 1.2^*$
24	4	1408	0.5
	5	1342	0.2
	6	1322	0.2
		$1357 \pm 26^*$	$0.3 \pm 0.1^*$

Tab. 3.1 Bestimmung der 2S-MALP-2 Aktivität durch einen NO Freisetzungstest. Ratten wurde 2.5 µg 2S-MALP-2 i.t. appliziert. An Zeitpunkt 0 h wurden die Tiere sofort nach der Instillation getötet. *Die Daten sind MW \pm SF (n = 3).

3.1.3 Dosis abhängige Leukozyten-Akkumulation im bronchoalveolären Raum nach i.t. 2S-MALP-2 Applikation

Drei Tage nach der i.t. Applikation von 0.25 µg, 2.5 µg bzw. 25 µg 2S-MALP-2 stieg die Zahl der Gesamtzellen, der Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten. AM- und Lymphozytenzahlen waren beim Vergleich von 2.5 µg gegenüber 25 µg nicht signifikant verschieden. Die Zahl der Neutrophilen stieg nach 25 µg um das 35fache an (Abb. 3.2).

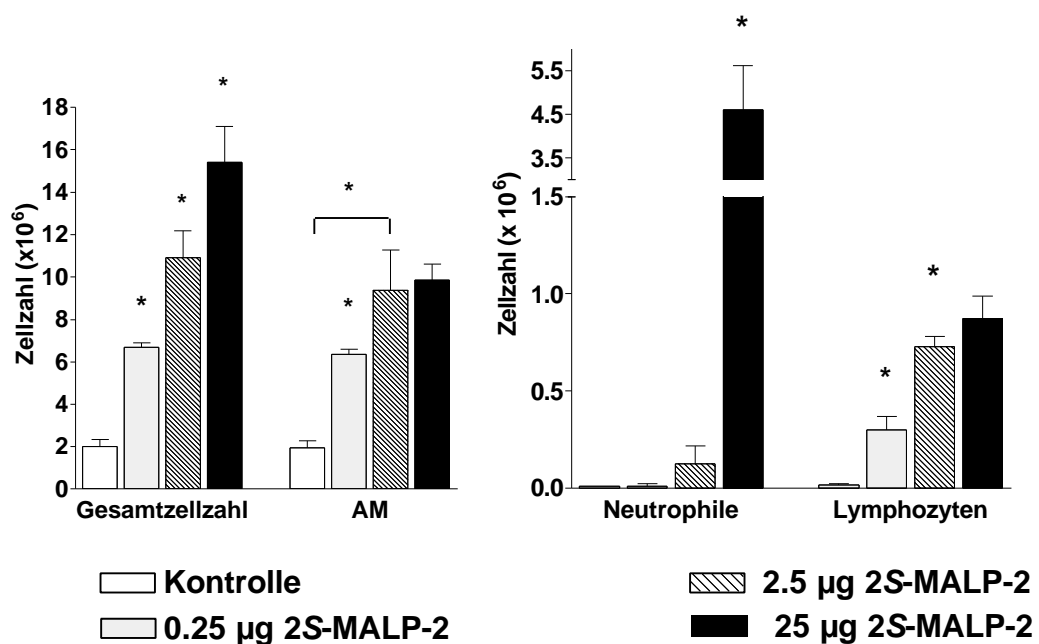


Abb. 3.2 Dosis abhängige Leukozytenakkumulation im bronchoalveolären Raum nach Gabe von 2S-MALP-2. Drei Tage nach i.t. Instillation verschiedener Dosen des 2S-MALP-2 wurden die Zellen der BAL charakterisiert. Daten sind MW \pm SF (n=3), *p \leq 0.01 gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

3.1.4 Lungenmorphologie nach verschiedenen Dosen 2S-MALP-2 an Tag 3

Nach der Applikation von 2R-MALP-2 (Histologie nicht gezeigt) und der Kontrollsubstanz (Abb. 3.3 A) war die Lunge unauffällig. Nach der Gabe von 2.5 µg konnte eine geringere Einwanderung von Immunzellen in das Lungengewebe beobachtet werden (Abb. 3.3 B). Nach der Instillation von 25 µg MALP-2 bildeten sich multifokale, pneumonie-ähnliche Infiltrationen von Neutrophilen und mononukleären Zellen (Abb. 3.3 C). Die Entzündungszellen befanden sich vor allem in der Nähe von großen und kleineren Gefäßen, Bronchien und vielen Alveolen.

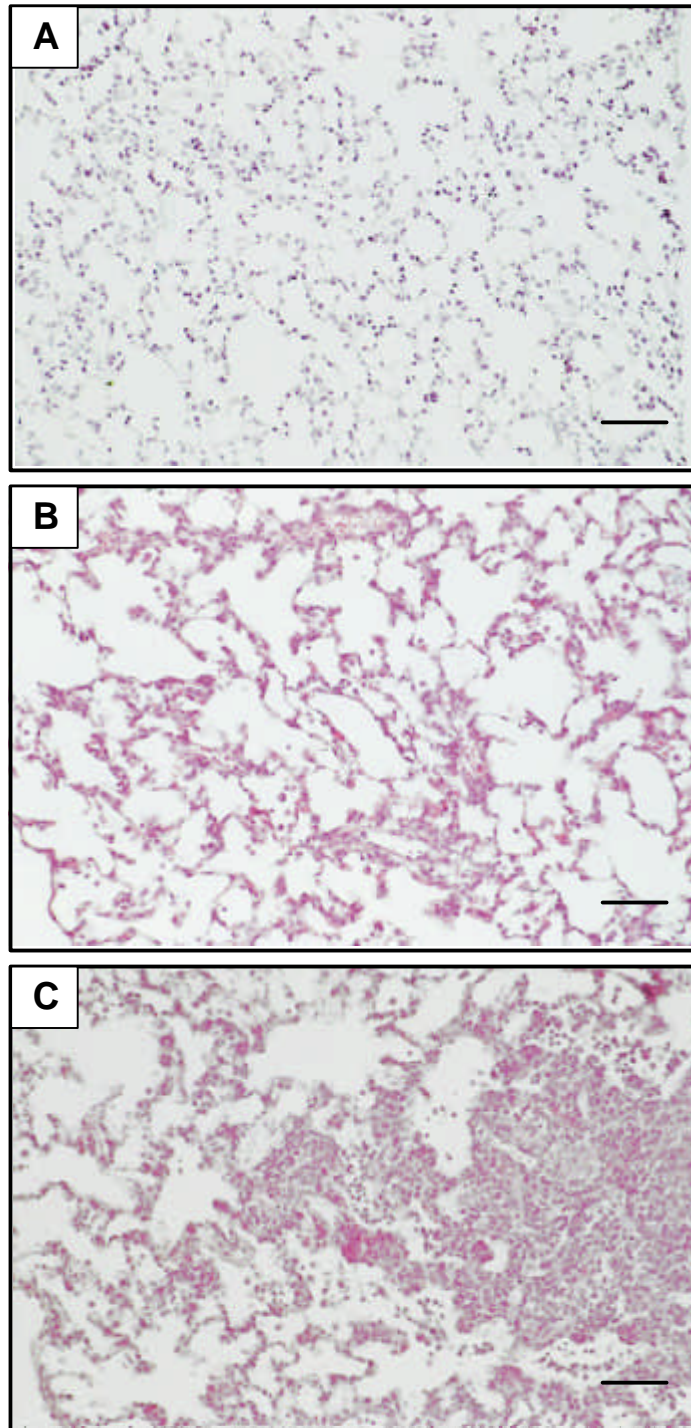


Abb. 3.3 A-C Histologien der rechten Lunge 3 Tage nach i.t. Applikation verschiedener Dosen 2S-MALP-2. **A** Lösungsmittelkontrolle, **B** Instillation von 2.5 µg 2S-MALP-2, **C** Instillation von 25 µg 2S-MALP-2. H&E Färbung auf Paraffinschnitten (Balken: 100 µm).

3.1.5 Zeitabhängige Leukozyten-Akkumulation im bronchoalveolären Raum nach 2.5 µg 2S-MALP-2 Applikation

Die Gesamtzellzahl war 6 h nach der Behandlung um ein 10faches gegenüber dem Zeitpunkt 0 h gestiegen. Nach 24 h hatte sich die Zahl gegenüber dem 6 h Wert verdoppelt. Die Zellakkumulation wurde hauptsächlich durch den Einstrom von Neutrophilen verursacht. Die Gesamtzellzahl erreichte 24 h nach i.t. Applikation ihr Maximum. Die Zahl der AM war zu dem Zeitpunkt signifikant gegenüber dem Ausgangswert erhöht. Weitere 24 h später war die Neutrophilenzahl gefallen, die Zahl der AM dagegen weiter gestiegen. Die Lymphozytenzahl war nach 24 und 48 h signifikant erhöht, ihr Maximum erreicht sie 72 h nach der 2S-MALP-2 Applikation. Die Zellzahl aller untersuchten Populationen entsprach 10 Tage nach der Behandlung dem Ausgangswert (Abb. 3.4).

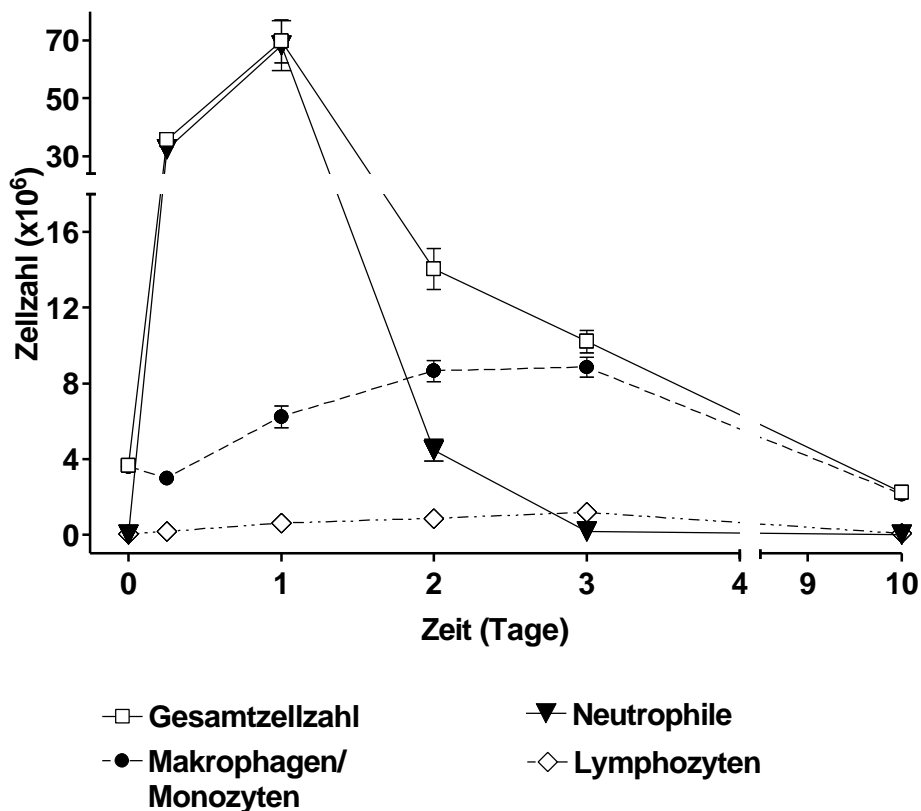


Abb. 3.4 Zeitabhängige Infiltration von Leukozyten in den bronchoalveolären Raum nach i.t. Applikation von 2.5 µg 2S-MALP-2. Charakterisierung verschiedener Leukozytenpopulationen in der BAL. Daten sind MW ± SF (n=5), Signifikanzen siehe Text.

3.1.6 Zellverteilung in den verschiedenen Lungenkompartimenten und im Blut nach 2.5 µg 2S-MALP-2 Applikation

Drei Tage nach der Behandlung mit 2S-MALP-2 war die Zellzahl in der BAL gegenüber der Kontrollgruppe in allen untersuchten Leukozytensubpopulationen erhöht mit der Ausnahme der „naiven“ CD4⁺ Zellen. Die Zahl der T-Zellen erhöhte sich dabei am stärksten (> 10fach), die Zahl der B-Zellen und Monozyten war nach der 2S-MALP-2 Behandlung etwa um das 5fache angestiegen (Abb. 3.5).

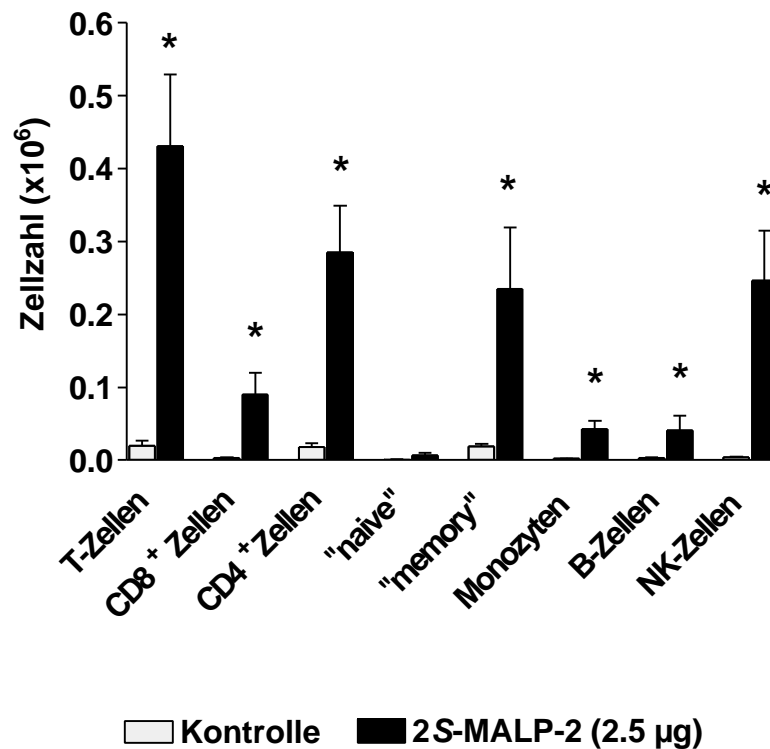


Abb. 3.5 Zellzahlen verschiedener Leukozytensubpopulationen in der BAL nach Behandlung mit 2S-MALP-2. Drei Tage nach der i.t. Applikation von 2.5 µg 2S-MALP-2 wurden die Zellen charakterisiert. Die Daten sind MW ± SF (n=8 pro Gruppe), * p ≤ 0.01 gegenüber der jeweiligen Kontrolle.

Die Leukozytenzahl im Blut und im marginalen Pool war nach der 2S-MALP-2 Behandlung unverändert gegenüber der Kontrolle. Die Untersuchungen des Lungeninterstitiums ergab bei den Gesamtzellzahlen und der Monozyten/Makrophagenpopulation einen signifikanten Zellzahlanstieg nach 2S-MALP-2 i.t. Behandlung (Abb. 3.6). Bei den Neutrophilen und Lymphozyten war die Zellzahl bei behandelter und Kontrollgruppe gleich hoch. Nach i.p. Applikation der gleichen Menge 2S-MALP-2 war im Interstitium die Gesamtzellzahl, die Makrophagen/Monozytenzahl und die Zahl der Lymphozyten deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht.

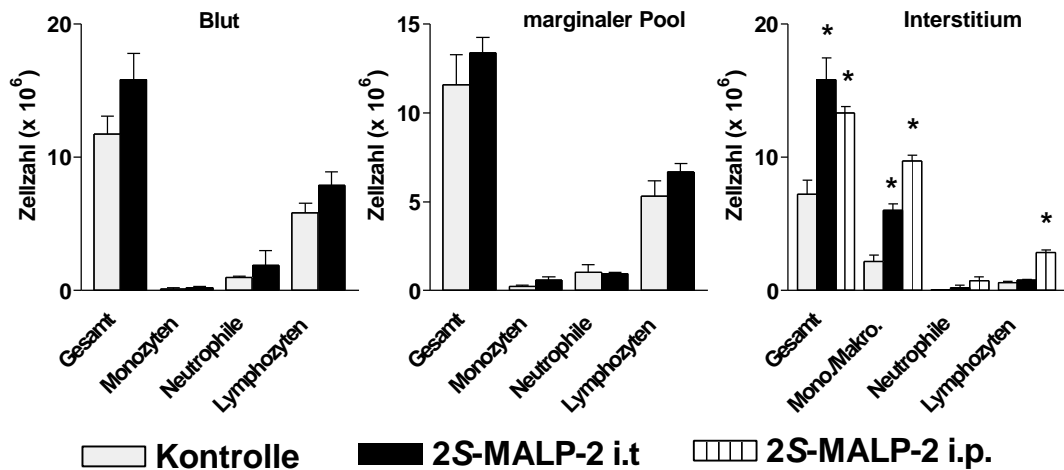


Abb. 3.6 Untersuchung verschiedener Leukozytensubpopulationen im Blut, im Lungeninterstitium und aus dem marginalen Pool 3 Tage nach i.t. bzw. i.p. Applikation von 2.5 μ g 2S-MALP-2. (Mono./Makro. = Monozyten/Makrophagen) Daten sind MW \pm SF (n=8), * $p \leq 0.05$ gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

3.1.7 Charakterisierung von MHC II und Ox62 positiven DC

Da den DC als antigenpräsentierenden Zellen bei der unspezifischen Immunabwehr eine große Rolle zugesprochen wird, wurde die in der Maus etablierte durchflusszytometrische Dreifachfärbung für DC für die Ratte etabliert (45). Nach dem „Ausschalten“ der Ox12 positiven B-Zellen und der R73 positiven T-Zellen wurden die DC in einer Doppelfärbung mit Ox6 (MHC II) und Ox62 charakterisiert (Abb. 3.7 A-D).

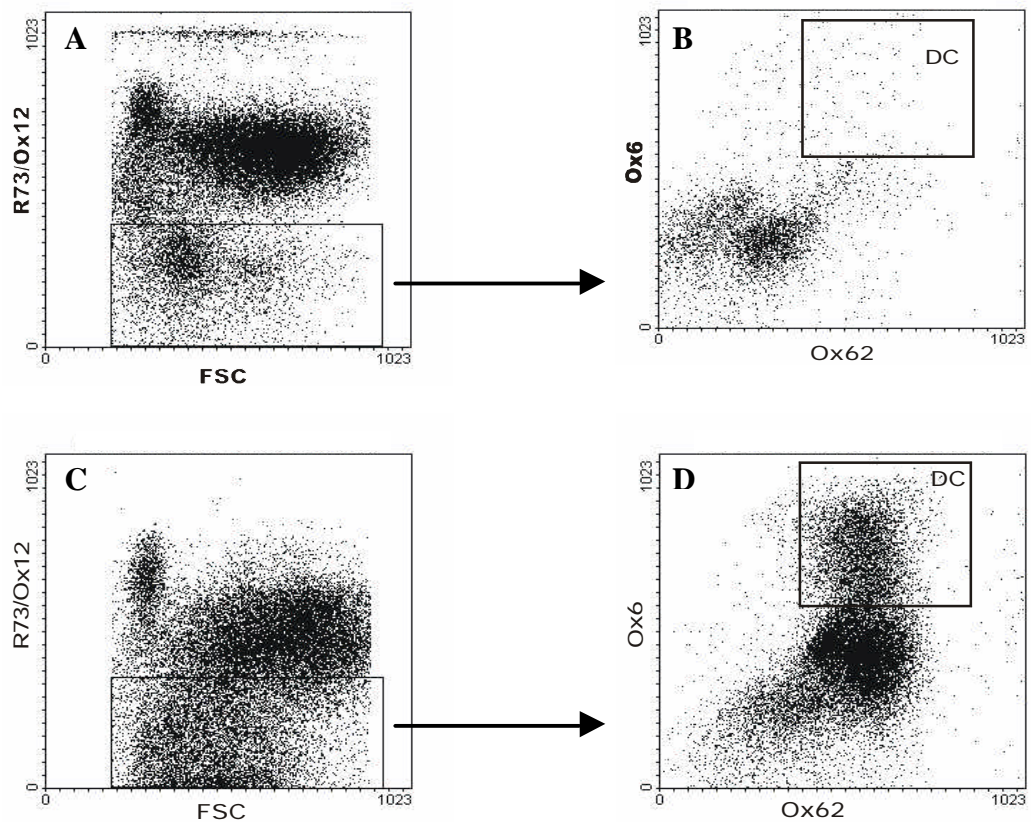


Abb. 3.7 A-D Repräsentatives Beispiel für die Charakterisierung von DC aus der BAL im Durchflusszytometer. **A** Zellen von Kontrolltieren: Ein Rahmen markiert die nicht T- und B-Zell-positiven (R73/Ox12) Zellen. **B** Nur die gerahmten Zellen werden in der Fluoreszenzdarstellung angezeigt. DC sind die Zellen, die sowohl MHC II (Ox6) als auch Ox62 positiven Zellen (Rahmen). **C** und **D** Zellen von 2S-MALP-2 behandelten Tieren, siehe **A** und **B**.

Drei Tage nach der Behandlung waren in der BAL von Kontrolltieren etwa 1% DC zu finden (Abb. 3.8). Nach der Instillation von 2.5 μg 2S-MALP-2 stieg der Anteil der DC auf etwa 8% an. Dies entspricht bei der Beurteilung der absoluten Zellzahlen eine Erhöhung um den Faktor 25 (Abb. 3.8). Der Anteil der DC im Interstitium lag bei den Kontrollen bei 0.5% und stieg nach 2S-MALP-2 auf 6%. Dies entspricht bei den absoluten Zellzahlen eine Erhöhung um den Faktor 15.

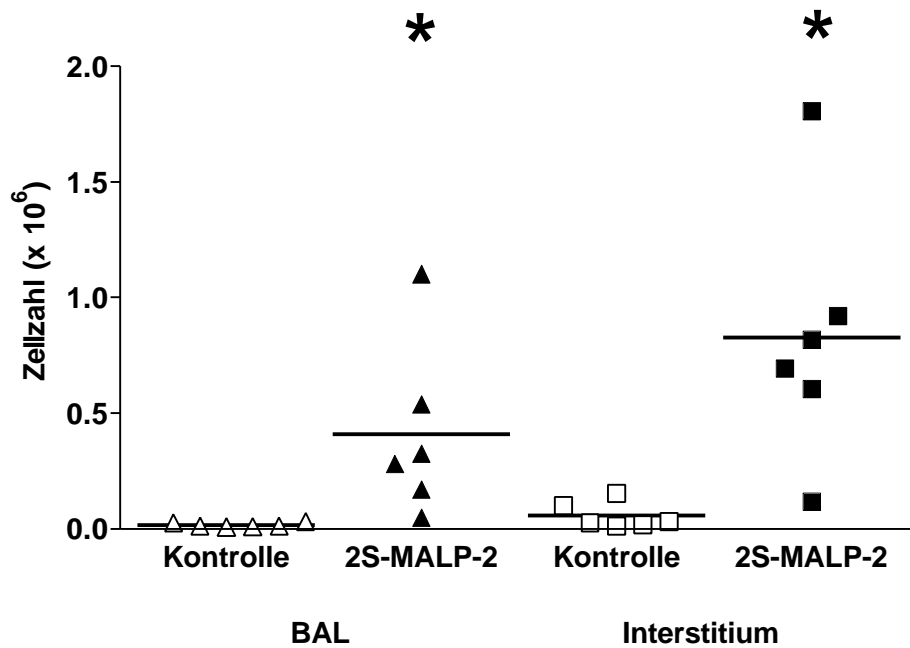


Abb. 3.8 Rekrutment von DC in die BAL (**A**) und des Interstitiums (**B**) 3 Tage nach 2S-MALP-2 Instillation. Durchflusszytometrische Charakterisierung der DC durch Dreifachfärbung. * $p \leq 0.05$ gegenüber der Kontrollgruppe.

3.1.8 Leukozytenzahlen in den drainierenden Lymphknoten nach 2S-MALP-2 Applikation

An Tag 3 nach der Instillation von 2.5 μg 2S-MALP-2 war die Leukozytenzahl in den drainierenden mediastinalen und parathymischen Lymphknoten tendenziell höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine signifikante Erhöhung erreichte nur die NK-Zellpopulation (Abb. 3.9).

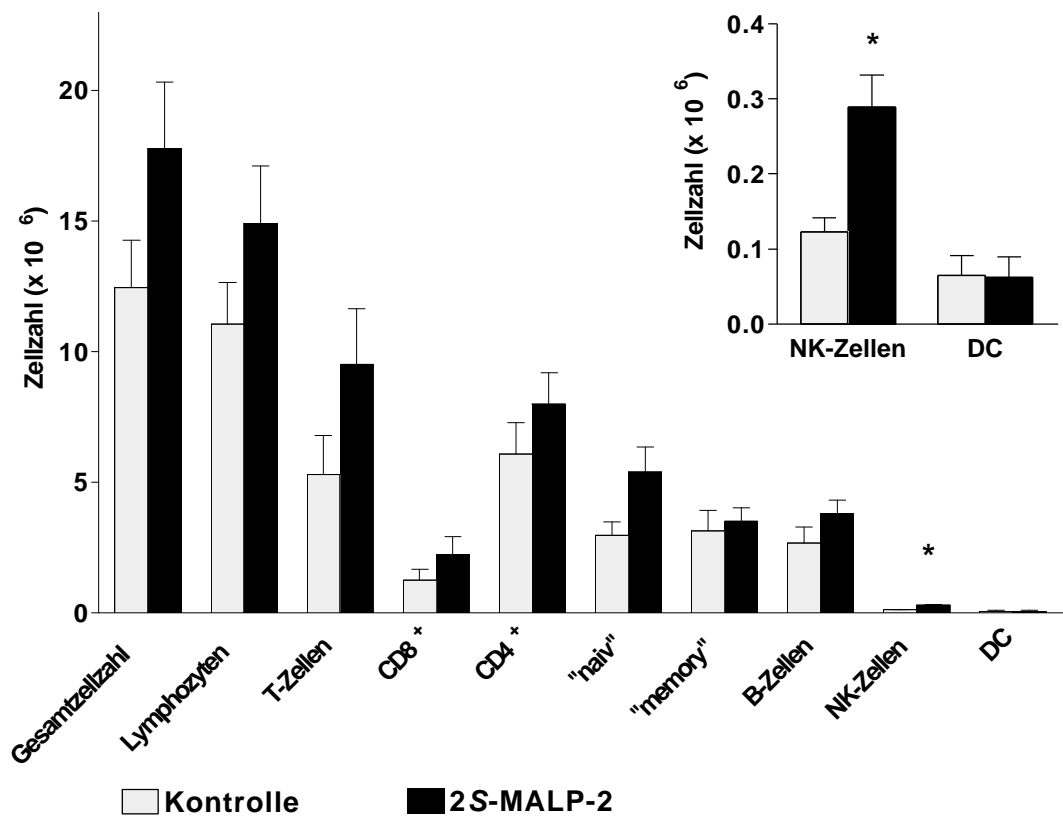


Abb. 3.9 Zellzahlen verschiedener Leukozytensubpopulationen im drainierenden Lymphknoten an Tag 3 nach Behandlung mit 2S-MALP-2. Die Daten sind $\text{MW} \pm \text{SF}$ (n=8), * $p \leq 0.05$ gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

3.2 *In vitro* Effekte von 2S-MALP-2

3.2.1 2S-MALP-2 abhängige Expression der TLR 2 mRNA in AM aus der Rattenlunge

Nach *in vitro* Stimulation der Zellen aus der BAL (bestehend aus etwa 97% AM) mit 10 ng/ml 2S-MALP-2 konnte eine zeitabhängige Expression der mRNA für den TLR 2 beobachtet werden (Abb. 3.10). Die Expression der mRNA war bereits 30 min nach der Stimulation 2.8fach gegenüber der Kontrolle erhöht, 1 h nach der Stimulation war sie um die Hälfte geringer.

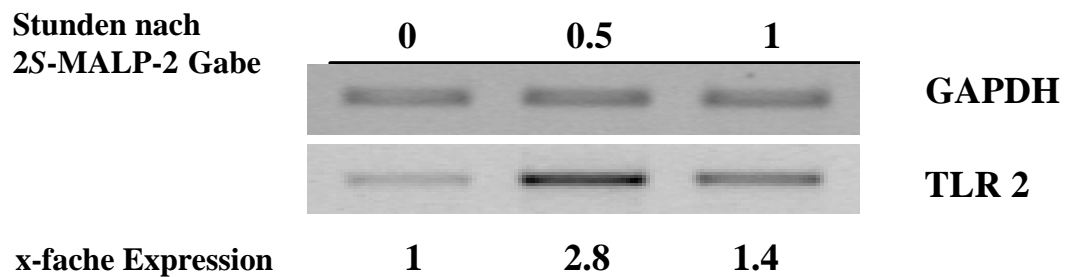


Abb. 3.10 Inkubation von Alveolarmakrophagen mit 10 ng/ml 2S-MALP-2 für 0, 0.5 und 1 h. Nach Isolation der gesamten RNA wurde die mRNA für den TLR 2 durch semiquantitative RT-PCR bestimmt.

3.2.2 Chemotaktische Aktivität im BAL Überstand

Die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen durch aktivierte AM könnte eine Ursache für die Akkumulation von Leukozyten im bronchoalveolären Raum sein. Die chemotaktische Aktivität des BAL Überstandes gegenüber Maus Neutrophilen wurde deshalb getestet. Die chemotaktische Aktivität war 2 und 4 h nach der Stimulation mit 2.5 μg 2S-MALP-2 im BAL Überstand erhöht, das Maximum lag bei 2 h (Abb. 3.11). In den folgenden 4 h sank die Aktivität kontinuierlich. Nach 24 h war der Wert auf das Kontrollniveau zurückgekehrt.

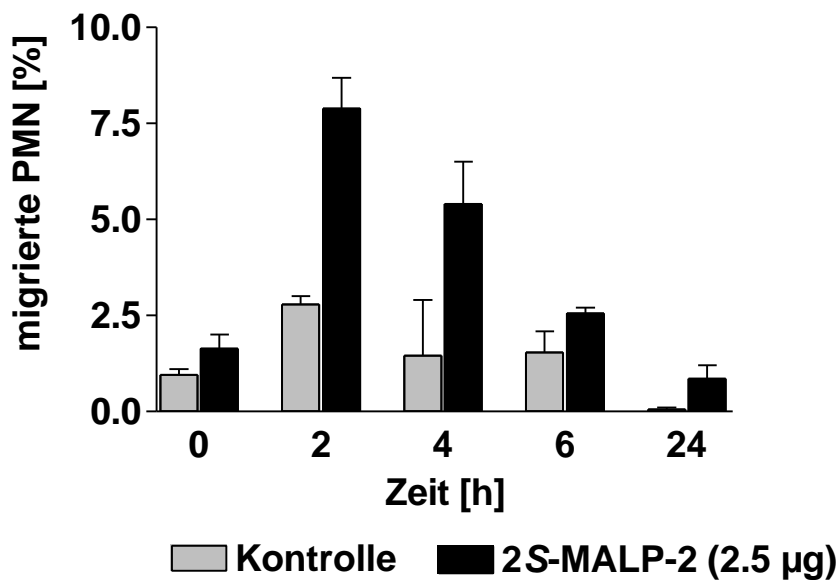


Abb. 3.11 Chemotaktische Aktivität in der BAL nach i.t. Applikation von 2.5 μg 2S-MALP-2. Im Doppelansatz wurde die chemotaktische Aktivität gegenüber PMN in 50 ml BAL Überstand in einer Chemotaxis Kammer bestimmt. Die Daten sind $\text{MW} \pm \text{SF}$ ($n=1$ pro Kontrolle, $n=4$ pro behandelte Gruppe).

3.2.3 MCP-1 in der Lunge von 2S-MALP-2 behandelten Tieren und in der Zellkultur mit 2S-MALP-2 stimulierten BAL Zellen

Neben dem Effekt, den Influx von Neutrophilen in den bronchoalveolären Raum zu verursachen, ist 2S-MALP-2 außerdem für eine Akkumulation von AM verantwortlich (siehe 3.1.1). Um eine Ursache dafür zu finden, wurde MCP-1 (macrophage chemoattractant factor) mittels ELISA im Lungengewebe bestimmt. Zwei Stunden nach 2S-MALP-2 Instillation war die Menge an MCP-1 gegenüber dem 0 h Wert signifikant angestiegen (Tab. 3.2). Nach 24 h befand sich der MCP-1 Level auf einem ähnlich hohen Niveau wie der 2 h Wert.

Zeit nach Instillation von 2.5 µg 2S-MALP-2 (h)	Ratte Nr.	MCP-1 im Lungengewebe (ng/g)
0	1	8.6
	2	8.1
	3	7.2
	MW ± SF	8.0 ± 0.4
2	4	199.1
	5	183.1
	6	197.6
	MW ± SF	193 ± 5.1
24	7	1050.6
	8	166.3
	9	243.3
	MW ± SF	487 ± 283

Tab. 3.2 MCP-1 im Lungengewebe der Ratte nach 2S-MALP-2 Instillation. Die gesamte Lunge der Ratten wurde entnommen, gewogen und bis zum Homogenisieren eingefroren.

Um zu klären, ob AM für die Freisetzung des MCP-1 verantwortlich sind, wurde eine Kultur aus BAL-Zellen (97% AM) angelegt und mit der optimalen Konzentration von 0.3 ng/ml 2S-MALP-2 stimuliert. Zellen, die mit der Kontrollsubstanz für 24 h inkubiert wurden, produzierten geringe Mengen an MCP-1, wohingegen die Menge an MCP-1 nach 2S-MALP-2 Stimulation signifikant anstieg (Abb. 3.12).

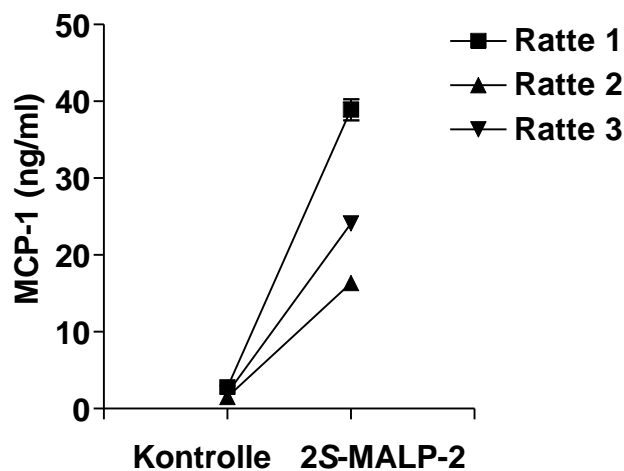


Abb. 3.12 2S-MALP-2 abhängige MCP-1 Freisetzung von Alveolarmakrophagen *in vitro*. Die Zellen der bronchoalveolären Lavage von unbehandelten Ratten wurden mit 0.3 ng/ml 2S-MALP-2 für 24 h inkubiert. Pro Ansatz wurden drei Parallelkulturen angelegt.

3.3 Induktion von BALT durch mehrmalige Inhalation von 2S-MALP-2 über 6 Wochen

In ersten Versuchsreihen sollte überprüft werden, ob 2S-MALP-2 in Lage ist, BALT in der Rattenlunge zu vergrößern. Dazu wurde den Ratten jeweils 25 µg 2S-MALP-2 durch sechsmalige Inhalation im wöchentlichen Abstand verabreicht. Der Allgemeinzustand aller Ratten war unauffällig. Sie hatten keine Probleme bei der Atmung und nahmen über die Behandlungswochen an Körpergewicht zu. Zum Zeitpunkt der Tötung, eine Woche nach der letzten Inhalation, war die Zellzahl in der BAL, des Lungeninterstitiums, des marginalen Pools und im Blut im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht erhöht (Daten nicht gezeigt).

Auf Lungenhistologien war erkennbar, dass BALT sowohl bei den Kontrolltieren (Abb. 3.13 A) als auch bei den behandelten Tieren zu finden war. Bei den MALP-behandelten Tieren war BALT in höherer Anzahl und z.T. in stärkerer hyperplastischer Ausprägung zu finden (Abb. 3.13 B). Die Anschnitte von BALT weisen die charakteristischen morphologischen Merkmale auf wie Infiltration des bedeckenden Bronchialepithels, Keimzentren und hochendotheliale Venulen (HEV). Teilweise ist die Muskularis durchbrochen.

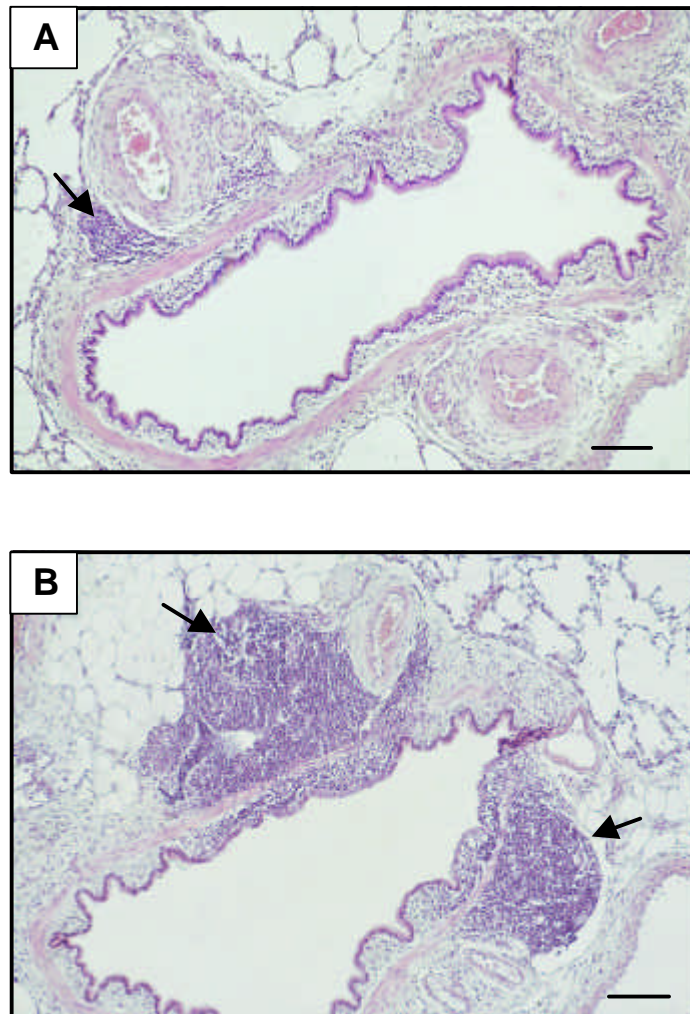


Abb. 3.13 A,B Lungenhistologien nach H&E Färbung zeigen bei den Kontrolltieren kleine Gebiete von BALT (3.14 A). Nach mehrmaliger Inhalation von 2S-MALP-2 bildete sich eine deutlich größere Fläche an BALT aus (Abb. 3.14 B) (Pfeil: BALT, Balken: 100 μ m).

Die semiquantitative mikroskopische Auszählung zeigte, dass es nach mehrmaliger Inhalation von 2S-MALP-2 in den zwei untersuchten Tieren zu einer deutlichen Erhöhung der Fläche an BALT kommt (Abb. 3.14).

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Luftwege in verschiedene Größenklassen nach Durchmesser unterteilt. Der Anteil an Luftwegsanschnitten mit BALT im Bereich der mittleren Atemwege war erhöht. Bei den größeren und kleineren Luftwegen war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen (Abb. 3.15).

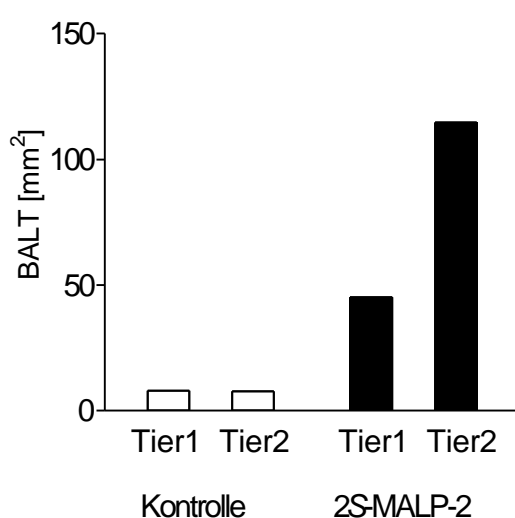


Abb. 3.14 Für die Lungen von 2 Kontrolltieren und 2 behandelten Tieren wurde die Fläche an BALT semiquantitativ bestimmt

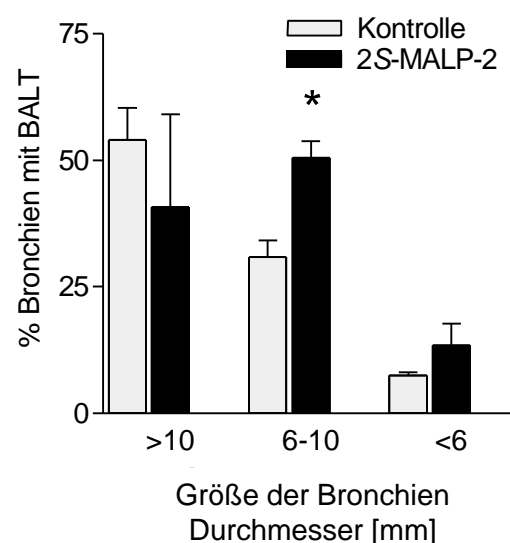


Abb. 3.15 Vergleich des Vorkommens von BALT in Kontrollen (n=3) und mit 2S-MALP-2 behandelten Ratten (n=5). Dargestellt sind die Anteile von angeschnittenen Luftwegen, an denen BALT vorkam. Daten sind MW \pm SF, *p \leq 0.05 gegenüber der Kontrolle

3.4 Vergleich von jungen mit adulten Ratten

3.4.1 Morphologische Unterschiede bei jungen und adulten Ratten in der Lungenstruktur

Die Präparate zeigen Lungengewebe in einem vergleichbaren Entfaltungszustand (Abb. 3.16). Bei den jungen Ratten (3.16 A) war mehr interstitielles Gewebe und dickere Alveolarsepten im Vergleich zu den Lungen von den adulten Tieren (3.16 B) zu erkennen.

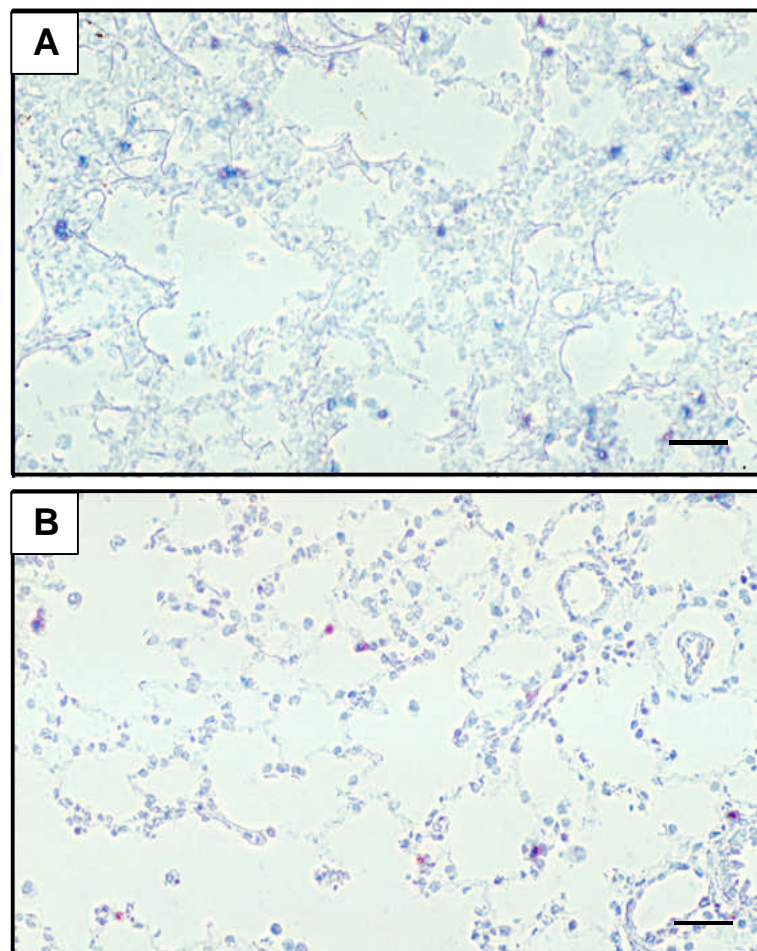


Abb. 3.16 A,B Repräsentative Paraffinschnitte der Lunge unbehandelter Jungtatten (**A**) und adulten Ratten (**B**) nach H&E Färbung (Balken: 100 μ m).

3.4.2 Unterschiedliche Zellpopulationen in der BAL und im Lungeninterstitium von jungen und adulten Ratten

Die Lunge einer adulten Ratte wiegt etwa 1 g und ist damit etwa doppelt so schwer wie die einer jungen Ratte. Daher wurden die Zellzahlen der Jungtiere zur direkten Vergleichbarkeit verdoppelt. Die Immunzellen in der BAL waren bei den adulten Tieren tendenziell höher als bei Jungratten. Die T-Zellpopulation war bei den adulten Tieren 10fach höher als bei den jungen Ratten. Die CD4⁺ Zellen waren bei den adulten Tieren 12fach höher gegenüber den jungen Tieren (Abb. 3.17). Auch bei den DC konnte im adulten Alter eine 6fach höhere Zellzahl gemessen werden.

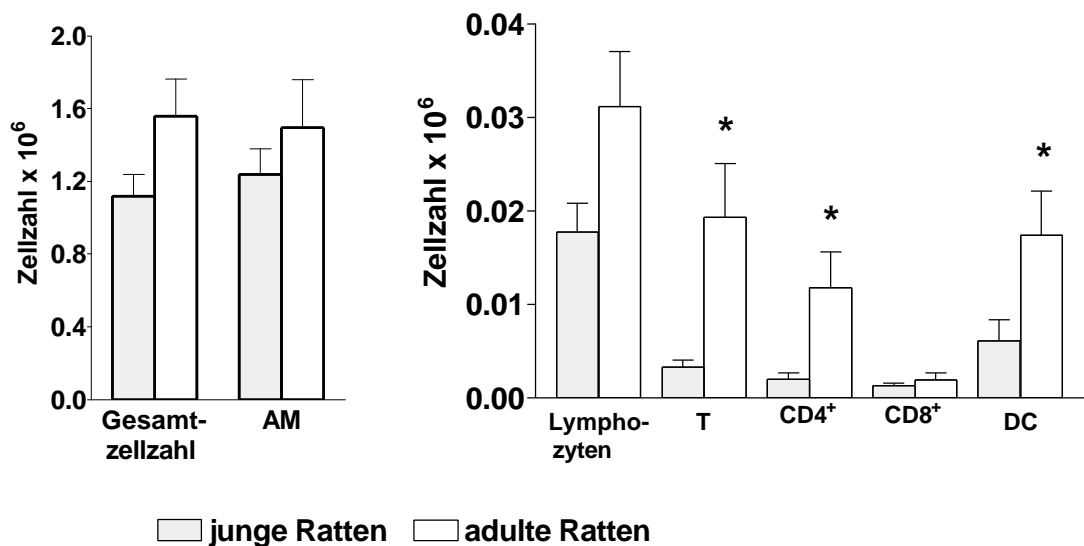


Abb. 3.17 Gesamtzellzahlen und Leukozytenpopulationen aus der BAL von unbehandelten jungen ($76 \text{ g} \pm 3.8 \text{ g}$, $n=5$) und adulten Ratten ($259 \text{ g} \pm 56 \text{ g}$, $n=8$), * $p < 0.05$ gegenüber den jungen Ratten.

Bei der Untersuchung des Lungeninterstitiums wiesen die Jungtiere dagegen eine signifikant höhere Zellzahl verglichen mit der Zellzahl der adulten Tiere auf (Abb. 3.18). Hierbei war sowohl die Zahl der Lymphozyten als auch die der B-Zellpopulation bei den Jungtieren etwa 15fach höher. Die Zahl der DC der Jungtiere war 3fach höher gegenüber den DC der adulten Tiere.

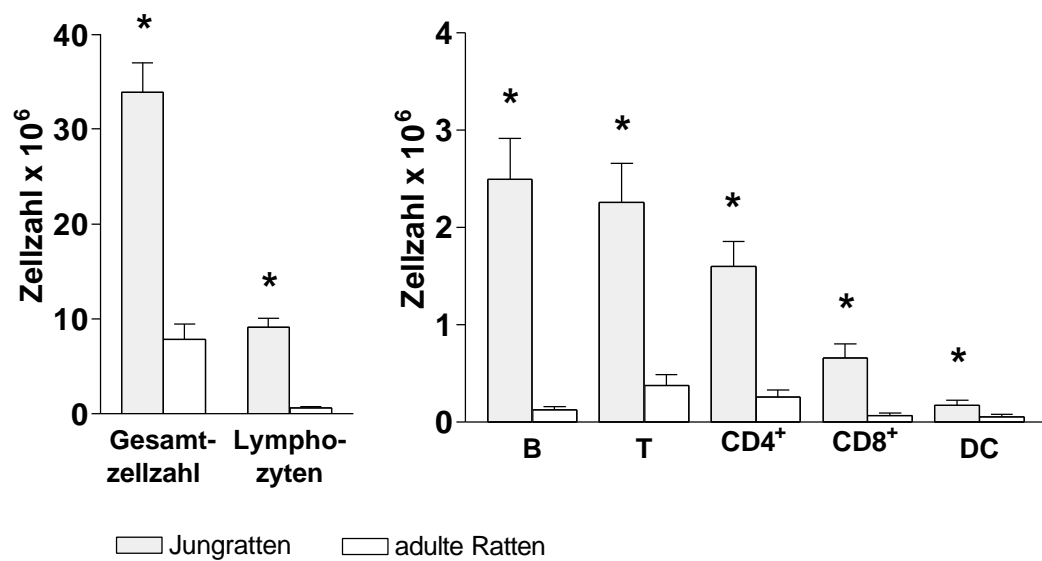


Abb. 3.18 Gesamtzellzahlen und Leukozytenpopulationen aus dem Lungeninterstitium von unbehandelten Jungtieren ($76 \text{ g} \pm 3.8 \text{ g}$, $n=5$) und adulten Tieren ($259 \text{ g} \pm 56 \text{ g}$, $n=8$), $*p \leq 0.05$ gegenüber den adulten Ratten.

3.4.3 Zellpopulationen in der BAL und im Lungeninterstitium von jungen Ratten im Vergleich zu adulten Ratten nach i.t. Applikation von 2S-MALP-2

Bei den Jungratten wurde 0.01 μg pro 1 g Körpergewicht 2S-MALP-2 intratracheal unter Vollnarkose appliziert. Drei Tage nach Behandlung hatte sich die Gesamtzellzahl in der BAL unter 2S-MALP-2 Behandlung um das 2.7fache erhöht. Mit Ausnahme der T-Zellen waren alle untersuchten Zellpopulationen nach 2S-MALP-2 tendenziell aber nicht signifikant erhöht (Abb. 3.19).

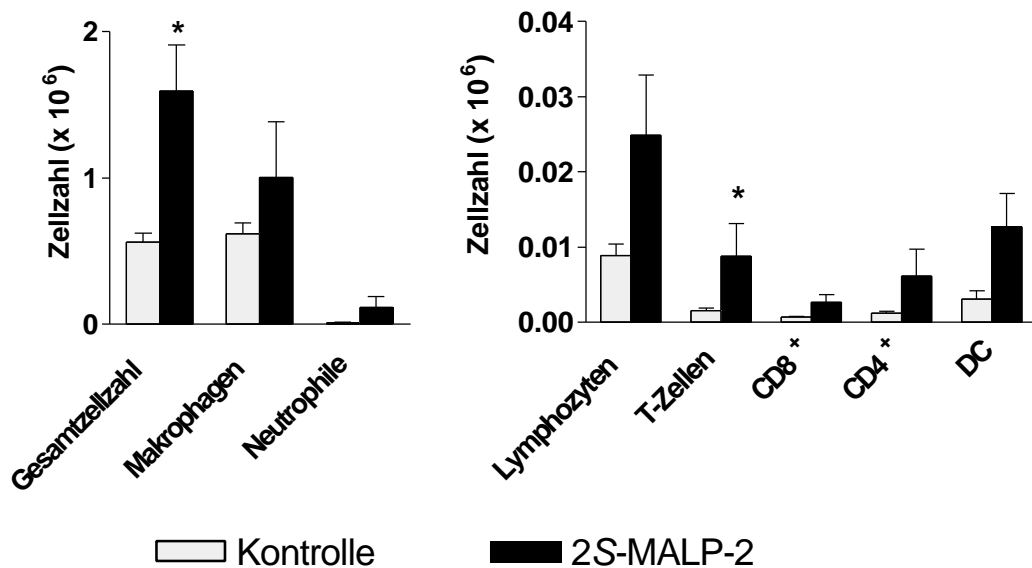


Abb. 3.19 Gesamtzellzahl und Leukozytenzahl in der BAL von jungen Ratten 3 Tage nach i.t. Instillation von 2S-MALP-2. Daten sind MW \pm SF (n=5), *p \leq 0.01 gegenüber der Kontrolle.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Gesamtzellzahlen, die Zellzahlen von Makrophagen/Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten nach Applikation der 2S-MALP-2 in jungen und adulten Ratten gegenüber gestellt (Abb. 3.20). Die Zellzahlen der jungen Ratten befinden sich bei den Kontrollen und nach 2S-MALP-2 Behandlung etwa auf dem Zellzahlniveau der adulten Kontrolltiere.

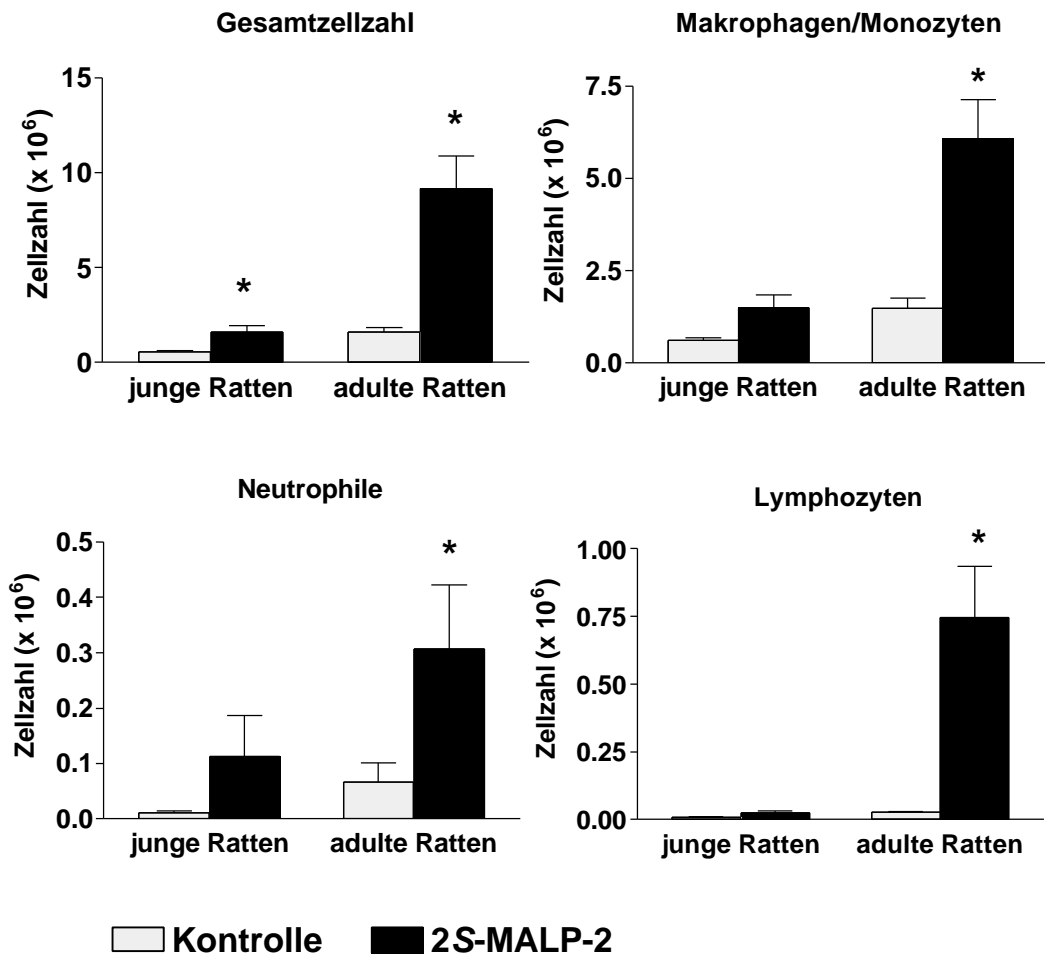


Abb. 3.20 Vergleich der Zellzahlen der BAL von jungen und adulten Ratten, jeweils die Kontrollen gegenüber den 2S-MALP-2 behandelten Tieren (0.01 µg 2S-MALP-2 pro 1g Körpergewicht). Siehe auch Abb. 3.1 und Abb. 3.19. *p ≤ 0.05 gegenüber der Kontrolle.

Im Lungeninterstitium war die Zellzahl bei den jungen Ratten nach 2S-MALP-2 Behandlung tendenziell niedriger als in der Kontrolle. Hierbei war die Zahl der Lymphozyten und B-Zellen signifikant verringert (Abb. 3.21).

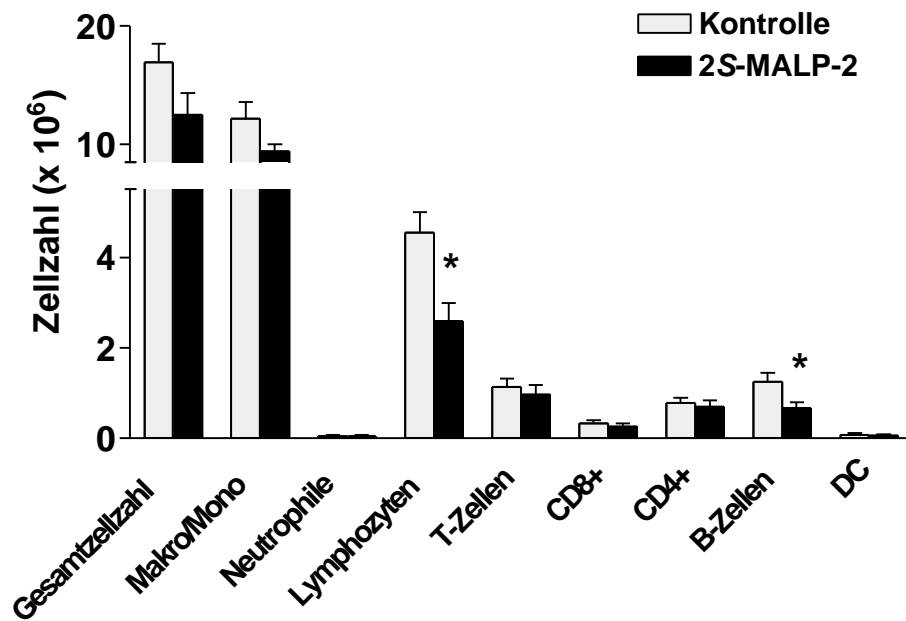


Abb. 3.21 Gesamtzellzahl und Leukozytenzahl im Lungeninterstitium von Jungtieren 3 Tage nach der i.t. Instillation von 2S-MALP-2. Daten sind $MW \pm SF$ ($n=5$), $*p \leq 0.05$ gegenüber der Kontrolle.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auch hier die Gesamtzellzahlen, die Zellzahlen von Makrophagen/Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten nach Applikation der 2S-MALP-2 in jungen und adulten Ratten gegenüber gestellt (Abb. 3.6, Abb. 3.21). Die Gesamtzellzahlen der jungen Ratten lagen auf dem gleichen Zellzahlniveau wie die adulte, mit 2S-MALP-2 behandelte Gruppe. Die Zahl der Neutrophilen war bei den adulten Tieren höher, Makrophagen- und Lymphozytenzahlen waren geringer als bei den jungen Tieren.

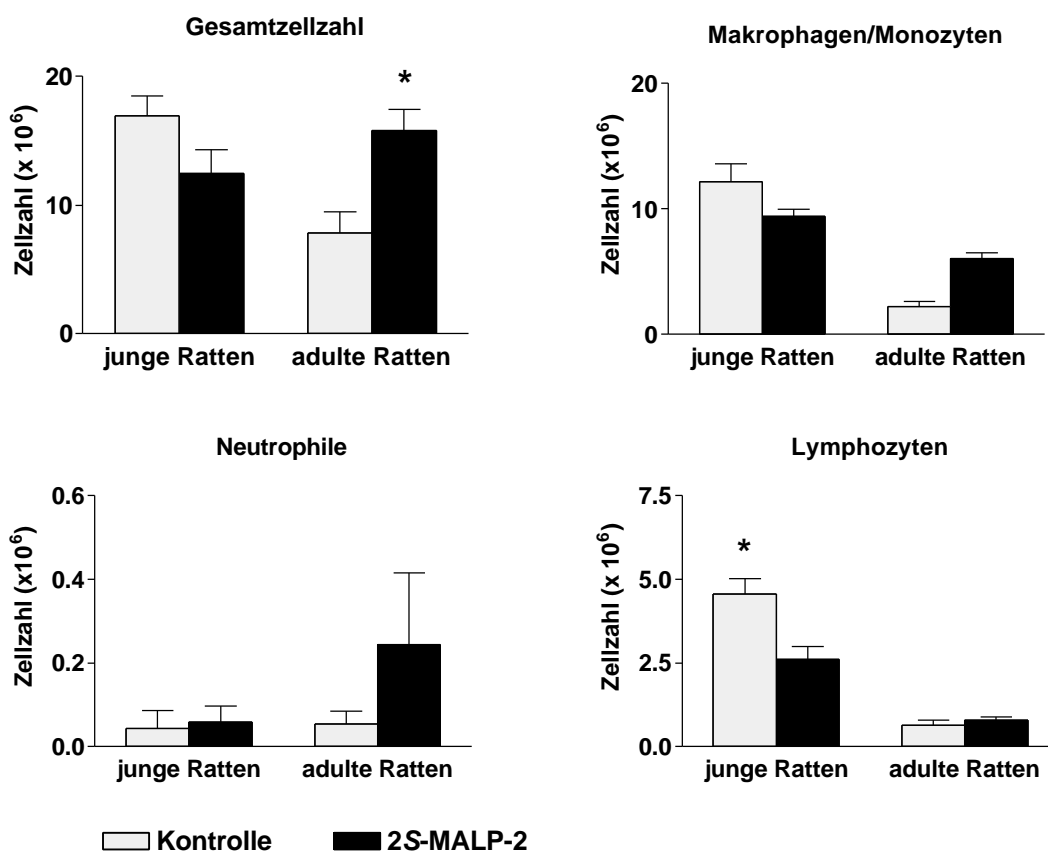


Abb. 3.22 Vergleich der Zellzahlen aus dem Lungeninterstitium von jungen und adulten Ratten, jeweils die Kontrollen gegenüber den 2S-MALP-2 behandelten Tieren ($0.01 \mu\text{g}$ 2S-MALP-2 pro 1 g Körpergewicht). Siehe auch Abb. 3.6 und Abb. 3.21. $*p \leq 0.05$ gegenüber der Kontrolle.

3.5 Auswirkungen der Aktivierung des unspezifischen Immunsystems durch 2S-MALP-2 auf die Bildung von Mikrometastasen in der Lunge

Mit der Mikrometastasenbildung geht eine verminderte Gewichtszunahme in den Tagen nach der Behandlung einher. Die Tiere zweier Versuchsgruppen bekamen zunächst MADB 106 Zellen injiziert. Die erste Gruppe wurde zusätzlich mit der Lösungsmittelkontrolle des 2S-MALP-2 behandelt, den Tieren der zweiten Gruppe wurde 2.5 µg 2S-MALP-2 appliziert. Die Tiere der mit 2S-MALP-2 behandelten Gruppe hatten an Tag 21 signifikant mehr Gewicht zugenommen gegenüber der Kontrollgruppe (11.2 g ± 3.4 g vs. 18.7 g ± 6.1 g).

Lungenmikrometastasen wurden 3 Wochen nach gleichzeitiger Applikation von Tumorzellen und 2S-MALP-2 histologisch ausgezählt. Die Zahl der Mikrometastasen in der Lunge verringerte sich um 44% nach 2S-MALP-2 Behandlung (Abb. 3.23).

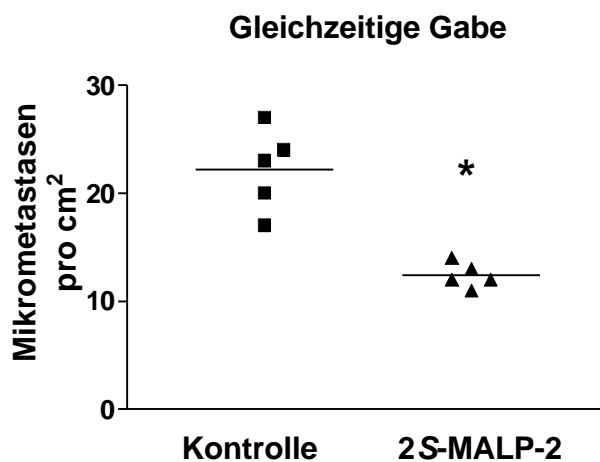


Abb. 3.23 Lungenmikrometastasen 3 Wochen nach gleichzeitiger 2S-MALP-2 bzw. Kontrolllösung und MADB 106 Zell-Applikation, (n=5) *p ≤ 0.05 gegenüber der Kontrolle.

4 Diskussion

4.1 In einem Rattenmodell kann durch die Applikation des Lipopeptids 2S-MALP-2 ein Anstieg von Immunzellen in der Lunge beobachtet werden

Intratracheal appliziertes 2S-MALP-2 löst eine dosis- und zeitabhängige Zellakkumulation in den verschiedenen Kompartimenten der Rattenlunge aus. Dies konnte durch etablierte Methoden wie Zytospotanalyse, Immunhistologie, Durchflusszytometrie und Histologie deutlich gezeigt werden. Die Applikation des Lipopeptids und der Kontrollsubstanz durch i.t. Instillation konnte zuverlässig durchgeführt werden und gilt als etablierte Methode, die mit der Inhalation vergleichbar ist (32, 62).

Das ursprünglich aus Mykoplasmen isolierte Lipopeptid MALP-2 kann seit einiger Zeit auch synthetisch, in zwei stereoisomeren Konfigurationen, hergestellt werden (58): 2R-MALP-2 und 2S-MALP-2. Letzteres verfügt über eine hohe biologische Aktivität und entspricht dem in der Zytoplasmamembran der Mykoplasmen vorkommendem Lipopeptid. Das lediglich als Syntheseprodukt vorkommende 2R-MALP-2 hat eine um das 100fache geringere biologische Aktivität als 2S-MALP-2 (82). Diese wird vermutlich durch geringe „Verunreinigungen“ mit dem aktiven Stereoisomer 2S-MALP-2 verursacht, die infolge des Syntheseweges nicht vollständig zu vermeiden sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass i.p. bzw. i.t. appliziertes 2S-MALP-2 eine Zellakkumulation in der Lunge von Ratten auslöst. Frühere Untersuchungen in der Maus haben einen deutlichen Anstieg von peritonealen Immunzellen nach i.p. Applikation gezeigt (20). Die Lunge wurde in diesem Modell nicht untersucht. In der Ratte konnte nach i.p. applizierter Dosis 2S-MALP-2 ein geringer Anstieg von Immunzellen in der Lunge beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch systemisch appliziertes 2S-MALP-2 die Zahl der Immunzellen in der Lunge erhöht. Möglicherweise ist die Zahl der Immunzellen im Blut nach i.p. Applikation

angestiegen und während der Blutzirkulation bleiben einige dieser Zellen in der Lunge „hängen“. Nach i.t. Applikation von 2S-MALP-2 kam es gegenüber der i.p. Applikation zu einer starken Akkumulation von Immunzellen. Das lokal in der Lunge wirkende 2S-MALP-2 besitzt demzufolge ein höheres Potential für die Auslösung einer Reaktion in der Lunge. Die Instillation einer gleichen Dosis an 2R-MALP-2 verursachte keine Akkumulation von Immunzellen im bronchoalveolären Raum und im interstitiellen Gewebe. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem 2R-MALP-2 waren gleichzusetzen mit denen nach der Applikation des Lösungsmittels 2-Propanol. Dieses Resultat zeigt, dass der Zellanzahlanstieg nicht durch einen unspezifischen Reiz wie z.B. durch den Instillationsprozess oder durch das instillierte Volumen an sich ausgelöst wurde. Durch die Versuche mit dem Stereoisomer 2R-MALP-2 konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass die Akkumulation der Immunzellen durch einen spezifischen Effekt, ausgelöst durch das 2S-MALP-2, verursacht wurde. Der direkte Nachweis des 2S-MALP-2 durch einen NO-Freisetzungstest zeigte, dass unmittelbar nach der Instillation nur etwa 10% der verabreichten Menge im Lungengewebe nachgewiesen werden konnte. Es ist wahrscheinlich, dass ein Teil des instillierten Volumens durch mukoziliäre Clearance nicht abgeatmet sondern verschluckt wird. Dies bedeutet, dass 250 ng 2S-MALP-2 und damit eine sehr geringe Menge eine Leukozytenakkumulation hervorrufen kann. Berechnet auf ein durchschnittliches Rattenlungenvolumen von etwa 10 ml würde sich eine 2S-MALP-2 Konzentration von 25 ng/ml errechnen lassen. Dies ist vergleichbar mit den Konzentrationen, die auch für *in vitro* Stimulationversuche eingesetzt wurden. Eine Zellaktivierung konnte hier sogar schon durch Konzentrationen im pg-Bereich pro ml ausgelöst werden (20, 82).

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass es sich um eine dosisabhängige Zellakkumulation handelt. Löste die Applikation von 0.25 µg 2S-MALP-2 an Tag 3 eine relativ geringe Leukozytenakkumulation aus, so konnte nach 2.5 µg i.t. verabreichtem 2S-MALP-2 ein signifikanter

Leukozytenanstieg gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Lungenhistologien unterstützten die Ergebnisse aus der BAL, die zeigten, dass 25 µg 2S-MALP-2 einen sehr starken Leukozyteneinstrom bewirkt. Hier war vor allem die Zahl der Neutrophilen drastisch angestiegen. Nach 25 µg 2S-MALP-2 waren multifokale, pneumonie-ähnliche Infiltrate im Lungengewebe zu finden. 2S-MALP-2 in hohen Dosen verabreicht, hat möglicherweise eine toxische Wirkung auf das Lungengewebe. Für die Charakterisierung der Reaktion in der Lunge auf das 2S-MALP-2 zu verschiedenen Zeitpunkten wurde deshalb eine Dosis von 2.5 µg verwendet. Nach i.t. Behandlung der Ratten war ein zeitabhängiger Einstrom verschiedener Immunzellen zu beobachten. Innerhalb von 48 bis 72 h kam es zunächst zu einem dramatischen Anstieg und einer vergleichbaren Abnahme von Neutrophilen. Die Zahl der Makrophagen und Lymphozyten nahm in dieser Zeit ebenfalls stark zu und erreicht ihr Maximum an Tag 3. Die Abfolge der Einwanderung von Immunzellen ist charakteristisch für andere pulmonale Immunreaktionen, die durch bakterielle Antigene ausgelöst werden (52). Da die Zellzahl der untersuchten Zellpopulationen nach 10 Tagen wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt war, kann die einmalige Gabe von 2S-MALP-2 eine Zellakkumulation hervorrufen, die schon nach relativ kurzer Zeit abgeklungen ist.

Die Charakterisierung der Immunzellen in der BAL an Tag 3 nach der Instillation zeigte, dass sowohl Makrophagen und DC als auch verschiedene Lymphozytensubpopulationen im Vergleich zur Kontrolle um ein vielfaches häufiger zu finden sind. Eine Zellzahlerhöhung in der BAL deutet auf eine Immunreaktion im bronchoalveolären Raum hin (52). Die Zellzusammensetzung der BAL spiegelt allerdings nur die immunologische Situation in einem Kompartiment des bronchoalveolären Raumes wieder und kann nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die gesamte Lunge zulassen. In der unbehandelten Rattenlunge lag die Zahl der Lymphozyten im Mittel nicht über 3×10^4 Zellen, was 2% der Gesamtpopulation ausmachte. Für die Auswertung der Ergebnisse erschien es wichtig, nicht nur die prozentualen Anteile bei

Kontroll- und mit 2S-MALP-2 behandelten Tieren zu vergleichen, sondern ein besonderes Augenmerk auf die absoluten Zellzahlen zu lenken. Dies soll an zwei repräsentativen Beispielen verdeutlicht werden. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten erhöhte sich nach 2S-MALP-2 um das 3.5fache, was in der Berechnung der absoluten Zellzahl einen Anstieg um das 25fache ausmachte. Ein Unterschied verdeutlicht sich noch drastischer am Beispiel der T-Lymphozytenpopulation. Der prozentuale Anteil lag bei Kontrolltieren bei 50% und war nach 2S-MALP-2 Behandlung mit 57% fast gleich. Beim Vergleich der absoluten Zellzahlen ergab sich eine Erhöhung um mehr als das 20fache. Diese Unterschiede lassen sich durch den starken Anstieg der Gesamtzellzahlen erklären, dabei ändert sich der Anteil der einzelnen Zellpopulationen an der Gesamtzellzahl nur geringfügig. Frühere Untersuchungen zeigten, dass der prozentuale Anteil einzelner Zellpopulationen in der Lewisratte von den in dieser Arbeit erhobenen Daten differieren können (25, 44). Dies kann teilweise durch unterschiedliche Haltungsbedingungen der Versuchstiere erklärt werden.

Im Lungeninterstitium war die Gesamtzellzahl und die Zahl der Makrophagen/Monozyten nach 2S-MALP-2 gegenüber der Kontrolle stark erhöht. Die Zellzahlen des peripheren Blutes und des marginalen Pools waren im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht. Bei diesen Untersuchungen bleibt unklar, wie es zum Zellzahlanstieg der verschiedenen Populationen kommt. Die Zellakkumulation könnte durch die Aktivierung von Vorläuferzellen im Knochenmark, deren Proliferation und verstärkte Einwanderung in die Lunge verursacht worden sein. Es wäre aber auch möglich, dass eine erhöhte lokale Proliferation die Ursache für die Zellzahlerhöhung ist (70). In weiterführenden Untersuchungen könnte die Proliferationsrate z.B. durch den Einbau von 5'-Brom 2'-Desoxyuridin ermittelt werden.

Eine erhöhte Zahl an Monozyten könnte möglicherweise durch einen lokalen chemotaktischen Reiz zur Lunge „gelockt“ worden sein und sich dort zu Makrophagen differenziert haben. Die Zahl der Monozyten im Blut ist an Tag 3 allerdings gegenüber der Kontrolle nicht erhöht. Für eine genauere

Beurteilung müsste deshalb das Blut zu einem früheren Zeitpunkt untersucht werden. Makrophagen könnten außerdem durch 2S-MALP-2 lokal im Lungeninterstitium proliferiert und in den bronchoalveolären Raum eingetreten sein. Ein Anhaltspunkt dafür könnte die erhöhte Zahl der Monozyten/Makrophagenpopulation im Interstitium an Tag 3 sein. Im Interstitium und der BAL konnte an Tag 3 nach 2S-MALP-2 Behandlung ebenfalls eine erhöhte Zahl an dendritischen Zellen festgestellt werden. Zellen aus der BAL von Mäusen mit geringer Dichte, niedriger Autofluoreszenz, T- und B-Zellmarker negativ, MHC II negativ und Ox62 negativ wurden von Lambrecht et al. (45) im Durchflusszytomer als DC identifiziert. Diese Methode wurde in den vorliegenden Untersuchungen auf Rattenzellen übertragen. Die Charakterisierung von DC in der Ratte stellt zur Zeit noch ein Problem dar. DC sind durch wechselnde Expression von Oberflächenmolekülen je nach Mikromilieu in ihren verschiedenen Reifungszuständen schwer zu identifizieren und von den Lungenmakrophagen häufig schwer zu unterscheiden. Unklar ist, ob die DC aus dem Knochenmark in das Lungeninterstitium und den bronchoalveolären Raum einwandern oder ob sich ortsständige Vorläufer DC durch den MALP-2 Stimulus zu positiven Ox6 und Ox62 Zellen differenzieren.

Inwieweit die Zellen des marginalen Pools in das Rekrutment der Zellen bei der Reaktion nach 2S-MALP-2 beteiligt sind, bleibt unklar. An Tag 3 nach 2S-MALP-2 Applikation zeigten sich keine Auffälligkeiten gegenüber der Kontrolle. Da die Lunge keine afferenten Lymphgefäße besitzt, müssen Immunzellen, die nicht in der Lunge proliferieren, über Blutgefäße in die Lunge einwandern. Daher wäre es durchaus zu erwarten gewesen, dass einzelne Zellpopulationen im Blut erhöht vorhanden gewesen wären. Untersuchungen zu einem früheren Zeitpunkt nach Behandlung könnten Aufschluss darüber geben.

Zum gleichen Zeitpunkt, an dem erhöhte Leukozytenzahlen in der BAL und dem Lungeninterstitium nach 2S-MALP-2 Applikation beobachtet wurden, war dagegen in den drainierenden Lymphknoten keine Erhöhung zu erkennen.

Erwartungsgemäß wird ein Antigen durch DC aufgenommen und in die lungendrainierenden Lymphknoten den Lymphozyten präsentiert (66). Demzufolge hätte erwartet werden können, dass die Zahl der DC und Lymphozyten an Tag 3 im Lymphknoten erhöht sein würde. Möglicherweise sind die DC durch Veränderung der Oberflächenmoleküle nicht detektiert worden oder der Zeitpunkt ist nicht günstig gewählt. Untersuchungen von McWilliam and Holt (57) haben gezeigt, dass es nach der Induktion einer Immunantwort durch Inhalation eines bakteriellen Antigens zu einer Akkumulation von MHC II DC-Vorläuferzellen im Lungeninterstitium kommt. Bereits 48 h später sind diese Zellen in den regionalen Lymphknoten wiederzufinden.

4.2 *In vitro* Untersuchungen geben Aufschluss über den Wirkmechanismus von 2S-MALP-2 mit den Immunzellen der Lunge

Nach der Behandlung von Zellen aus der BAL mit 2S-MALP-2 konnte eine Aktivierung über den TLR 2 festgestellt werden. Es ist bekannt, dass 2S-MALP-2 über die Bindung an den TLR 2 und TLR 6 in der Lage ist Makrophagen bzw. embryonale Fibroblasten zu aktivieren (82, 83). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass für die Aktivierung die Bindung über eine einzelne TLR-Gruppe oftmals nicht ausreicht. Zellen werden z.B. nur dann aktiviert, wenn zusätzlich zur Bindung an TLR 2 die Bindung an TLR 6 oder 1 gewährleistet ist (30, 65, 83). Von humanen Monozyten, DC und Neutrophilen ist bekannt, dass sie TLR 2 und 6 auf ihrer Oberfläche exprimieren (26). In der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel des TLR 2 mRNA Expression die Aktivierung des Rezeptors durch 2S-MALP-2 gezeigt und eine Aussage über den Zeitraum dieser Aktivierung gegeben werden. Da sich die BAL zu etwa 97% aus der Makrophagen/Monozytenpopulation zusammensetzt, war eine Isolation dieser Zellen vor der Stimulation mit 2S-MALP-2 nicht notwendig. Die erhöhte Expression der

mRNA für TLR 2 30 min nach Aktivierungsbeginn und die schnelle Herabregulation nach weiteren 30 min zeigt, dass 2S-MALP-2 eine schnelle und kurz dauernde Wirkung auf die Zellpopulation ausübt. Vermutlich verläuft die Aktivierung über den TLR 6 ähnlich schnell, da ein Zusammenwirken beider Rezeptoren für eine Zellaktivierung unbedingt notwendig ist (s.o.) und der zelluläre Einstrom von Immunzellen bereits einige Stunden nach der 2S-MALP-2 Applikation zu beobachten war (Abb. 3.4). Unklar bleibt allerdings, inwieweit der Rezeptor auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wird. Dies könnte möglicherweise durch die immunhistologische Färbung von mit 2S-MALP-2 stimulierten BAL Zellen auf Zytospots mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Allerdings steht dieser Antikörper für das Rattensystem zur Zeit noch nicht zur Verfügung.

Die Ergebnisse aus den *in vivo* Versuchen zur Chemotaxis bestärken die These, dass die Aktivierung relativ schnell nach i.t. Instillation stattfindet. Der Überstand der BAL wies bereits 2 h nach der Behandlung die höchste chemotaktische Aktivität gegenüber Neutrophilen auf. Die Neutrophilen waren dann auch bereits 6 h nach Instillation von 2S-MALP-2 stark angestiegen (Abb. 3.4). Bei genauerer Charakterisierung der Chemokine konnte nach 2 h eine erhöhte Konzentration an MCP-1 im Lungenhomogenisat festgestellt werden. *In vitro* Versuche mit Zellen der BAL bestätigten die Vermutung, dass MCP-1 von Monozyten bzw. Makrophagen nach Stimulation freigesetzt wird. Zielzellen des Chemokines MCP-1 sind u.a. Monozyten, unreife DC Neutrophile, „memory“ T-Lymphozyten und NK-Zellen (61, 74). Die Hauptaufgabe der Chemokine besteht darin, die Einwanderung und Migration von Leukozyten in Gewebe zu initiieren und zu regulieren, d.h. Chemokine sind potente Zellaktivatoren (19). Der chemotaktische Reiz, den MCP-1 bereits nach 2 h und ebenfalls nach 24 h auf die verschiedenen Leukozytenpopulationen ausübt, könnte eine Erklärung für den beobachteten Anstieg der Monozyten-/Makrophagen- und Lymphozytenpopulation 24 h nach der Behandlung mit 2S-MALP-2 sein. Es ist wahrscheinlich, dass zusätzlich noch andere Chemokine bei der Initiation und Regulation der

Leukozyteninfiltration eine wichtige Rolle spielen. Deiters und Mühlradt (20) konnten in ihren Versuchen im Mausmodell nach der i.p. Applikation von 2S-MALP-2 zusätzlich zur Freisetzung von MCP-1 auch andere Chemokinen wie MIP-1 alpha und MIP-2 nachweisen. Nach *in vitro* Stimulation von humanen Monozyten durch 2S-MALP-2 konnte die Freisetzung von IL8, MCP-1, MIP-1 alpha und MIP-1 beta beobachtet werden (43). Die Zellakkumulation in der Lunge ist charakteristisch für pulmonale Immunreaktionen (52). Die durch 2S-MALP-2 ausgelöste zelluläre Reaktion ähnelt sehr stark einer Reaktion, die direkt durch Mycoplasma Keime hervorgerufen wird. Beide sind charakterisiert durch einen frühen Influx von Neutrophilen und den sich anschließenden Anstieg von Makrophagen und Lymphozyten (39, 51, 87). Mycoplasmeninfektionen können schwerwiegende Lungenerkrankungen im Menschen und in Tieren verursachen (39, 40). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse liefern Erkenntnisse, die auch für die Erforschung von Mycoplasmenerkrankungen und deren Behandlung interessant sein könnten.

4.3 Nach wiederholter Applikation von 2S-MALP-2 kann BALT induziert werden

Nach der repetitiven Inhalation von 2S-MALP-2 konnte eine höhere Fläche an BALT gegenüber dem Lungengewebe aus Kontrolltieren festgestellt werden. In zwei Inhalationsversuchsreihen wurde jeweils mit einer geringen Zahl an Tieren BALT im Lungengewebe semiquantitativ, exemplarisch an jeweils 10 Serienschnitten, bestimmt. Die Serie wurde im Bereich der größeren Bronchien angefertigt, vernachlässigt wurden die Bereiche der Peripherie. An dieser Stelle sei betont, dass die Versuche als ein „proof of principle“ verstanden werden sollen, auf deren Ergebnisse sich nachfolgende Versuchsplanungen beziehen können. Sowohl die geringe Zahl an Tieren als auch die semiquantitative Auswertung kann nur einen ersten Hinweis auf die Wirkung von inhalativ verabreichtem 2S-MALP-2 geben.

BALT ist eine lymphatische Struktur, die durch ihre spezifische histologische Morphologie charakterisiert werden kann. Das Vorkommen und die Entwicklung von BALT ist unterschiedlich in den verschiedenen Tierspezies (67). Es ist bekannt, dass BALT im Tiermodell durch die i.t. Applikation verschiedener Reagenzien induziert werden kann (21, 67). Unbehandelte, SPF gehaltene Lewisratten besitzen BALT (interne Beobachtung). Nach mehrmaliger Inhalation mit 2S-MALP-2 war die Fläche an BALT gegenüber der in den Kontrolllungen vergrößert. In einem Infektionsmodell konnte nach zehnfacher wöchentlicher Inhalation von *Pseudomonas aeruginosa* Keimen im Lungengewebe von Mäusen, BALT induziert werden. In der gleichen Studie konnten markierte *Pseudomonas*-Keime im BALT identifiziert werden (85). Ein bakterielles Antigen kann demzufolge für die Induktion und Entwicklung von BALT verantwortlich gemacht werden. Außerdem zeigen die Versuche, dass BALT an der Aufnahme von Antigenen beteiligt ist (85). Unklar bleibt, welche Mechanismen die Antigenaufnahme beeinflussen. Die Aktivierung des Immunsystems mit 2S-MALP-2 führt zu einem veränderten Mikromilieu im bronchoalveolären Raum. Dieses Milieu stellt möglicherweise den Ort da, zu dem Immunzellen migrieren und sich zum BALT formieren. Möglicherweise spielen die DC bei der Formierung der Zellen eine wichtige Rolle. Anzunehmen ist, dass Lymphozyten, DC und Endothelzellen verschiedenste Adhäsionsmoleküle exprimierten, die für die Migration und Verteilung von großer Bedeutung sind (77). Die Ergebnisse über die Induktion von BALT bilden die Grundlage für weitere Versuche. Durch andere Zeit- und Dosisschemata soll versucht werden, die Induktion von BALT noch zu steigern. Die Rolle dieser für die Antigenaufnahme wichtigen Strukturen der Lunge soll dann in Vakzinierungsstudien untersucht werden.

4.4 Nach der Behandlung mit 2S-MALP-2 kann eine Zellakkumulation in der Lunge von jungen Ratten beobachtet werden

Die Untersuchungen in der Rattenlunge von jungen und adulten Tieren haben ergeben, dass sich im Laufe der postnatalen Lungenentwicklung die Verteilung der Immunzellen verändert. Die Zellzahl in der BAL nimmt mit zunehmenden Alter zu, im Lungeninterstitium nimmt die Zellzahl ab. Zur direkten Vergleichbarkeit der Zellzahlen wurden diese aufgrund der unterschiedlichen Lungengewichte verdoppelt (Abb. 3.22). Die Gesamtzellzahlen der jungen Ratten waren nicht nur nach der Verdoppelung signifikant höher sondern auch beim direkten Vergleich mit den adulten Tieren. Dies bestätigt den deutlichen Unterschied zwischen beiden Versuchstiergruppen. Möglicherweise sind diese Immunzellen, die bei der Präparation aus dem Zellverband isoliert werden fester verankert. Die stärkere Ausprägung des interstitiellen Gewebes und die dickeren Alveolarsepten deuten darauf hin, dass die Zellen für das anstehende Lungenwachstum bereits angelegt sind. Vergleichbare Ergebnisse aus der Literatur sind nicht bekannt.

Nach der Stimulation des Immunsystems mit 2S-MALP-2 kann in der BAL in allen untersuchten Zellpopulationen eine Zellzahlerhöhung beobachtet werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den adulten Tieren, wobei die Zellzahlen insgesamt auf einem geringeren Niveau waren. Beim Lungeninterstitium konnte dagegen tendenziell ein umgekehrter Effekt beobachtet werden. Dies zeigt, dass eine Leukozytenakkumulation, verursacht durch 2S-MALP-2 bei den jungen Ratten, anders verläuft als bei den adulten Tieren. Die Aktivierung verläuft wahrscheinlich ebenfalls über die TLR, möglicherweise ist die Chemokinausschüttung eine andere, wodurch ein anderes Mikromilieu erzeugt wird, welches zu einer veränderten Einwanderung von Immunzellen führt. Auch hier wurde keine vergleichbare Literatur gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass aus Versuchen an adulten Versuchstieren nicht auf die Situation des sich entwickelnden Immunsystems der Lunge geschlossen werden darf. Die eindeutigen Hinweise auf prägende Faktoren bei der Asthmaentstehung in der

frühen Kindheit zeigen die Relevanz des Studiums des sich entwickelnden Lungenimmunsystems.

4.5 Die Bildung von Mikrometastasen kann durch 2S-MALP-2 reduziert werden

Die mit 2S-MALP-2 behandelten Ratten nahmen gegenüber den Kontrollratten im Laufe der 3 Wochen mehr an Gewicht zu. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das allgemeine Befinden der Ratten nach 2S-MALP-2 besser ist. Eine Tumorerkrankung ist häufig eine konsumierende Erkrankung, bei der der Organismus häufig weniger an Gewicht zunehmen kann oder sogar an Gewicht verliert. Nach gleichzeitiger Applikation von MADB 106 Tumorzellen und 2S-MALP-2 verringerte sich die Zahl der Mikrometastasen um 33%. Die These kann demnach bekräftigt werden, dass das gezielte Vorbereiten des Immunsystems durch 2S-MALP-2 einen Einfluss auf die Reduktion der Mikrometastasenbildung in der Lunge hat. Untersuchungen in der Ratte zeigten, dass die Injektion von MADB 106 Zellen zu einer schnellen Zellakkumulation im Lungengewebe führte (40% mehr Granulozyten nach 5 min; 60% mehr NK- und T-Zellen nach 15 min und 100% mehr Monozyten nach 30 min) (79). 2S-MALP-2 führt wie gezeigt ebenfalls zu einer Zellzahlerhöhung. Die Kinetik zeigt, dass die Zellzahl der Granulozyten und der Lymphozytenpopulation 6 h nach Behandlung signifikant erhöht war (siehe Abb. 3.23). Es scheint also, dass die Mechanismen, die durch die Injektion der MADB 106 Zellen einerseits und durch das 2S-MALP-2 andererseits ineinander greifen und dadurch die Zahl der Mikrometastasen im Lungengewebe verringert werden konnte. Wahrscheinlich spielen die Chemokine, die durch die Interaktionen der verschiedenen Rezeptoren ausgeschüttet werden, eine große Rolle bei der Bekämpfung der MADB 106 Zellen. In nachfolgenden Versuchen könnte geklärt werden, ob die Wirkung des 2S-MALP-2 auf die Mikrometastasenbildung durch die Applikation zu einem anderen Zeitpunkt noch verstärkt wird. Möglicherweise würde es zu

einer weiteren Reduktion der Metastasen kommen, wenn das Immunsystem vor der Applikation der MADB 106 Zellen mit 2S-MALP-2 gezielt aktiviert würde.

4.6 2S-MALP-2 im Vergleich zu bekannten Lungenimmunstimulanzen

Das Lipopeptid 2S-MALP-2 löst in der Lunge von Ratten eine starke Leukozytenakkumulation aus. Diese Reaktion konnte in der vorliegenden Arbeit in einigen Teilbereichen charakterisiert werden. Zusätzlich dazu konnten die für die Initiation und Regulation dieser Immunantwort verantwortlichen Mechanismen gefunden werden. In den letzten Jahren wurden verschiedene Stimulanzen verwendet, um Immunreaktionen hervorzurufen und an Hand derer Regulationsvorgänge des Immunsystems zu studieren. Eine dieser Substanzen ist das Lipopolysaccharid (LPS) Endotoxin Gram-negativer Bakterien. Die Aktivierung durch LPS wird über den TLR 4 vermittelt. LPS ist ein extrem potentes Toxin, das Makrophagen bei einer Konzentration von weniger als 1 pg/ml (50) aktivieren kann. 2S-MALP-2 zeigte sich bei Dosen im pg-Bereich ähnlich potent wie LPS (20, 43). Ein anderes Lipopeptid, das P₃CSK₄ (N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinyl-seryl-(lysyl)₃-lysine) war parenteral bzw. nasal appliziert ebenfalls ein effektiver Immunstimulator (3, 4). Ebenso wie das 2S-MALP-2 aktivierte es Zellen des unspezifischen Immunsystems und gilt als ein Adjuvans und Immunstimulanz bei nasaler Immunisierung (7). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die alleinige i.t. Applikation von Chemokinen wie RANTES und IL16 nicht zu einer Akkumulation von Immunzellen führt (55).

4.7 Die Immunstimulanz 2S-MALP-2: Der Einsatz eines Lipopeptids ermöglicht die Untersuchung von Initiation und Regulation einer Leukozytenakkumulation in der Rattenlunge

2S-MALP-2 kann als potente Immunstimulanz bezeichnet werden, mit dessen Hilfe in einem Tiermodell grundlegende Fragen zu Immunzellen und Regulationsmechanismen in der Lunge bearbeitet werden können. Aus didaktischen Gründen wird das Immunsystem in zwei verschiedene Teilbereiche geteilt: die unspezifische und die spezifische Immunität. Letztlich handelt es sich aber um eine große Einheit, deren Einzelbereiche eng verknüpft sind und die sich übergreifend selbst regulieren. In den letzten Jahren wurde intensiv nach Verbindungspunkten zwischen den beiden Systemen gesucht. Dabei wird den Chemokinen bei der „Übersetzung“ von einem in das andere System eine verbindende Rolle zugeschrieben (54). Sie sorgen für ein Influx von Immunzellen und den „Abtransport“ der Antigene zum drainierenden Lymphknoten. Ebenso wichtig sind bei diesem Vorgang die DC (46). Als Werkzeug des unspezifischen Immunsystems stellen sie den Kontakt zu den spezifischen Immunzellen her. Diese werden aktiviert und wandern zum Ort der Antigenaufnahme, um dort als Effektorzellen gegen die Antigene zu agieren. Auch dieser Vorgang wird wiederum von Chemokinen reguliert (76).

Aber auch andere Substanzen können zur Verbindung von spezifischem und unspezifischem Immunsystem beitragen. Vom Surfactantsystem in der Lunge ist bekannt, dass es sowohl eine Wirkung auf Zellen des unspezifischen Immunsystems (z.B. AM), als auch Wirkungen auf spezifische Immunzellen (z.B. T-Lymphozyten) hat (35). Eine weitere Verbindung stellen die Defensine dar. Von humanen Neutrophilen, Makrophagen und Epithelzellen ist bekannt, dass sie beta-Defensine produzieren. Sie wirken chemotaktisch auf unreife DC und „memory“ T-Lymphozyten (96, 97). Im Rattenmodell gibt es darüber noch keine Ergebnisse.

Diese Daten zeigen, dass die Verbindung zwischen den verschiedenen Teilbereichen des Immunsystems durch das Zusammenwirken mehrerer

Faktoren hergestellt wird, die wiederum miteinander in Verbindung stehen. Unklar bleibt hierbei, ob die Reaktionen in den verschiedenen Lebensabschnitten gleich verlaufen. Die vorliegenden Daten verstärken die Auffassung, dass Immunreaktionen in den unterschiedlichen Lebensaltern und den damit verbundenen unterschiedlichen Entwicklungszuständen des Lungenimmunsystems sehr unterschiedlich verlaufen. Um diese Prozesse genauer zu verstehen, muss noch eine Vielzahl an Forschungsarbeit geleistet werden.

4.8 Ausblick

Als Immunstimulanz soll 2S-MALP-2 für die Untersuchung von grundlegenden Mechanismen, die zum Rekrutment von Immunzellen in die Lunge führen, und für deren Regulationsmechanismen eingesetzt werden. Dieses Grundverständnis wird benötigt, um bei Fehlregulationen des Immunsystems eingreifen zu können.

Weiterhin soll die Wirkung von 2S-MALP-2 als Adjuvans getestet werden. Möglicherweise kann ein Organismus, der zuvor gezielt stimuliert worden ist, mit einer verbesserten Immunantwort auf ein Antigen reagieren. Dies würde Vorteile bei verschiedenen Vakzinierungsstrategien bringen.

Möglicherweise könnte 2S-MALP-2 nach intensiven Studien in der Tumorbekämpfung eingesetzt werden. Es ist bekannt, dass es bei der operativen Entfernung von Karzinomen häufig zu einer Streuung von Tumorzellen kommt, die bevorzugt in der Lunge „hängen“ bleiben und dort metastasieren. Eine präoperative Gabe von 2S-MALP-2 könnte möglicherweise die Metastasierung der Tumorzellen vermindern oder sogar verhindern, indem aktivierte Immunzellen diese vernichten.

5 Literatur

1. **Abbas, A. K. and C. A. Janeway, Jr.** 2000. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* **100**:129-138.
2. **Babbitt, B. P., P. M. Allen, G. Matsueda, E. Haber, and E. R. Unanue.** 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* **317**:359-361.
3. **Baier, W., L. Heinevetter, M. Huber, K. H. Wiesmuller, G. Jung, and W. Bessler.** 1997. The lipopeptide P₃CSK₄ constitutes an adjuvant in parenteral and oral immunization. *Vacc.Res.* **6**:A127.
4. **Baier, W., N. Masihi, M. Huber, P. Hoffmann, and W. G. Bessler.** 2000. Lipopeptides as immunoadjuvants and immunostimulants in mucosal immunization. *Immunobiology* **201** :391-405.
5. **Ben-Eliyahu, S. and G. G. Page.** 1992. In vivo assessment of natural killer cell activity in rats. *PNEI* **5**:199-214.
6. **Berman, J. S., D. J. Beer, A. C. Theodore, H. Kornfeld, J. Bernardo, and D. M. Center.** 1990. Lymphocyte recruitment to the lung. *Am.Rev.Respir.Dis.* **142**:238-257.
7. **Bessler, W. G., W. Baier, E. U. vd, P. Hoffmann, L. Heinevetter, K. H. Wiesmuller, and G. Jung.** 1997. Bacterial lipopeptides constitute efficient novel immunogens and adjuvants in parenteral and oral immunization. *Behring Inst.Mitt.* 390-399.
8. **Bezdicek P and R. G. Crystal.** 1997. Pulmonary Macrophages, p. 859-875. *In* Crystal RG and West JB (eds.), *The lung*. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia.

-
9. **Bice, D. E., D. L. Harris, J. O. Hill, B. A. Muggenburg, and R. K. Wolff.** 1980. Immune responses after localized lung immunization in the dog. *Am.Rev.Respir.Dis.* **122** :755-760.
 10. **Bice, D. E., D. L. Harris, B. A. Muggenburg, and J. A. Bowen.** 1982. The evaluation of lung immunity in chimpanzees. *Am.Rev Respir.Dis.* **126**:358-359.
 11. **Bice, D. E., D. N. Weissman, and B. A. Muggenburg.** 1991. Long-term maintenance of localized antibody responses in the lung. *J.Immunol.* **74**:215-222.
 12. **Bienenstock, J., N. Johnston, and D. Y. Perey.** 1973. Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab.Invest.* **28**:686-692.
 13. **Bienenstock, J., N. Johnston, and D. Y. Perey.** 1973. Bronchial lymphoid tissue. II. Functional characteristics. *Lab.Invest.* **28**:693-698.
 14. **Bitterman, P. B., L. E. Saltzman, S. Adelberg, V. J. Ferrans, and R. G. Crystal.** 1984. Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. *J. Clin.Invest* **74**:460-469.
 15. **Bousquet, J., P. K. Jeffery, W. W. Busse, M. Johnson, and A. M. Vignola.** 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* **161**:1720-1745.
 16. **Brandtzaeg, P., I. N. Farstad, and G. Haraldsen.** 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol.Today* **20**:267-277.

-
17. **Chouchakova, N., J. Skokowa, U. Baumann, T. Tschernig, K. Philippens, B. Nieswandt, R. E. Schmidt, and J. E. Gessner.** 2001. Fc γ RIII-mediated production of TNF α induces immune complex-alveolitis independent of CXC chemokine generation. *J.Immunol.* **15**:5193-200.
 18. **Curtis, J. L., S. Kim, P. J. Scott, and V. A. Buechner-Maxwell.** 1995. Adhesion receptor phenotypes of murine lung CD4⁺ T cells during the pulmonary immune response to sheep erythrocytes. *Am J Respir.Cell Mol.Biol.* **12**:520-530.
 19. **D'Ambrosio, D., M. Mariani, P. Panina-Bordignon, and F. Sinigaglia.** 2001. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* **164**:1266-1275.
 20. **Deiters, U. and P. F. Mùhlradt .** 1999. Mycoplasmal lipopeptide MALP-2 induces the chemoattractant proteins macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), monocyte chemoattractant protein 1, and MIP-2 and promotes leukocyte infiltration in mice. *Infect.Immun.* **67**:3390-3398.
 21. **Delventhal, S., A. Hensel, K. Petzoldt, and R. Pabst.** 1992. Effects of microbial stimulation on the number, size and activity of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structures in the pig. *Int.J.Exp.Pathol.* **73**:351-357.
 22. **Djukanovic, R., W. R. Roche, J. W. Wilson, C. R. Beasley, O. P. Twentyman, R. H. Howarth, and S. T. Holgate.** 1990. Mucosal inflammation in asthma. *Am.Rev Respir.Dis.* **142**:434-457.

-
23. **El Kaissouni, J., M. C. Bene, S. Thionnois, P. Monin, M. Vidailhet, and G. C. Faure.** 1998. Maturation of B cells in the lamina propria of human gut and bronchi in the first months of human life. *Dev.Immunol.* **5**:153-159.
 24. **Fidler, I. J., D. M. Gersten, and I. R. Hart.** 1978. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv.Cancer Res.* **28**:149-250.
 25. **Fliegert, F. G., T. Tschernig, and R. Pabst.** 1996. Comparison of lymphocyte subsets, monocytes, and NK cells in three different lung compartments and peripheral blood in the rat. *Exp Lung Res* **22**:677-690.
 26. **Flo, T. H., O. Halaas, S. Torp, L. Ryan, E. Lien, B. Dybdahl, A. Sundan, and T. Espevik.** 2001. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J.Leukoc.Biol.* **69**:474-481.
 27. **Frerking, I., A. Gunther, W. Seeger, and U. Pison.** 2001. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med.* **27**:1699-1717.
 28. **Galanos, C., M. Gumenscheimer, P. Muhlradt, E. Jirillo, and M. Freudenberg.** 2000. MALP-2, a Mycoplasma lipopeptide with classical endotoxic properties: end of an era of LPS monopoly? *J. Endotoxin.Res.* **6**:471-476.
 29. **Gorelik, E., R. H. Wiltrout, K. Okumura, S. Habu, and R. B. Herberman.** 1982. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int.J Cancer* **30**:107-112.
 30. **Hajjar, A. M., D. S. O'Mahony, A. Ozinsky, D. M. Underhill, A. Aderem, S. J. Klebanoff, and C. B. Wilson.** 2001. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR 6 in response to phenol-soluble modulin. *J.Immunol.* **166**:15-19.

-
31. **Harbeck, R. J.** 1998. Immunophenotyping of bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Clin.Diagn.Lab Immunol* **5**:271-277.
 32. **Henderson, R. F., K. E. Driscoll, J. R. Harkema, R. C. Lindenschmidt, I. Y. Chang, K. R. Maples, and E. B. Barr.** 1995. A comparison of the inflammatory response of the lung to inhaled versus instilled particles in F344 rats. *Fundam.Appl.Toxicol.* **24**:183-197.
 33. **Herz, U., P. Lacy, H. Renz, and K. Erb.** 2000. The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. *Curr.Opin.Immunol.* **12**:632-640.
 34. **Hiller, A. S., T. Tschernig, W. J. Kleemann, and R. Pabst.** 1998. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and larynx-associated lymphoid tissue (LALT) are found at different frequencies in children, adolescents and adults. *Scand.J.Immunol.* **47**:159-162.
 35. **Hohlfeld, J. M., H. Fabel, H. Hamm.** 1997. The role of surfactant in obstructive airways disease. *Eur.Resp.J.* **10**:2198-203
 36. **Holt, P. G., S. Haining, D. J. Nelson, and J. D. Sedgwick.** 1994. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J. Immunol.* **153**:256-261.
 37. **Holt, P. G. and P. A. Stumbles .** 2000. Regulation of immunologic homeostasis in peripheral tissues by dendritic cells: the respiratory tract as a paradigm. *J.Allergy Clin.Immunol.* **105**:421-429.
 38. **Holt, P. G., L. A. Warner, and J. M. Papadimitriou.** 1982. Alveolar macrophages: functional heterogeneity within macrophage populations from rat lung. *Aust.J Exp Biol.Med.Sci* **60**:607-618.

-
39. **Howard, C. J. and G. Taylor.** 1985. Immune responses to mycoplasma infections of the respiratory tract. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **10**:3-32.
 40. **Jacobs, E.** 1997. Mycoplasma infections of the human respiratory tract. *Wien.Klin.Wochenschr.* **109**:574-577.
 41. **Janeway, C. A., Jr.** 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol.Today* **13**:11-16.
 42. **Julia, V., E. M. Hessel, L. Malherbe, N. Glaichenhaus, A. O'Garra, and R. L. Coffman.** 2002. A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity.* **16**:271-283.
 43. **Kaufmann, A., P. F. Mühlradt, D. Gemsa, and H. Sprenger.** 1999. Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by mycoplasma fermentans-derived lipoprotein MALP-2. *Infect.Immun.* **67**:6303-6308.
 44. **Kracke A., T. Tschernig, A. Hoffmann , N. Krug, F.G. Fliegert., and R. Pabst.** 1999. Anatomy of a pulmonary immune response: Kinetics in different leukocyte pools. *J. Exp. Anim Sci.* **40**:189-200.
 45. **Lambrecht, B. N., I. Carro-Muino, K. Vermaelen, and R. A. Pauwels.** 1999. Allergen-induced changes in bone-marrow progenitor and airway dendritic cells in sensitized rats. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **20**:1165-1174.
 46. **Lambrecht, B. N., J. B. Prins, and H. C. Hoogsteden.** 2001. Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur.Respir.J.* **18**:692-704.

-
47. **Lauweryns, J. and J. Baert.** 1976. Alveolar clearance and the role of the pulmonary lymphatics, p. 185-243. *In* J. F. Murray (ed.), Lung Disease State of the Art. American Lung Association, New York.
 48. **Lehmann, C., A. Wilkening, D. Leiber, A. Markus, N. Krug, R. Pabst, and T. Tschernig.** 2001. Lymphocytes in the bronchoalveolar space reenter the lung tissue by means of the alveolar epithelium, migrate to regional lymph nodes, and subsequently rejoin the systemic immune system. *Anat.Rec.* **264**:229-236.
 49. **Lehnert, B. E.** 1992. Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung. *Environ.Health Perspect.* **97**:17-46.
 50. **Lien, E. and R. R. Ingalls.** 2002. Toll-like receptors. *Crit.Care Med.* **30**:S1-S11.
 51. **Lindsey, J. R. and H. Cassell.** 1973. Experimental Mycoplasma pulmonis infection in pathogen-free mice. Models for studying mycoplasmosis of the respiratory tract. *Am.J.Pathol.* **72**:63-90.
 52. **Lipscomb, M. F., D. E. Bice, C. R. Lyons, M. R. Schuyler, and D. Wilkes.** 1995. The regulation of pulmonary immunity. *Adv Immunol* **59**:369-455.
 53. **Lorenz, E., M. Jones, C. Wohlford-Lenane, N. Meyer, K. L. Frees, N. C. Arbour, and D. A. Schwartz.** 2001. Genes other than TLR4 are involved in the response to inhaled LPS. *Am.J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol* **281**:L1106-L1114.
 54. **Luster, A. D.** 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Immunol.* **14**:129-135.

-
55. **Lührmann, A., U. Deiters, J. Skokowa, M. Hanke, J. E. Gessner, P. Muhlradt, R. Pabst, and T. Tschernig.** 2002. In vivo effects of a synthetic 2-kilodalton macrophage-activating lipopeptide of *Mycoplasma fermentans* after pulmonary application. Infect. Immun. im Druck.
56. **Marletta, M. A., P. S. Yoon, R. Iyengar, C. D. Leaf, and J. S. Wishnok.** 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry **27**:8706-8711.
57. **McWilliam, A. S., D. Nelson, J. A. Thomas, and P. G. Holt.** 1994. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. J.Exp.Med. **179**:1331-1336.
58. **Mühlradt, P. F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth, and G. Jung.** 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. J.Exp.Med. **185**:1951-1958.
59. **Murphy, M. A. and H. B. Herscovitz.** 1984. Heterogeneity among alveolar macrophages in humoral and cell-mediated immune responses: separation of functional subpopulations by density gradient centrifugation on Percoll. J.Leukoc.Biol. **35**:39-54.
60. **Nelson, D. J., C. McMenamin, A. S. McWilliam, M. Brenan, and P. G. Holt.** 1994. Development of the airway intraepithelial dendritic cell network in the rat from class II major histocompatibility (Ia)-negative precursors: differential regulation of Ia expression at different levels of the respiratory tract. J Exp Med. **179**:203-212.
61. **O'Connor, C. M. and M. X. FitzGerald.** 1992. Speculations on sarcoidosis. Respir.Med. **86**:277-282.

-
62. **Oberdorster, G., C. Cox, and R. Gelein.** 1997. Intratracheal instillation versus intratracheal-inhalation of tracer particles for measuring lung clearance function. *Exp.Lung Res.* **23**:17-34.
 63. **Otsuki, Y., Y. Ito, and S. Magari.** 1989. Lymphocyte subpopulations in high endothelial venules and lymphatic capillaries of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the rat. *Am.J Anat.* **184**:139-146.
 64. **oud Alblas, A. B. and R. van Furth.** 1979. Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J.Exp.Med.* **149**:1504-1518.
 65. **Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem.** 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:13766-13771.
 66. **Pabst, R.** 1997. Localisation and Dynamics of Lymphoid Cells in the Different Compartments of the Lung, p. 59-75. *In* R. A. Stockley (ed.), *Pulmonary Defences.* Wiley, Chichester.
 67. **Pabst, R. and I. Gehrke.** 1990. Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **3**:131-135.
 68. **Pabst, R. and T. Tschernig.** 1995. Lymphocytes in the lung: an often neglected cell. Numbers, characterization and compartmentalization. *Anat.Embryol.* **192**:293-299.
 69. **Pabst, R. and T. Tschernig.** 1997. Lymphocyte dynamics: caution in interpreting BAL numbers. *Thorax* **52**:1078-1080.

-
70. **Pabst, R., J. Westermann, and R. M. Binns.** 1998. Lymphocyte Trafficking, p. 1616-1620. *In* P. J. Delves and I. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*. Academic Press, London.
71. **Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. V. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler.** 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**:2085-2088.
72. **Richeldi L, Franchi A, Rovatti E, Cossarizza A, duBois RM, and Saltini C.** 1997. Lymphocytes, p. 803-820. *In* Crystal RG and West JB (eds.), *The lung*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
73. **Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, and E. von Mutius.** 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* **358**:1129-1133.
74. **Rollins, B. J.** 1997. Chemokines. *Blood* **90**:909-928.
75. **Ruschmeyer, D., H. Thude, and P. F. Muhlradt.** 1993. MDHM, a macrophage-activating product of *Mycoplasma fermentans*, stimulates murine macrophages to synthesize nitric oxide and become tumoricidal. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **7**:223-229.
76. **Sallusto, F., A. Lanzavecchia, and C. R. Mackay.** 1998. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* **19**:568-574.
77. **Sato, J., K. Chida, T. Suda, A. Sato, and H. Nakamura.** 2000. Migratory patterns of thoracic duct lymphocytes into bronchus-associated lymphoid tissue of immunized rats. *Lung* **178**:295-308.

-
78. **Shellito, J. and H. B. Kaltreider.** 1985. Heterogeneity of immunologic function among subfractions of normal rat alveolar macrophages. II. Activation as a determinant of functional activity. *Am.Rev.Respir.Dis.* **131**:678-683.
79. **Shingu, K., A. Helfritz, S. Kuhlmann, M. Zielinska-Skowronek, R. Jacobs, Schmidt RE, R. Pabst, and S. von Hörsten.** Kinetics of the early recruitment of leukocyte subsets at the sites of tumor cells in the lungs: Natural killer (NK) cells rapidly attract monocytes but not lymphocytes in the surveillance of micrometastasis. *Int.J.Cancer* **99**:74-81
80. **Sminia, T., G. J. Brugge-Gamelkoorn, and S. H. Jeurissen.** 1989. Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit.Rev.Immunol* **9**:119-150.
81. **Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11**:443-451.
82. **Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P. F. Mühradt, and S. Akira.** 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J.Immunol.* **164**:554-557.
83. **Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Mühradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira.** 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* **13**:933-940.

-
84. **Taub, D.** 1998. Chemokines, p. 529-533. *In* P. J. Delves and I. Roitt (eds.), Encyclopedia of Immunology. Harcourt Brace and Company Publisher, Academic Press, San Diego.
 85. **Toyoshima, M., K. Chida, and A. Sato.** 2000. Antigen uptake and subsequent cell kinetics in bronchus-associated lymphoid tissue. *Respirology*. **5**:141-145.
 86. **Tschernig, T. and R. Pabst.** 2000. Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT) Is Not Present in the Normal Adult Lung but in Different Diseases. *Pathobiology* **68**:1-8.
 87. **Tuffrey, M. A., P. M. Furr, P. Falder, and D. Taylor-Robinson.** 1984. The anti-chlamydial effect of experimental *Mycoplasma pulmonis* infection in the murine genital tract. *J.Med.Microbiol.* **17**:357-362.
 88. **Ulich, T. R., L. R. Watson, S. M. Yin, K. Z. Guo, P. Wang, H. Thang, and J. del Castillo.** 1991. 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.
 89. **Underhill, D. M. and A. Ozinsky.** 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr.Opin.Immunol.* **14**:103-110.
 90. **Vasselon, T. and P. A. Detmers .** 2002. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect.Immun.* **70**:1033-1041.

-
91. **von Hörsten, S., A. Helfritz, S. Kuhlmann, H. Nave, T. Tschernig, R. Pabst, S. Ben Eliyahu, D. Meyer, R. E. Schmidt, and C. Schmitz.** 2000. Stereological quantification of carboxyfluorescein-labeled rat lung metastasis: a new method for the assessment of natural killer cell activity and tumor adhesion in vivo and in situ [In Process Citation]. *J.Immunol.Methods* **239**:25-34.
 92. **von Mutius, E.** 2001. Paediatric origins of adult lung disease. *Thorax* **56**:153-157.
 93. **Vu, Q., K. M. McCarthy, J. M. McCormack, and E. E. Schneeberger.** 2002. Lung dendritic cells are primed by inhaled particulate antigens, and retain MHC class II/antigenic peptide complexes in hilar lymph nodes for a prolonged period of time. *J.Immunol.* **105**:488-498.
 94. **Weibel, E. R.** 1997. Design of airways and blood vessels considered as branching trees, p. 1061-1067. *In* Crystal RG and West JB (eds.), *The Lung*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
 95. **Xie, Q. W., H. J. Cho, J. Calaycay, R. A. Mumford, K. M. Swiderek, T. D. Lee, A. Ding, T. Troso, and C. Nathan .** 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**:225-228.
 96. **Yang, D., Q. Chen, O. Chertov, and J. J. Oppenheim.** 2000. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* **68**:9-14.
 97. **Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim.** 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**:525-528.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APAAP-Komplex	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex
APC	antigenpräsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALT	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	<i>balanced salt solution</i>
bzw.	beziehungsweise
CD	Differenzierungskluster
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N'-tetraazetat
ELISA	Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	fluorescence absorbend cellsorter, Durchflusszytometer
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (Gravitationskonstante)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H&E Färbung	Hämalaun/Eosin Färbung
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
kDa	Kilo-Dalton
Ko	Kontrolle
M	Mol
mAbs	monoklonaler Antikörper
MALP-2	macrophage-activating lipopeptide of molecular mass 2 kDa
µg/µl	Mikrogramm/Mikroliter
mg/ml	Milligramm/Milliliter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
p	prozentuale Angabe des Signifikanzniveaus

PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PEC	<i>peritoneal exudate cells</i>
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PMN	<i>polymorphonuclear granulocytes</i>
RT	Raumtemperatur
SF	Standardfehler
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SPF	spezifisch pathogenfrei
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
T _{H1}	T-Helfer 1
T _{H2}	T-Helfer 2
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3 propanediol
TTBS	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Name, Vorname Lührmann, Anke
geboren am 9. Januar 1966 in Melle

Schulbildung:

1972-1976 Grönenbergschule Melle, Grundschule
1976-1982 Ratsschule Melle, Realschule
 Abschluss: Erweiterter Sekundarabschluss I
1983-1984 Hauswirtschaftliche Berufsfachschule, Berufsschule
 Melle

Berufliche Tätigkeit:

1983-1984 Krankenpflegevorschule an den Städt. Kliniken
 Osnabrück
1984-1987 Krankenpflegeausbildung an den Städt. Kliniken
 Osnabrück
 Abschluss: Staatlich anerkannte Krankenschwester
1987-1990 Krankenschwester im Operationsbereich der Städt.
 Kliniken Osnabrück, Medizinische Hochschule
 Hannover und Friederikenstift Hannover
1991-1999 Krankenschwester im Nachtdienst, Friederikenstift
 Hannover

Schulische Weiterbildung:

1991-1994 Kollegiatin am Hannover Kolleg, Hannover
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

- 1994-1999 Studierende des Studienganges Diplombiologie,
Universität Hannover
Abschluss: Diplom Biologin
- 11.11.1998- 10.07.1999 Diplomarbeit im Transplantationslabor der Klinik
für Viszeral- und Transplantationschirurgie
bei Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. M.W. Hoffmann
Thema:
Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem
humanen CD95 Liganden und dem Immunsystem
der Maus
- seit Oktober 1999 Doktorandin in der Abt. Funktionelle und
Angewandte Anatomie
bei Herrn Prof. Dr. med. R. Pabst
Normalverfahren der DFG Pa240/8-1

Publikationen

Aus Prioritätsgründen wurden Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

A. Lührmann, U. Deiters, J. Skokowa, M. Hanke, J. E. Gessner, P. F. Mühlradt, R. Pabst, T. Tschernig. In vivo effects of a synthetic 2-Kilodalton Macrophage-Activating Lipopeptide of *Mycoplasma fermentans* after pulmonary application.: *Infection and Immunity* 2002, 70:3785-3792.

K. Shingu, C. Kruschinski, A. Lührmann, T. Tschernig, S. von Hörsten, P. F. Mühlradt, R. Pabst. Prevention of lung metastasis by topical administration of the synthetic bacterial lipopeptid 2S-MALP-2. Eingereicht.

Weitere Publikationen:

A. Lührmann, R. V. Haberberger, C. Mörike, G. Steinhoff, N. Krug, R. Pabst, T. Tschernig. Das Rekrutment immunkompetenter Zellen in einer transplantierten Lunge ist trotz inkompletter Reinnervierung nicht behindert. *Pneumologie* 2000, 54: 564-568

A. Munder, T. Tschernig, M. Dorsch, A. Lührmann, R. Pabst, M. van Griensven, S. Krusch, S. Weiß, B. Tümmler, H. J. Hedrich. Pulmonary microbial infection in mice: Comparism of different application methods and correlation of bacterial numbers and histopathology, *Experimental and Toxicologic Pathology*, im Druck.

Tagungsbeiträge

A. Lührmann, R. Pabst, T. Tschernig. Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT) – Induktion durch ein bakterielles Lipopeptid. 42. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, Jena 21.-24. März 2001. *Pneumologie*, März 2001, Sonderheft 1, P181.

A. Lührmann, T. Tschernig, R. Pabst. The pulmonary immune response after single 2S-MALP-2 Instillation resembles an antigen challenge in immunized rats. 97 th International Conference American Thoracic Society, 18.-23. Mai 2001, San Francisco, USA. *Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, April 2001, Vol. 163, A988.

T. Tschernig, A. Lührmann, N. Krug, B. N. Lambrecht, R. Pabst. Recruitment of dendritic cells into the bronchoalveolar space: Effect of MALP-2. 97 th International Conference American Thoracic Society, 18.-23. Mai 2001, San Francisco, USA. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2001, Vol. 163, A549.

A. Lührmann, T. Tschernig, R. Pabst. Immunzellen in Lungenkompartimenten: Vergleich von frisch abgesetzten Ratten mit adulten Tieren. Arbeitstagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 23./24. November 2001, Großhansdorf.

A. Lührmann, T. Tschernig, R. Pabst. Ein synthetisches, bakterielles Lipopeptid löst eine starke Immunreaktion in der Lunge aus. 43. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 13.-16. März 2002, Bochum, *Pneumologie*, März 2002, Sonderheft 1, P177.

A. Lührmann, S. von Hörsten, K. Shingu, R. Pabst, T. Tschernig. Toll-like Rezeptor (TLR)- mediated leukocyte attraction to the lung: Enhanced killing of injected tumor cells and reduced development of metastases. 97. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, 22-25. März 2002, Halle. *Annals of Anatomy*, S 184, 104.

A. Lührmann, T. Tschernig, R. Pabst. Recruitment of lymphocytes and APC's to lung compartments: Local effects of the human growth factor Flt3-L. 98 th International Conference American Thoracic Society, 17.-22. Mai 2002, Atlanta, USA. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2002, Vol. 165, A816.

R. Pabst, A. Lührmann, T. Tschernig. Age dependence of the influx of leukocytes into different lung compartments after local stimulation Society of Mucosal Immunology, Orlando, USA, Juni 2002.

weitere Tagungsbeiträge:

M. Hanke, T. Tschernig, A. Lührmann, M. Schuster, N. Krug, R. Pabst. Kinetik der Einwanderung von Lymphozyten in den bronchoalveolären Raum (BAR) nach Allergen challenge im BN-Asthma-Modell. Arbeitstagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 17./18. November 2000, Berlin.

A. Munder, T. Tschernig, A. Lührmann, M. van Griensven, R. Pabst, S. Krusch, S. Weiß, B. Tümmler, M. Dorsch, H. J. Hedrich. Modell der Listerieninfektion der Lunge in der Maus: Verteilung der Keime nach intratrachealer Applikation. Arbeitstagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 23./24. November 2001, Großhansdorf.

Thomas, Dir ganz besonderen Dank für deine Hilfe, für deine aufmunternden Worte, für deine Geduld, auch die dümmste Frage zum fünften Mal zu beantworten und für die nette Stimmung in den letzten 2½ Jahren.

Danke für die Chance, den SFB hautnah miterleben zu können

Danke Karin, dass du immer unser Fels in der Brandung bist. Marion, herzlichen Dank für deine Mühe, besonders in meiner Anfangszeit. Britta, danke für deine Geduld: nach SFB und DR-Arbeit schreiben, kamst Du immer erst an 2. Stelle

Herrn Prof. Pabst danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die gute Betreuung

Herrn Prof. Müller danke ich für die Hilfe beim „offiziellen Teil“ der Arbeit

Sheila, danke für die Hilfe bei allen „engl. Problemen“ und für die nette Zusammenarbeit

Ulla, an dich ein besonderes Dankeschön für all deine Mühe nicht nur beim MALP u. MCP Nachweis

Ganz herzlichen Dank an Herrn Prof. Mühlradt für das MALP, für gute Tipps und für die Hilfe beim Schreiben des Manuskripts

Julia und Herrn Dr. Gessner danke ich herzlich für die Hilfe beim Chemotaxistest

Karsten danke ich für die Hilfe bei den molekul. Methoden

Andreas, danke, dass du mich in allem so unterstützt, meine Launen ausgehalten und mich immer aufgemuntert hast

Ein herzliches Dankeschön an Ulrike, Frauke u. Fr. Dressendorfer, Antje, Marita, Martijn, Martina und an alle anderen aus der Anatomie, aus dem Tierhaus, aus der Photoabteilung und an alle, die nett zu mir waren

Rolf, danke fürs Lesen

Kioshi u. Stephan danke ich für die Zusammenarbeit: MALP im Tumormodell

Ankes
Doktorarbeit

M
A
L
P

