

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Kinderchirurgie

Chirurgische Klinik I

Direktor: Prof. Dr. med. C.-T. Germer

**Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von
Alveolarmakrophagen der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Christina Mertens
aus Köln

Würzburg, Mai 2011

*Für meine
Familie*

Referent: Prof. Dr. rer. nat. C. Otto

Korreferent: Prof. Dr. med. C.-T. Germer

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2011

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Makrophagenpopulationen der Lunge	1
1.2	Die Abwehrfunktion von Alveolarmakrophagen	1
1.3	Alveolarmakrophagen und pathologische Prozesse	2
1.4	Mechanismen der Makrophagenaktivierung	3
1.5	Zielsetzung	5
2	Fragen	7
3	Material und Methoden	8
3.1	Kulturmedien und Pufferlösungen.....	8
3.2	Versuchstiere	9
3.3	Zellisolierungsprotokolle	9
3.4	Immunhistochemie.....	10
3.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	12
3.6	Durchflusszytometrie	12
3.7	NO-Assay	14
3.8	Bestimmung der Teilungsfähigkeit aktivierter Makrophagen.....	15
3.9	Bestimmung immunaktivierender Eigenschaften aktivierter Makrophagen.....	15
3.10	Nachweis von iNOS im Immunoblot	15
3.11	RNA-Extraktion und RT-PCR.....	16
3.12	Auswertung und Statistik	17
4	Ergebnisse	18
4.1	Isolierung von Alveolarmakrophagen.....	18
4.2	Immunhistochemische Charakterisierung.....	21
4.3	Durchflusszytometrische Charakterisierung.....	24
4.4	Alveolarmakrophagen als antigenpräsentierende Zellen	30
4.5	Auswirkungen der LPS-Aktivierung	32
4.6	Aktivierte Makrophagen sezernieren Stickstoffmonoxid	33
5	Beantwortung der Fragen	37
6	Diskussion	38
7	Ausblick	45
8	Zusammenfassung	46
9	Literaturverzeichnis	47
10	Appendix	50
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungen

AM: Alveolarmakrophagen

APZ: Antigenpräsentierende Zelle

bp: Basenpaare

cpm: Counts per minute

FACS: Fluorescence activated cell sorter (Durchflusszytometer)

FCS: Fetal calf serum

FITC: Fluoreszenzisothiocyanat; Farbstoff mit einem Emissionsmaximum bei 530 nm

FSC: Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

HLA: Human leucocyte antigen oder Humanes Leukozytenantigen (auch MHC)

IFN- γ : Interferon γ

IL: Interleukin

IM: Pulmonale interstitielle Makrophagen

iNOS: Induzierbare NO-Synthase

Lew: Lewis-Ratten

L-NMMA: NG-Methyl-L-Argininazetat

LPS: Lipopolysaccharid

MHC: Major histocompatibility complex (auch HLA)

MLR/MLC: Mixed leukocyte reaction/culture (gemischte Leukozytenkultur/-reaktion)

NO: Stickstoffmonoxid

PBS: Phosphate buffered saline

PE: Phycoerythrin; Farbstoff mit einem Emissionsmaximum bei 585 nm

PIM: Pulmonale intravaskuläre Makrophagen

PM: Peritonealmakrophagen

PMA: Phorbol Myristate Acetate

SSC: Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)

TBS: Tris buffered saline

TNF- α : Tumornekrosefaktor α

WF: Wistar-Furth-Ratten

1 Einleitung

1.1 Makrophagenpopulationen der Lunge

Die Makrophagen der Lunge stellen eine heterogene Zellpopulation dar; ihre wesentliche Aufgabe als Teil der angeborenen Immunabwehr ist dabei die Verhinderung von Infektionen. **Alveolarmakrophagen** (AM) sind eine der dominierenden Populationen in der Lunge – so macht z.B. ihr Anteil in der Rattenlunge ca. 60 Prozent der Gesamtpopulation aus. Alveolarmakrophagen befinden sich im Alveolarraum im so genannten „Surfactant“, einem Gemisch aus Phospholipiden und Proteinen (Lohmann-Matthes ML et al., 1994). Die Phospholipide setzen die Oberflächenspannung der Alveolen herab, um sie offen zu halten und so die Atmung zu ermöglichen.

Nicht immer stellen Alveolarmakrophagen die Hauptpopulation in der Lunge dar. So ist z.B. in der Schaf- und Ratte-Lunge der Anteil an **pulmonalen intravaskulären Makrophagen** (PIM) ca. dreimal so hoch wie der von Alveolarmakrophagen (Lehnert BE, 1992). **Pulmonale interstitielle Makrophagen** (IM) sind die zweitgrößte Makrophagenpopulation der Lunge; sie machen ca. 40 Prozent der Gesamtpopulation aus (Lehnert BE, 1992). Im Schleim der Atemwege (Trachea, Hauptbronchus) befinden sich **intraluminal Makrophagen**, die im Vergleich zu den Alveolarmakrophagen weniger phagozytisch aktiv sind (Lehnert BE, 1992). Im Atemwegsepithel finden sich Makrophagen, die den epidermalen Langerhans-Zellen ähneln. Weiterhin gibt es Makrophagen im bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebe, in tracheobronchialen Lymphknoten und in der Pleuralflüssigkeit. Diese Makrophagenpopulationen sind alle an der Immunabwehr der Lunge beteiligt.

1.2 Die Abwehrfunktion von Alveolarmakrophagen

Die Lunge steht direkt über den Bronchialbaum mit der Umwelt in Kontakt. Dies ist essentiell für die Atmung, birgt aber auch Gefahren, da Erreger und Staubpartikel über die Atemluft in die Lunge gelangen können. Zum Teil werden

sie über die mukoziliäre Clearance und andere Mechanismen wieder aus der Lunge entfernt. Sollten infektiöse Agenzien und Staubpartikel aber bis in die Alveolen vorgedrungen sein, dann sind diese Clearancemechanismen wirkungslos. Die an dieser Stelle befindlichen Alveolarmakrophagen können aber aufgrund ihrer Abwehr- und Reinigungsfunktion solche inhalierten Partikel phagozytieren (Prokhorova S et al., 1994). Zusätzlich schütten sie proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β aus, um Neutrophile Granulozyten zu rekrutieren, die sie bei der Abwehr unterstützen (Bakker JM et al., 1998).

Alveolarmakrophagen bilden den ersten Wall zur Abwehr von Mikroorganismen im Respirationstrakt und wirken dabei zytostatisch bzw. zytotoxisch (Chitko-McKown CG et al., 1991). Ruhende Alveolarmakrophagen werden durch IFN- γ oder LPS (Abschnitt 1.4) aktiviert und ändern dabei ihre Eigenschaften. So schütten sie eine große Anzahl verschiedener Mediatoren aus (Abb. 1.1), wovon viele antimikrobiell wirken wie TNF- α und Stickstoffmonoxid (NO) oder zelltoxisch, wie verschiedene radikale Sauerstoffspezies; hierzu gehören Superoxidanionen, Hydroxylionen und Wasserstoffperoxid (Sherman MP, Lehrer RI, 1984; Nathan CF, Hibbs JB, 1991). Makrophagen nutzen diese Substanzen aber nicht nur zur Infektabwehr, sondern auch zur Kontrolle des Immunsystems. So hemmt NO die Proliferation aktivierter T-Lymphozyten (Rutherford MS et al., 1993; Van der Veen RC et al., 2000). Alveolarmakrophagen sind zudem in der Lage, große Mengen an Lysozym zur Abwehr von Bakterien auszuschütten, und sie sezernieren zahlreiche unterschiedliche immunsuppressive Zytokine (Gordon S, 2003).

1.3 Alveolarmakrophagen und pathologische Prozesse

Alveolarmakrophagen sind, da sie auf der Oberfläche der Alveolen vorkommen und mit der Umwelt in Kontakt kommen, zwar äußerst effektiv in der Immunabwehr (s. oben), sie können aber auch an akuten und chronischen Entzündungen der Lunge beteiligt sein (Ren D et al., 2006). Als Beispiel sei die chronisch entzündliche Lungenfibrose genannt. Hierbei kommt es zur Vernarbung

und Versteifung der Lunge, was den Gasaustausch behindert und der Körper wird unzureichend mit Sauerstoff versorgt. Eine Lungenfibrose kann verschiedene Ursachen haben wie eine rheumatische Grunderkrankung, Inhalation von Stäuben (Kohle, Silikon u.a.) oder die Einnahme von Medikamenten (z.B. Amiodaron oder Immunsuppressiva). Bei einigen Formen ist die Ursache bisher noch unbekannt; sie werden zusammenfassend als idiopathische Lungenfibrosen bezeichnet. Ein Entzündungsreiz aktiviert Alveolarmakrophagen, die darauf hin verschiedene zelltoxische Mediatoren ausschütten, die auch an der Infektabwehr beteiligt sind (s. Abschnitt 1.2). Bei chronischen Entzündungen jedoch schädigen diese Mediatoren die Lunge, indem sie die Lungenfibroblasten zerstören (Lohmann-Matthes ML et al., 1994). Dieser Zusammenhang ist experimentell bestätigt: werden Lungenfibroblasten mit aktivierten Alveolarmakrophagen kultiviert, so verringert sich ihre Vitalität drastisch (Morgan DL, Shines CJ, 2004). Dass an dieser Zellzerstörung auch Stickstoffmonoxid beteiligt ist, wurde dadurch gezeigt, dass die Zugabe des NO-Inhibitors L-NMMA Lungenfibroblasten in einer Kokultur mit Alveolarmakrophagen schützte. Lungenfibroblasten wurden für diese Experimente gewählt, da sie ebenfalls in der Lunge vorkommen und zudem einfach zu isolieren sind. Sie sind an der Bildung der Interzellulärsubstanz beteiligt, die für den Aufbau der extrazellulären Matrix gebraucht wird. Alveolarmakrophagen sind ebenfalls an der Transplantatabstoßung beteiligt, auch wenn hier ihre Funktion noch nicht vollständig verstanden ist. Während der Abstoßung von Lungentransplantaten proliferieren sie sehr stark (Schmidt A et al., 2007).

1.4 Mechanismen der Makrophagenaktivierung

Im Jahr 1880 beschrieb Elie Metchnikoff das Prinzip der Phagozytose und führte den Begriff „Makrophage“ für diese Fresszellen ein. Zusätzlich zu dieser Funktion patrouillieren die Makrophagen im Körper und „schlagen Alarm, wenn der Feind in der Tür steht“ (Jan Klein). Aus diesem Grund reagieren Makrophagen auf eine Vielzahl von Stimuli, die sie aktivieren; bisher sind mehr als 50 Stimuli identifiziert. Der aktivierte Zustand unterscheidet sich dabei

deutlich vom metabolisch unauffälligen Ruhezustand einer nicht-aktivierten Makrophage. Dies spiegelt sich auch in ihrer Funktion wider. So können inflammatorische oder hyperaktivierte Makrophagen z.B. Tumorzellen abtöten (Rutherford MS et al., 1993; Mantovani A et al., 2002), was nicht-aktivierte (naive und „primed“) Makrophagen nicht erfüllen können (Abb. 1.1). Die Flexibilität von Makrophagen, auf zahlreiche Stimuli zu reagieren (Haskó G et al., 2006), macht es zuweilen schwierig, ihre Aktivierung *in vitro* von ungewollten Einflüssen zu untersuchen.

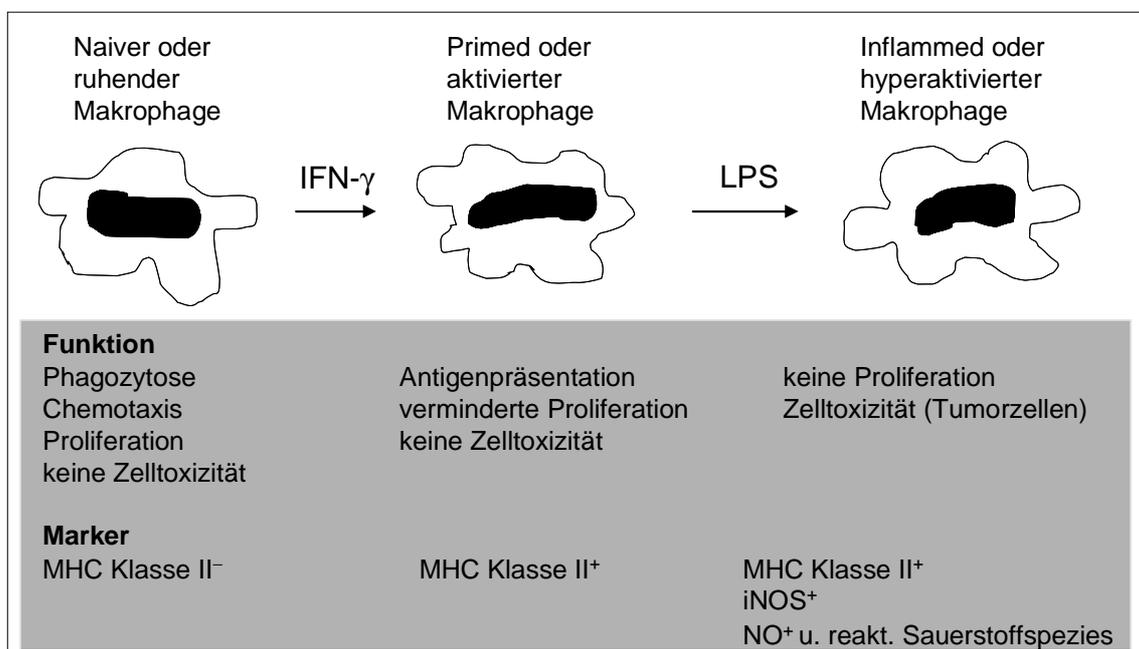


Abb. 1.1: Schematisierte Darstellung der Makrophagenaktivierung mit den beiden Mediatoren IFN- γ und LPS. Inflammatorische („inflammated“ oder hyperaktivierte) Makrophagen sind anhand ihrer NO-Produktion zu identifizieren. Hierzu ist es notwendig, dass sie das Enzym iNOS exprimieren. Verändert nach Klein J. Immunologie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1991 und Hamilton TA, Adams DO. *Immunol Today* 1987; 8: 151-158.

Bei der klassischen Makrophagenaktivierung werden zwei Signale benötigt (Gordon S, 2003; Gordon S, Taylor PR, 2005). Das erste Signal ist IFN- γ , das Makrophagen aktiviert (*priming*), während für die vollständige Aktivierung das in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien befindliche Lipopolysaccharid oder LPS das zweite Signal sein kann (Mosser DM, 2003; Hamilton TA, Adams DO, 1987; Adams DO, Hamilton TA, 1987). Diese inflamma-

torischen bzw. hyperaktivierten Makrophagen („*killer macrophages*“) stellen überaus wichtige Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr dar. Sie bilden unter anderem verschiedene Chemokine (TNF- α , IL-12, IL-1, IL-6), aber auch Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffspezies. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie MHC-Klasse-II-Moleküle und CD86, wodurch sie in der Lage sind, auch mit anderen Zellen der Immunabwehr zu interagieren. Mit Hilfe des Griess Reagenz ist der Nachweis von Stickstoffmonoxid und damit die Identifizierung inflammatorischer Makrophagen sehr einfach möglich. Dass in Abb. 1.1 dargestellte Schema der Makrophagenaktivierung ist in Abb. 1.2 exemplarisch an der murinen Makrophagen-Zelllinie J774.2 überprüft worden.

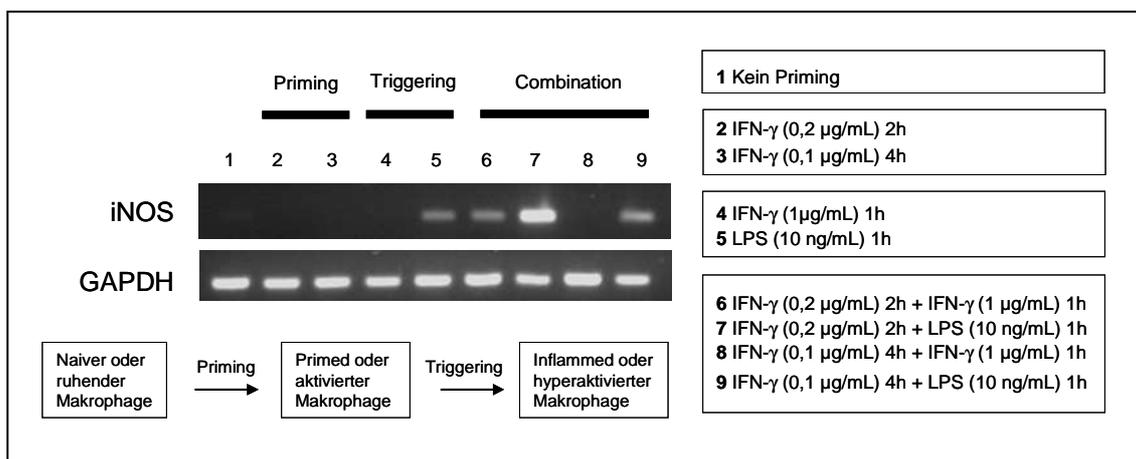


Abb. 1.2: Aktivierung muriner Makrophagen der Zelllinie J774.2. Gezeigt ist, dass nur die inflammatorischen Makrophagen („inflammierter“) in der Lage sind, das Enzym iNOS zu exprimieren. Dieses Enzym ist notwendig, um NO zu produzieren (Abb. 1.1). Um vollständig aktiviert zu werden, benötigen die Makrophagen „primer“- und „trigger“-Signale. Zu beachten ist, dass bereits 10 ng/mL LPS (L 6529, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in der Lage ist, die Expression von iNOS zu induzieren. Auch IFN- γ (AAL08, R&D Systems, Wiesbaden) ist ein wichtiger Faktor zur Aktivierung von Makrophagen, der von aktivierten T-Lymphozyten sezerniert wird. Dass Makrophagen in der Regel zwei Signale zur vollständigen Aktivierung benötigen, ist möglicherweise damit zu erklären, dass inflammatorische Makrophagen überaus effektive Effektorzellen sind, die – einmal aktiviert – hoch potente Killerzellen darstellen, die nicht mehr zu kontrollieren sind und auch körpereigene Zellen zerstören können. Nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe (S. Gahn).

1.5 Zielsetzung

Makrophagen sind überaus wichtige Effektorzellen des Immunsystems, deren Aktivierung genau zu kontrollieren ist (Matuschek A et al., 2009). Einmal aktiviert sind sie hoch potente Killerzellen, die sich nicht mehr kontrollieren lassen

und auch körpereigene Zellen zerstören können. Da die Bedingungen der *in vitro* Aktivierung auch vom Makrophagentyp abhängt, sollen Alveolarmakrophagen der Ratte hinsichtlich ihrer Aktivierung *in vitro* untersucht werden.

Alveolarmakrophagen spielen eine große Rolle bei der Immunabwehr im Respirationstrakt und lassen sich leicht durch eine bronchoalveoläre Lavage isolieren. Die so isolierte Population ist – im Gegensatz zu Peritonealmakrophagen – homogener. In der vorliegenden Arbeit wurden keine etablierten Makrophagenzelllinien verwendet, da bei ihnen strittig ist, inwieweit ihre Eigenschaften nach Aktivierung den Gegebenheiten *in vivo* entsprechen. Bei den Alveolarmakrophagen handelt es sich um frisch isolierte Zellen, weshalb die mit ihnen erzielten Daten auch repräsentativ sein sollten. Trotz dieser zahlreichen Vorteile gibt es nur wenige Untersuchungen zur Aktivierung und Funktion von Alveolarmakrophagen *in vitro*.

In einer vorangegangenen Inauguraldissertation aus der Gruppe wurde die Funktion von Makrophagen nach Transplantation untersucht (Ulbrich M, 2007). Die in der Arbeit präsentierten Daten deuten auf eine sehr eng abgestimmte Interaktion zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten hin. Zudem scheinen die Makrophagen durch den operativen Eingriff in aktivierte („primed“) Makrophagen überführt zu werden, die aber nicht in der Lage sind, das Transplantat zu zerstören (Matuschek A et al., 2009). Erst die Anwesenheit aktivierter T-Lymphozyten führt zu inflammatorischen Makrophagen; vermutlich über die Ausschüttung von IFN- γ durch aktivierte T-Lymphozyten. Um diese Aktivierung *in vitro* überprüfen zu können, sollten Alveolarmakrophagen der Ratte umfangreich charakterisiert werden. Hierzu wurden die Makrophagen unter anderem auf die Anwesenheit verschiedener Oberflächenmoleküle und die Ausschüttung von NO untersucht. Die Charakterisierung schließt auch Untersuchungen zur Aktivierung von Makrophagen mit LPS und IFN- γ ein.

2 Fragen

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Alveolarmakrophagen der Ratte als eine repräsentative Zellpopulation zur Untersuchung von Aktivierungsvorgängen, die im Rahmen der Transplantatabstoßung beobachtet wurden (Ulbrich M, 2007). Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Alveolarmakrophagen der Ratte wurden mit einer bronchoalveolären Lavage isoliert. Wie hoch war die Ausbeute pro Lunge?
2. Welche Oberflächenmarker wurden für die isolierten Alveolarmakrophagen nachgewiesen?
3. Wie änderten sich die Eigenschaften isolierter Alveolarmakrophagen nach Stimulierung mit INF- γ und LPS?

3 Material und Methoden

3.1 Kulturmedien und Pufferlösungen

Kulturmedium RPMI 1640

RPMI 1640 (Dutch modified; Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit folgenden Zusätzen wurde verwendet (Angaben als Endkonzentration): 10 Prozent hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS), 100 U/mL Penicillin G, 100 µg/mL Streptomycin, 2 mmol/L L-Glutamin, 50 µmol/L Mercaptoethanol, 1 mmol/L Natriumpyruvat und nicht-essentielle Aminosäuren (1 Prozent). Bis auf das FCS (Cell Concepts GmbH, Umkirch) wurden sämtliche Substanzen über Invitrogen GmbH, Karlsruhe bezogen.

PBS („Phosphate buffered saline“)

Als isotone Lösung (pH 7,2) wurde PBS (Invitrogen GmbH) zur Isolierung und zum „Waschen“¹⁾ von Zellen genutzt. Die Zusammensetzung war (Angaben als Endkonzentration): 140 mmol/L Natriumchlorid, 2,7 mmol/L Kaliumchlorid, 7,2 mmol/L Natriumdihydrogenphosphat und 1,47 mmol/L Kaliumhydrogenphosphat.

Lysepuffer

Zum Lysieren von Erythrozyten wurde 10-fach konzentrierter Lysepuffer 1:10 verdünnt und die Zellen hiermit für 2-3 Minuten inkubiert. Die Zusammensetzung war (Angaben als Endkonzentration): 1,68 mol/L Ammoniumchlorid (Merck, Darmstadt), 99,88 mmol/L Kaliumhydrogencarbonat (Merck) und 12,6 mmol/L EDTA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

Tris HCl-Puffer

Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, wurde in der Immunhistochemie zum „Waschen“²⁾ der Präparate verwendet. Der Puffer enthielt 138,6 mmol/L Natriumchlorid (Merck,

¹⁾ Der Begriff „Waschen“ beschreibt folgende Arbeitsschritte: Auffüllen der Zellsuspension mit PBS, Pelletieren der Zellen durch Zentrifugieren, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren der Zellen erneut mit PBS oder anderen Kulturmedien bzw. Pufferlösungen.

²⁾ Der Begriff „Waschen“ beschreibt in der Immunhistochemie die Inkubation der Präparate in Pufferlösungen, um Reste von Lösemittel bzw. nicht-gebundenen Antikörpern zu entfernen.

Darmstadt, Deutschland), 3,81 mmol/L Tris-HCl (Merck) und 2 g/L bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

3.2 Versuchstiere

Für die Experimente wurden 8-10 Wochen alte 200-350 g schwere männliche Ratten folgender Stämme verwendet: Lewis (RT1^l MHC-Haplotyp) und Wistar Furth (RT1^u MHC Hapotyp) von Harlan Winkelmann (www.harlaneurope.com).

3.3 Zellisolierungsprotokolle

3.3.1 Isolierung von Alveolarmakrophagen

Eine 14 G Kanüle (Braun, Meslungen) wurde in die Trachea der freigelegten Lungen toter Ratten eingeführt, mit einem 2-0-er Faden fixiert und die Alveolarmakrophagen mit kaltem PBS unter einer Sterilwerkbank ausgespült (bronchoalveoläre Lavage). An die Kanüle wurde eine 20 mL Spritze angesetzt und die Lungen 17-20-mal mit jeweils 6 mL PBS gefüllt. Zum Ablassen der Lavage wurde die Spritze jedes Mal nach Befüllen der Lungen entfernt und die Lavage über ein Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg) filtriert. Die Zellen wurden bei 397 g für sechs Minuten zentrifugiert (Sigma 4K10, Osterode), der Überstand abgesaugt und die Erythrozyten mit 5 mL Lysepuffer lysiert. Die Leukozyten wurden mit PBS gewaschen und anschließend die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit 0,04 Prozent (Endkonzentration) Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefärbt. Die Ausbeute betrug $3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$ Zellen pro Rattenlunge (n=29), wobei das Minimum bei $1,8 \times 10^6$ Zellen und das Maximum bei $6,0 \times 10^6$ Zellen lag. Die Reinheit der Zellen betrug ca. 90-95 Prozent. Dieser Wert wurde durch Vergleich der Zellmorphologie während des Auszählens bestimmt. Dies deckt sich mit Angaben aus der Literatur (Prokhorova S et al., 1994; Lehnert BE et al., 1986).

3.3.2 Isolierung von Peritonealmakrophagen

Peritonealmakrophagen wurden aus dem Bauchraum einer mit Isofluran (Abbott GmbH & CO. KG, Wiesbaden) narkotisierten Ratte isoliert (peritoneale Lavage).

Mit einer Pasteurpipette wurden ca. 20-30 mL kaltes PBS über einen Bauchschnitt in die Bauchhöhle gegeben. Der Bauch wurde leicht massiert und das PBS wieder entnommen. Kontaminierte Erythrozyten wurden lysiert. Die Ausbeute für 12 Isolierungen betrug durchschnittlich $7,8 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^6$ Zellen pro Ratte. Das Minimum lag bei $4,8 \times 10^6$ Zellen und das Maximum bei 12×10^6 Zellen. Die Zellpopulation war mit anderen Leukozyten verunreinigt (u.a. B- und T-Lymphozyten) und ca. 60-70 Prozent der isolierten Zellen waren Makrophagen.

3.3.3 Isolierung von Lymphozyten

Lymphozyten wurden aus zervikalen Lymphknoten isoliert. Hierzu wurden diese durch ein Sieb („Cell Strainer“, Falcon/Invitrogen) gepresst und die Zellen zweimal mit PBS „gewaschen“. Das Zellpellet wurde mit 3 mL PBS aufgenommen und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Der Anteil der T-Lymphozyten an den Lymphozyten betrug ca. 75 Prozent.

3.4 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden Antigene auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden in erster Linie Cytospinpräparate von Alveolar- und Peritonealmakrophagen untersucht; zusätzlich einige Lungenschnitte.

Durchspülte und nicht-durchspülte Lungen wurden in Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit einem Kryostat (Leica CM 3050 S) wurden von diesen Präparaten 0,3 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt. Für die Cytospins wurden zwischen $3-5 \times 10^4$ Alveolar- bzw. Peritonealmakrophagen auf eine Fläche von ca. 28 mm² auf Objektträger (R Langenbrinck, Teningen) zentrifugiert. Die Präparate wurden über Nacht getrocknet, für zehn Minuten in Aceton (J.T. Baker) fixiert und anschließend zehn Minuten getrocknet. Die Präparate wurden dreimal für fünf Minuten in Tris-HCl-Puffer gewaschen. Die Primärantikörper (Tabelle 3.1) wurden mit Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Dänemark) 1:50 bzw. 1:100 ver-

dünnt, auf die Präparate verteilt und in einer feuchten Kammer über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Tris-HCl wurden die Präparate am nächsten Tag mit dem Sekundärantikörper *Rabbit-anti-Mouse*, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (DAKO), für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Da einige Primärantikörper mit dem Farbstoff FITC (Fluoreszenziso-thiocyanat) konjugiert waren, wurden sie mit einem *Rabbit-anti-FITC* Antikörper nachgewiesen. Beide Antikörper wurden mit Tris-HCl-Puffer, dem 30 Prozent Rattenserum (Endkonzentration) zugesetzt war, verdünnt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden drei Tropfen frisch angesetztes Liquid DAB (3,3 Dia-minobenzidin, BioGenex, USA) auf die Präparate gegeben und die Reaktion nach 2-6 Minuten gestoppt. Nach der Kernfärbung in Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt) für 90 Sekunden und dem anschließenden „Bläuen“ unter Leitungswasser, wurden die Objektträger in aufsteigender Alkoholreihe und anschließend in Xylol (J.T. Baker) entwässert. Abschließend wurden die Präparate mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Tabelle 3.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper für die Immunhistochemie.

Antikörper	Ziel-Molekül	Zielzellen	Konjugat	Lieferant
Ox-1	CD45	alle Leukozyten	FITC ^{**})	Linaris
ED-1	CD68	Makrophagen		Linaris
Ox-6	MHC II/ RT1 ^b	APZ ⁾		Linaris
Ox-42	CD11b	Makrophagen	FITC	Linaris
HM40-3	CD40	APZ	FITC	BD Biosciences
B7-1	CD80	APZ		Caltag
B7-2	CD86	APZ		Caltag
R73	α/β -TCR	T-Lymphozyten	FITC	Linaris
Ox-33	CD45RA	B-Lymphozyten	FITC	Linaris

⁾ Antigenpräsentierende Zellen; ^{**}) Fluoreszenziso-thiocyanat
www.linaris.de; www.bdbiosciences.com; www.caltag.com

Die Präparate wurden unter dem Olympus Mikroskop BH-2 ausgewertet und mit einer Digitalkamera (Olympus C-5050) dokumentiert. Mit dem Microsoft Office Picture Manager wurden die Bilder hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert und komprimiert. Darüber hinaus wurden keine weiteren Veränderungen vorgenommen.

3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Beurteilung des Lungengewebes und zur Darstellung frisch isolierter Alveolar- und Peritonealmakrophagen wurde eine Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung durchgeführt. Diese umfasst zwei Färbeschritte. Mit dem Farbstoff Hämatoxylin, der in seiner basischen Form stark färbend ist, werden alle basophilen bzw. sauren Bestandteile der Zellen blau gefärbt (z.B. der Zellkern und hier vor allem die DNA). Der synthetische Farbstoff Eosin färbt alle acidophilen bzw. basischen Bestandteile rot (z.B. Proteine im Zytoplasma). Die Färbung erfolgte wie im Abschnitt 3.4 beschrieben.

3.6 Durchflusszytometrie

Messprinzip

Die Durchflusszytometrie, eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension, basiert auf der Messung verschiedener optischer Signale, die entstehen, wenn einzelne Zellen, die eine Messkammer passieren, von einem Laserstrahl getroffen werden. Die Zellen verursachen dabei Streulicht und gebundene, Farbstoff-konjugierte Antikörper Fluoreszenzlicht. Das Vorwärtstreulicht (engl. Forward Light Scatter oder FSC) gibt Informationen zur Zellgröße und das Seitwärtstreulicht (engl. Side Light Scatter, SSC) zur Granularität der Zellen. Das Streu- und Fluoreszenzlicht wird von verschiedenen Detektoren aufgefangen und nach Intensität und Farbe getrennt digital gespeichert. So wird für jede einzelne gemessene Zelle eine charakteristische Kombination von optischen Eigenschaften aufgezeichnet (FSC, SSC und bis zu drei Fluoreszenzsignale).

Probenvorbereitung

Zwischen $2\text{-}5 \times 10^5$ Alveolar- oder Peritonealmakrophagen wurden in 50 μL PBS mit verschiedenen Antikörpern (Tabelle 3.2) für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend gewaschen. Für die Messung am Durchflusszytometer (FACScanTM, Becton Dickinson, Heidelberg) wurden die Zellen mit 300 μL PBS aufgenommen. Als Kontrolle diente eine Probe, die nicht mit Antikörpern inkubiert war (Solo-Wert). Zur Bestimmung der toten Zellen wurden die Proben mit 5 μL 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, BD Biosciences, Heidelberg) versetzt. Als Isotypenkontrollen wurden FITC- oder PE-konjugierte Mausantikörper (IgG_{1, κ}) (beide BD Biosciences, Heidelberg) eingesetzt. Wurden unkonjugierte Antikörper verwendet, so folgte ein zweiter Färbeschritt mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper (Esel anti-Maus, Jackson, Großbritannien). Am Durchflusszytometer wurden 10.000 Ereignisse mit dem Programm BD CellQuestTM Pro (Version 5.1.1) gemessen und gespeichert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem frei erhältlichen Programm WinMDI von Joseph Trotter in der Version 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

Färben von intrazellulären Antigenen

Um auch intrazelluläre Antigene, wie das für Makrophagen spezifische Glykoprotein CD68 in der Durchflusszytometrie nachweisen zu können, wurden die Zellen vor der Antikörperfärbung permeabilisiert („Fix und Perm“) von Caltag Laboratories GmbH, Hamburg. Jeweils zwischen $2\text{-}5 \times 10^5$ Zellen wurden hierzu in 100 μL Lösung A des „Fix und Perm“ Kits resuspendiert und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unter leichtem Vortexen wurden 3 mL eiskaltes Methanol zügig hinzugegeben und das Gemisch zehn Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (300 g) und das Pellet in 3 mL PBS resuspendiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 50 μL Lösung B des „Fix und Perm“ Kits resuspendiert und 3 μL Antikörper zugegeben (entweder ED1 (Tab. 3.2) oder die Isotypenkontrolle (s. oben)). Die Zellen wurden für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die pelletierten Zellen wurden mit 300 μL PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Tab. 3.2: Übersicht über die in dieser Arbeit für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper.

Antikörper	Ziel-Molekül	Zielzellen	Konjugat	Lieferant
Ox-1	CD45	Alle Leukozyten	FITC	Linaris
ED-1	CD68	Makrophagen	FITC	Linaris
Ox-6	MHCII	APZ ^{*)}	PE	Linaris
Ox-18	MHCI	MHC-II pos. Zellen	PE	Linaris
Ox-42	CD11b	Makrophagen	FITC	Linaris
HM40-3	CD40	APZ	FITC	BD Biosciences
B7-1	CD80	APZ	DAM-PE ^{**)}	Caltag
B7-2	CD86	APZ	DAM-PE	Caltag
R73	α/β -TCR	T-Lymphozyten	FITC	Linaris
Ox-33	CD45RA	B-Lymphozyten	FITC	Linaris

^{*)} Antigenpräsentierende Zellen; ^{**)} Da der Primärantikörper unkonjugiert war, wurden die Zellen zusätzlich mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert (Esel anti-Maus)
Internet-Adressen: siehe Tab. 3.1.

3.7 NO-Assay

Mit dem Griess Reagenz (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wird NO indirekt über das stabile Endprodukt NO_2^- (Nitrit-Ionen) in einer Farbreaktion gemessen. Jede Probe wurde doppelt bzw. dreifach bestimmt. Die Messung wurde in Flachboden-Mikroplatten mit 96 Vertiefungen (Greiner bio-one, Solingen-Wald) durchgeführt. In den ersten drei Reihen befand sich der Standard aus NaNO_2 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in folgenden Konzentrationen: 500 $\mu\text{mol/L}$, 250 $\mu\text{mol/L}$, 125 $\mu\text{mol/L}$, 62,5 $\mu\text{mol/L}$, 31,25 $\mu\text{mol/L}$, 15,63 $\mu\text{mol/L}$, 7,81 $\mu\text{mol/L}$, 0 $\mu\text{mol/L}$. Das Pipettiervolumen von Standard und Probe betrug jeweils 100 μL . Als Nächstes wurden in jede Vertiefung 100 μL Griess Reagenz gegeben, der Ansatz für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die Farbreaktion im Mikrotiterplattenlesegerät (Dynatech Laboratories, USA) bei 570 nm mit dem Programm XFLUOR4 (Version 4.51) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel 2003 der Firma Microsoft.

3.8 Bestimmung der Teilungsfähigkeit aktivierter Makrophagen

Die Teilungsfähigkeit LPS-stimulierter Alveolar- und Peritonealmakrophagen wurde untersucht. Dabei wurden nicht-stimulierte und stimulierte Zellen für ein, zwei oder drei Tage in Flachboden-Mikroplatten mit 96 Vertiefungen im Brutschrank bei 37°C und 5 Prozent CO₂ kultiviert. Für die letzten 18 Stunden wurden die Zellen mit 0,5 µCi/Vertiefung [³H]-Thymidin (MP Biomedicals) versetzt. Mit einem Szintillationsmeßgerät wurde der [³H]-Thymidin-Einbau in der Einheit „counts per minute“ (cpm) am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg bestimmt. Die Zellen wurden entweder mit 1 µg/mL LPS (L 6529, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder mit 1 ng/mL Interferon-γ (AAL08, R&D Systems, Wiesbaden) stimuliert.

3.9 Bestimmung immunaktivierender Eigenschaften aktivierter Makrophagen

Nicht-stimulierte und stimulierte Alveolar- bzw. Peritonealmakrophagen (1x10⁴ Zellen pro Vertiefung einer Rundboden-Zellkulturplatte; das Endvolumen betrug 100 µL), isoliert aus Lewis-Ratten, wurden mit T-Lymphozyten (1x10⁵ Zellen pro Vertiefung), isoliert aus Wistar-Furth-Ratten, kultiviert. Als Positivkontrolle wurden die T-Lymphozyten mit 500 µg/mL Ionomycin (Calbiochem, Bad Soden) und 10 ng/mL des Phorbolesters PMA (Sigma-Adrich, Taufkirchen) stimuliert. Die Platten wurden bei 37°C und 5 Prozent CO₂ für drei Tage kultiviert und für die letzten sechs Stunden mit 0,5 µCi/Vertiefung [³H]-Thymidin versetzt.

3.10 Nachweis von iNOS im Immunoblot

Stimulierte und nicht-stimulierte Alveolar- und Peritonealmakrophagen wurden auf die Anwesenheit von iNOS getestet. Mit dem Enzym iNOS (induzierte NO-Synthase) produzieren die Zellen das zelltoxische NO aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff unter Verbrauch von NADPH. Die Zellen (0,5-3x10⁶) wurden in einem Ultraschallbad zerstört und die Probe bei 5345 g und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 7 µL Reduktionsmix vermischt und hiermit die Geltaschen eines 12-prozentigen Acrylamidgels gefüllt. Als Molekularmarker wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermen-

tas) verwendet. Die Proben wurden bei 50 V für ca. 30 Minuten im Sammelgel konzentriert. Die Auftrennung des Proteingemisches dauerte 90 Minuten und wurde bei 120 V durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleicher & Schnell, Dassel) geblottet (350 mA für 40 Minuten bei 4°C). Die Membran wurde mit 5 Prozent Magermilchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal für zehn Minuten in TBS-Puffer „gewaschen“ und mit dem polyklonalen anti-iNOS-Antikörper (Stressgene) über Nacht bei 4°C inkubiert (Verdünnung: 1:5.000). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBS gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (Ziege anti-rabbit; Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:10.000 für eine Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS wurde die Membran mit einem Gemisch aus 5 mL der Lösung A und 5 mL der Lösung B des ECL Plus Western Blotting Detection Systems (GE Healthcare, München) für fünf Minuten inkubiert. Die Membran wurde zusammen mit einem Film in eine Kassette gelegt und der Film für ca. 20 Sekunden exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

3.11 RNA-Extraktion und RT-PCR

Für die RNA-Isolierung wurden zwischen $5,5 \times 10^5$ - 10×10^5 Zellen eingesetzt und mit 1 mL Trizol (Invitrogen) lysiert. Die RNA wurde mit 200 µL Chloroform (Roth) extrahiert und der Ansatz bei 16 060 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Chloroformüberstand wurde abgenommen und die RNA mit 500 µL Isopropanol (Merck) bei -20°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurde die RNA bei 13 684 g und 4°C für zehn Minuten pelletiert und mit 1 mL 75 Prozent Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 345 g bei 4°C für fünf Minuten) wurde das Pellet bei 37°C für zehn Minuten getrocknet, in 45 µL RNA storage solution (Ambion) resuspendiert und für zehn Minuten bei 57°C im Thermomixer (Eppendorf) bei 1 400 U/min gelöst.

Fünf µL RNA wurden in einem Endvolumen von 20 µL mit dem GeneAmp RNA PCR Kit (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) in cDNA umgeschrieben (An-

gaben als Endkonzentration): 1x PCR II Puffer (10x Stammlösung: 50 mmol/L KCl), 5 mmol/L MgCl₂, 2,5 µmol/L Oligo-dT16-Primer, 1 mmol/L dNTP-Gemisch (Promega), 1 U/µL RNase-Inhibitor und 2,5 µmol/L MuLV Reverse Transkriptase. Hieraus wurden jeweils 2 µL cDNA für die Polymerase-Kettenreaktion (insgesamt 35 Zyklen) entnommen. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten waren: 1x PCR-Puffer II; 1,5 mmol/L MgCl₂; 2 U AmpliTaq DNA-Polymerase und jeweils 0,5 µmol/L der entsprechenden Primer (Tab. 3.3). Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Positiv-Kontrolle („house-keeping“ Gen) verwendet. Die Amplifikate wurden in einem 2-prozentigen Agarosegel (Amresco über MoBiTec) separiert und anschließend mit dem ImageMaster UDS (Pharmacia Biotech) begutachtet und fotografiert.

Tabelle 3.3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer). Angegeben ist die forward (for)- und reverse (rev)-Sequenz, die Produktgröße in Basenpaaren (bp) und die Annealing-Temperatur (in °C). Alle Primer wurden über Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Primer	Sequenz (5'→3')	Größe (bp)	Temp °C
GAPDH	for GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG	319	62
	rev GTG AGC CCC AGC CTT CTC CAT		
iNOS	for GAT CAA TAA CCT GAA GCC CG	578	60
	rev GCC CTT TTT TGC TCC ATA AGG		

3.12 Auswertung und Statistik

Die Versuche wurden mit dem Programm Excel 2003 der Firma Microsoft statistisch ausgewertet. In den Diagrammen und Tabellen sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Alveolarmakrophagen der Ratte phänotypisch und funktionell charakterisiert.

4.1 Isolierung von Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen kommen auf der Oberfläche der Alveolen vor und lassen sich mit einer bronchoalveolären Lavage leicht isolieren. Im Durchschnitt wurden $3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$ Zellen pro Rattenlunge isoliert (n=29 Isolierungen).

Als Kontrollzellen wurden Peritonealmakrophagen verwendet, die durch eine peritoneale Lavage gewonnen wurden. Die durchschnittliche Zellausbeute betrug dabei $7,8 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^6$ Zellen pro Ratte. Die Isolierungsergebnisse sind in Tabelle A10.1 aufgelistet.

In Abbildung 4.1 sind sowohl Lungenschnitte, als auch isolierte Alveolarmakrophagen gezeigt. Die nicht-gespülten Lungen (A, B) weisen im Unterschied zu den gespülten Lungen kollabierte Alveolarräume auf (C, D). Bei den gespülten Lungen sind die Alveolarräume deutlich erweitert.

In Abbildung 4.2 sind die immunhistochemischen Ergebnisse der Lungenschnitte gezeigt. Sowohl bei den nicht-gespülten Lungen (linke Seite), als auch bei den durchgespülten Lungen (rechte Seite), wurden Alveolarmakrophagen nachgewiesen (Pfeile).

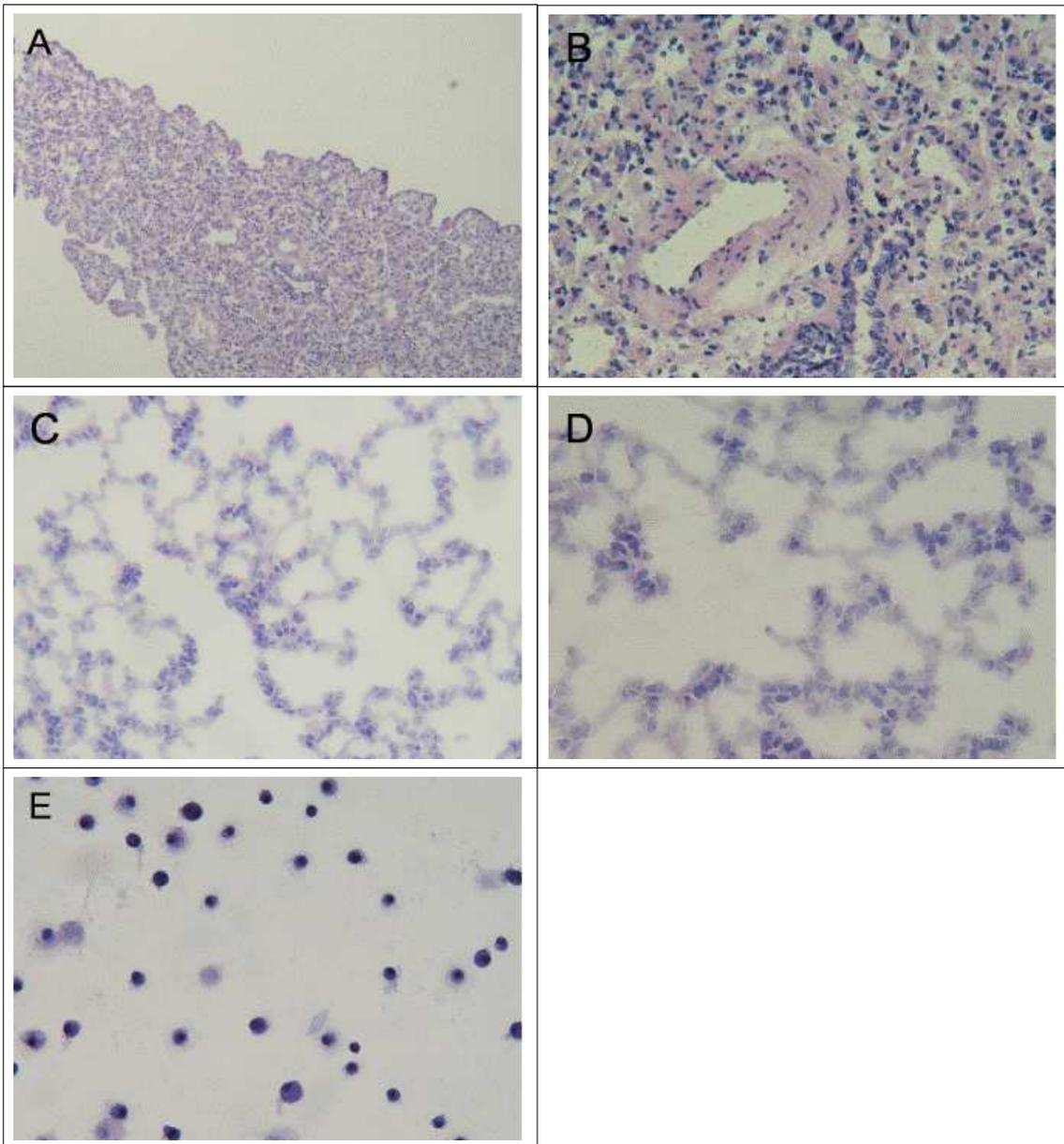


Abb. 4.1: Histologische Färbung (H/E) von Lungenschnitten (A-D) und isolierten Alveolar-makrophagen (E). Gezeigt sind nicht-gespülte Lungen (A, B) und gespülte Lungen (C, D) sowie frisch isolierte Alveolarmakrophagen (E). Vergrößerungen: 100-fach (A, C), 200-fach (B, D-E) plus einer digitalen Vergrößerung um den Faktor 2 bis 2,5.

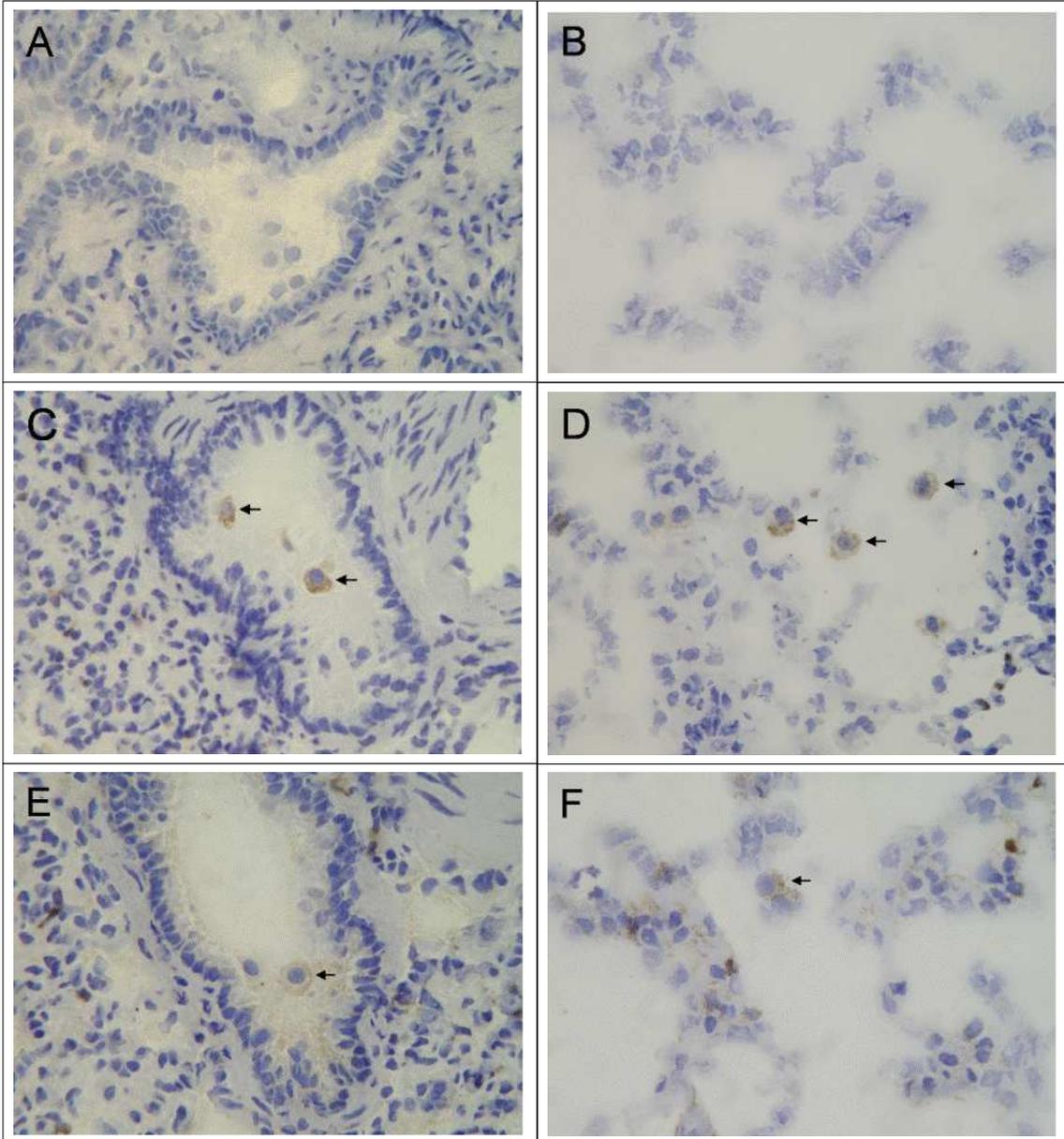


Abb. 4.2: Immunhistochemische Färbung von nicht-gespülten und gespülten Lungen. Immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern ED1 (C, D) und Ox-42 (E, F) an nicht-gespülten Lungen (A-E) und gespülten Lungen (B-F). Negativkontrollen: A und B. Vergrößerung: 200-fach plus einer digitalen Vergrößerung um den Faktor 2 bis 2,5. Die Pfeile markieren Alveolarmakrophagen.

4.2 Immunhistochemische Charakterisierung

Die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (CD68, CD11b, MHC-Klasse-I und Klasse-II-Moleküle, CD80 und CD86) wurde immunhistochemisch überprüft.

Nachweis von CD68 und CD11b

Die isolierten Zellen wurden auf die Expression der beiden Makrophagenmarker CD68 und CD11b untersucht (Abb. 4.3). Sowohl nicht-stimulierte als auch stimulierte Alveolarmakrophagen waren positiv für CD68 und CD11b.

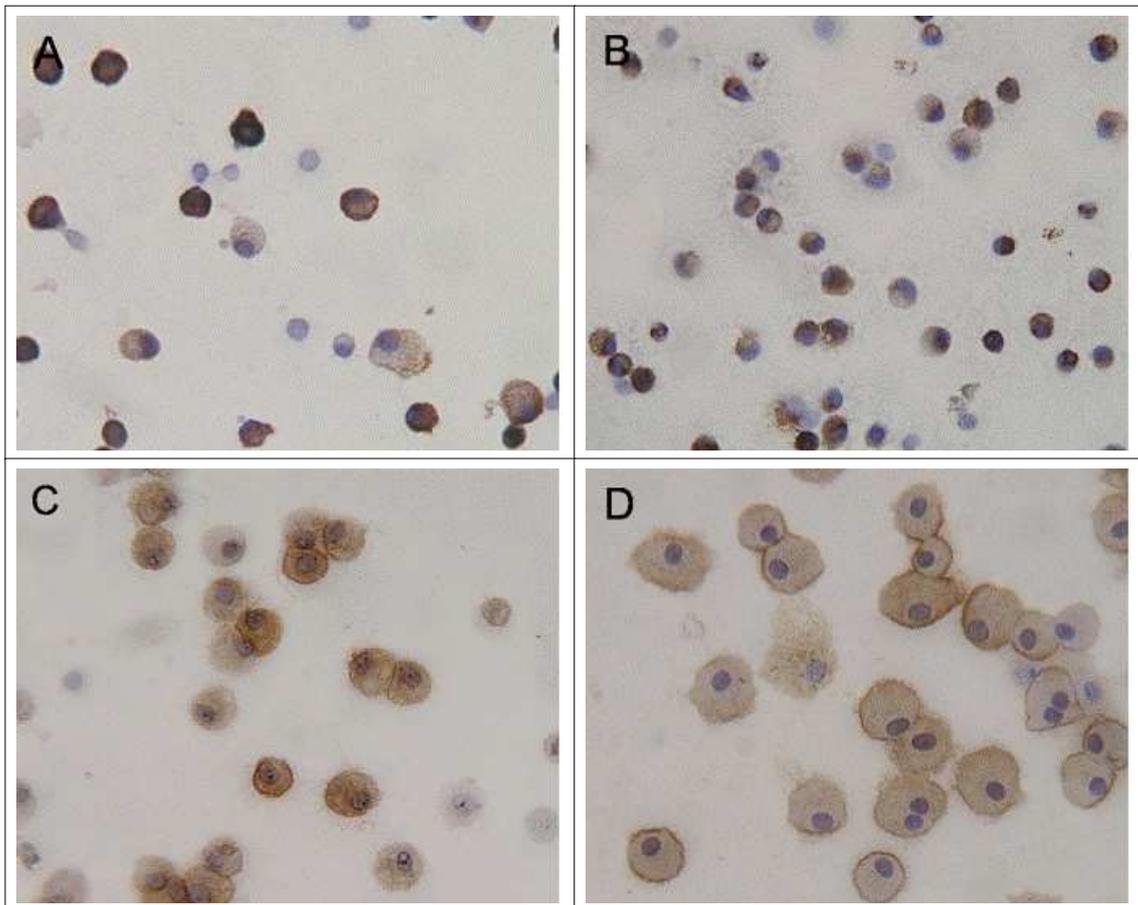


Abb. 4.3: Nachweis der Expression von CD68 und CD11b auf nicht-stimulierten und stimulierten Alveolarmakrophagen. Immunhistochemische Färbung mit den Antikörpern ED1 (A, B) und Ox42 (C, D). Gezeigt sind nicht-stimulierte Alveolarmakrophagen nach 24-stündiger (A) und 48-stündiger (C) Kultur und stimulierte Alveolarmakrophagen, die für 24 (B) bzw. 48 (D) Stunden mit LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inkubiert wurden. Vergrößerung: 200-fach plus einer digitalen Vergrößerung um den Faktor 2 bis 2,5.

Nachweis der Expression von MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen

Eine MHC-Klasse-I-Expression, aber keine MHC-Klasse-II-Expression, war sowohl auf nicht-stimulierten als auch stimulierten Alveolarmakrophagen nachzuweisen (Abb. 4.4).

LPS alleine kann nicht die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf Alveolarmakrophagen stimulieren; hierzu ist IFN- γ notwendig (Abb. 1.1).

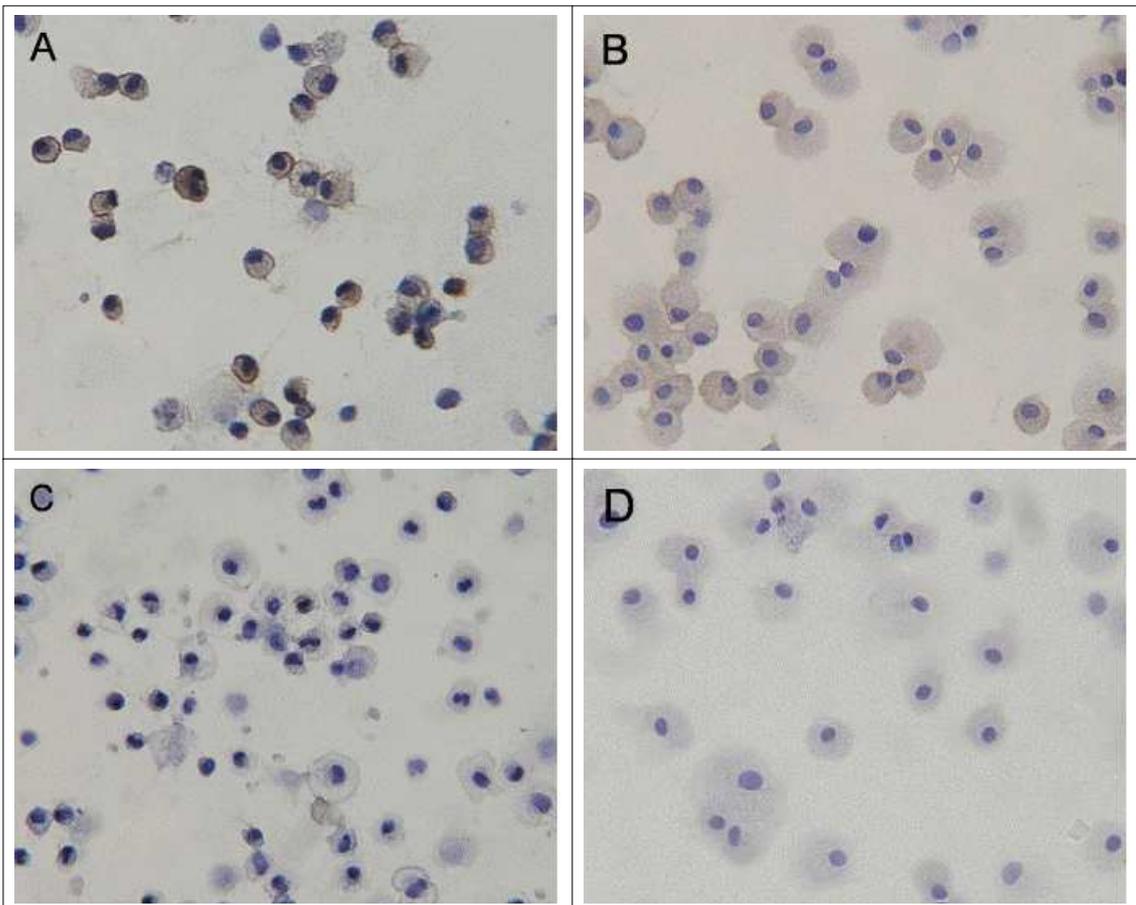


Abb. 4.4: Nachweis der Expression von MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen auf nicht-stimulierten und stimulierten Alveolarmakrophagen. Immunhistochemische Färbung mit den Antikörpern Ox-18 (A, B) und Ox-6 (C, D). Gezeigt sind nicht-stimulierte Alveolarmakrophagen 24 Stunden in Kultur (A), direkt nach Isolierung (C) und für 2 Tage mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS stimuliert (B u. D). Vergrößerung: 200-fach plus einer digitalen Vergrößerung um den Faktor 2 bis 2,5.

Nachweis der Expression kostimulatorischer Moleküle

Aktivierte Makrophagen zeigen eine verstärkte Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen, wie CD80 und CD86.

Für nicht-stimulierte Alveolarmakrophagen wurde keine Expression von CD86 auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Abb. 4.5). Nach Stimulierung mit 1 µg/mL LPS für 24 Stunden waren ca. 80 Prozent der Zellen positiv für CD86. Die immunhistologische Färbung mit CD80 zeigte ein vergleichbares Ergebnis (nicht gezeigt).

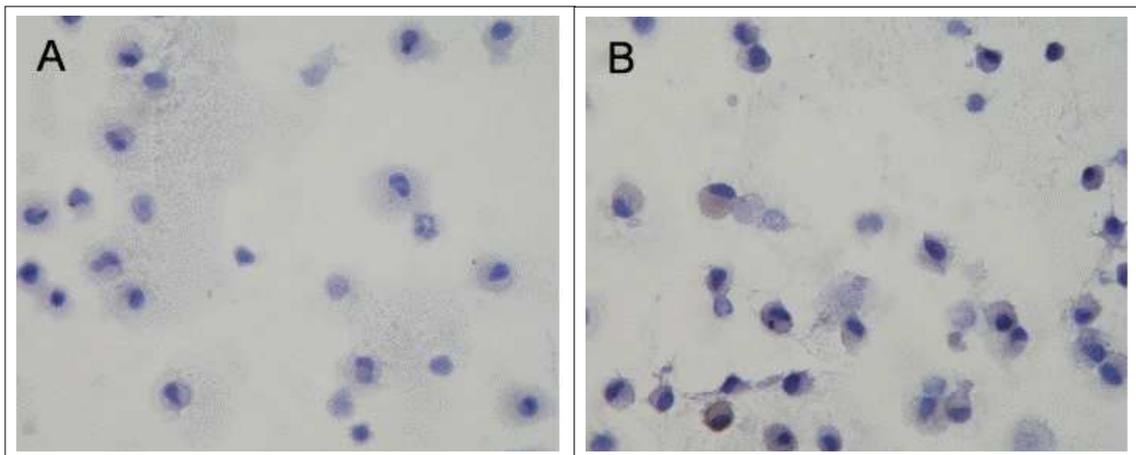


Abb. 4.5: Nachweis der Expression von CD86 auf nicht-stimulierten und stimulierten Alveolarmakrophagen. Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper B7-2 an nicht-stimulierten Alveolarmakrophagen nach 24-stündiger Kultur (A) und an mit LPS (1 µg/mL) stimulierten Alveolarmakrophagen nach 24 Stunden in Kultur (B). Vergrößerung: 200-fach plus einer digitalen Vergrößerung um den Faktor 2 bis 2,5.

4.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung

Zusätzlich zur immunhistochemischen Charakterisierung wurden Alveolar- und Peritonealmakrophagen auch durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.6 bis 4.11).

Alveolar- und Peritonealmakrophagen waren eindeutig positiv für den Leukozytenmarker CD45. Während der Großteil der Alveolarmakrophagen zudem positiv für CD11b war (ca. 70 Prozent und zw. 83 und 96 Prozent), waren sie negativ für CD68 (s. hierzu auch den Abschnitt „Intrazellulärer Nachweis von CD68“). Die Peritonealmakrophagen waren positiv für CD11b (zw. 83 und 96 Prozent) und zu einem geringen Anteil (ca. 18 Prozent) positiv für CD68.

Um die Reinheit der isolierten Makrophagen zu beurteilen, wurden auch Antikörper verwendet, die spezifisch für B- (CD45RA) und T-Lymphozyten (R73) sind. Beide Makrophagenpopulationen waren nahezu vollständig frei von B- und T-Lymphozyten. Eine Kontamination mit diesen Zellen lag unter 10 Prozent.

Nach Stimulierung mit LPS, wurden die Alveolarmakrophagen deutlich granulärer; ihr „*side scatter*“ (SSC) wurde größer (Abb. 4.6 und 4.7). Im Vergleich war bei den Peritonealmakrophagen keine offensichtliche Veränderung in den Zellparametern FSC und SSC festzustellen (Abb. 4.8 und 4.9).

Aktivierte Makrophagen zeigten eine deutliche Veränderung in der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle. So stieg die Expression der kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80, CD86 an. Deutliche Veränderungen zwischen aktivierten und nicht-aktivierten Alveolarmakrophagen waren für die Expression von CD80 zu beobachten (Abb. 4.6 und 4.7). Der Anteil CD80-positiver Alveolarmakrophagen stieg von 54 Prozent vor Stimulierung auf 72 Prozent nach Stimulierung an. Dabei nahm die Stärke der Expression nicht zu. Bereits ein Großteil (um die 80 Prozent) der isolierten Peritonealmakrophagen exprimierte

CD80 und CD86, der sich durch die Stimulierung mit LPS nur geringfügig erhöhte.

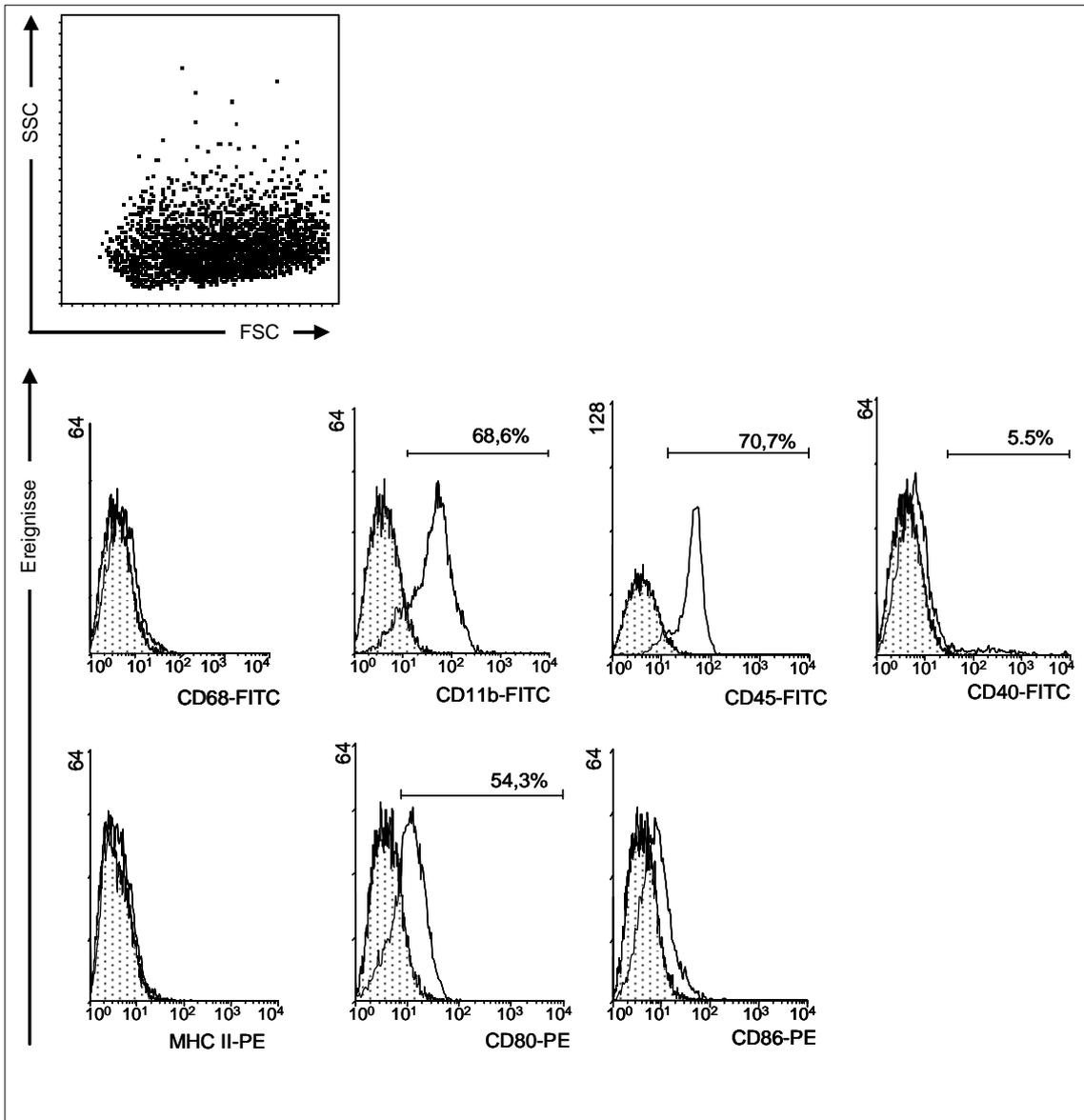


Abb. 4.6: Durchflusszytometrische Charakterisierung nicht-stimulierter Alveolarmakrophagen. Alveolarmakrophagen sind positiv für den Leukozytenmarker CD45 und für den Markophagenmarker Ox42 (CD11b). Repräsentative Darstellung von zwei unterschiedlichen Isolierungen.

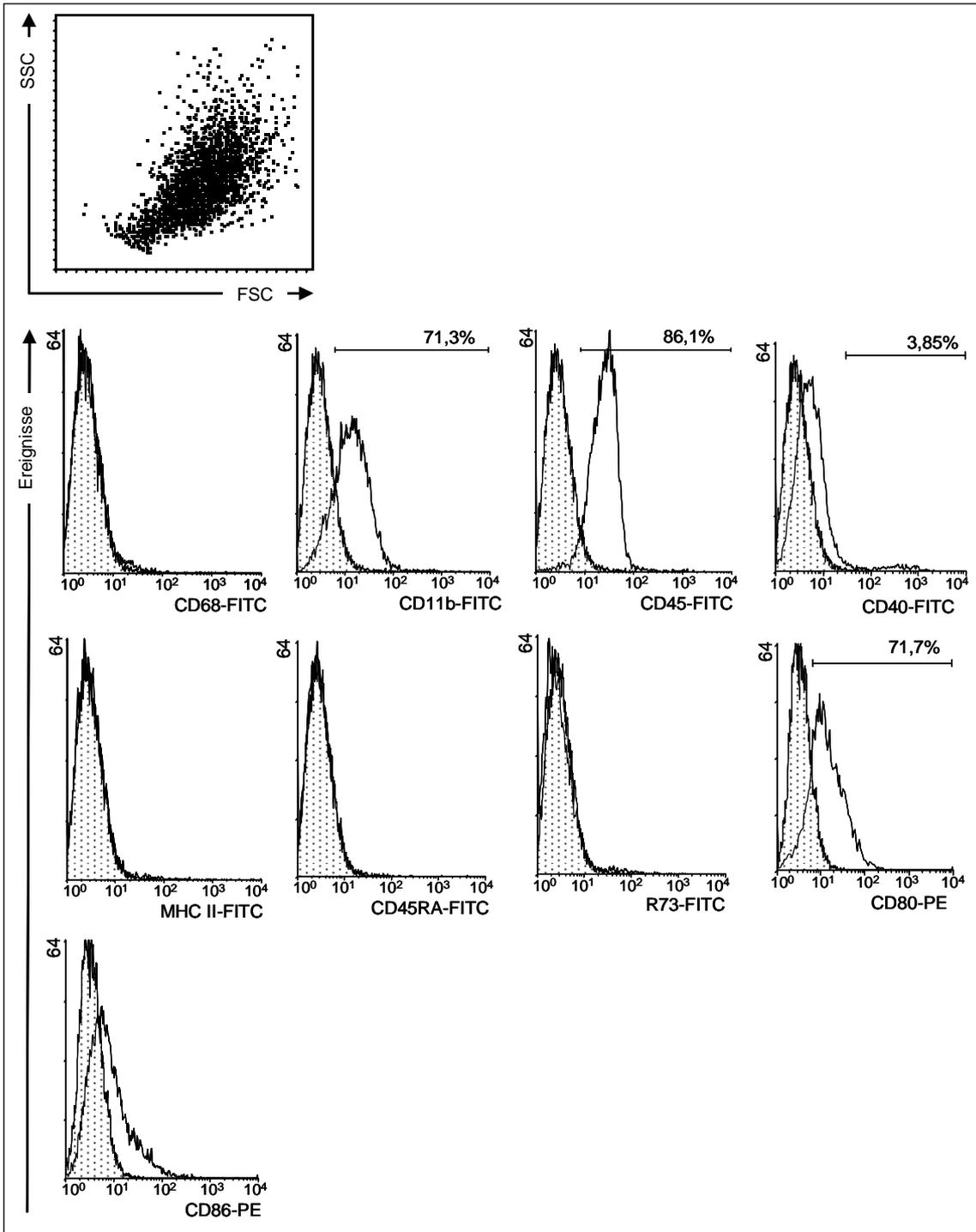


Abb. 4.7: Durchflusszytometrische Charakterisierung stimulierter Alveolarmakrophagen. Repräsentative Darstellung von drei unterschiedlichen Isolierungen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit LPS (1 µg/mL) inkubiert.

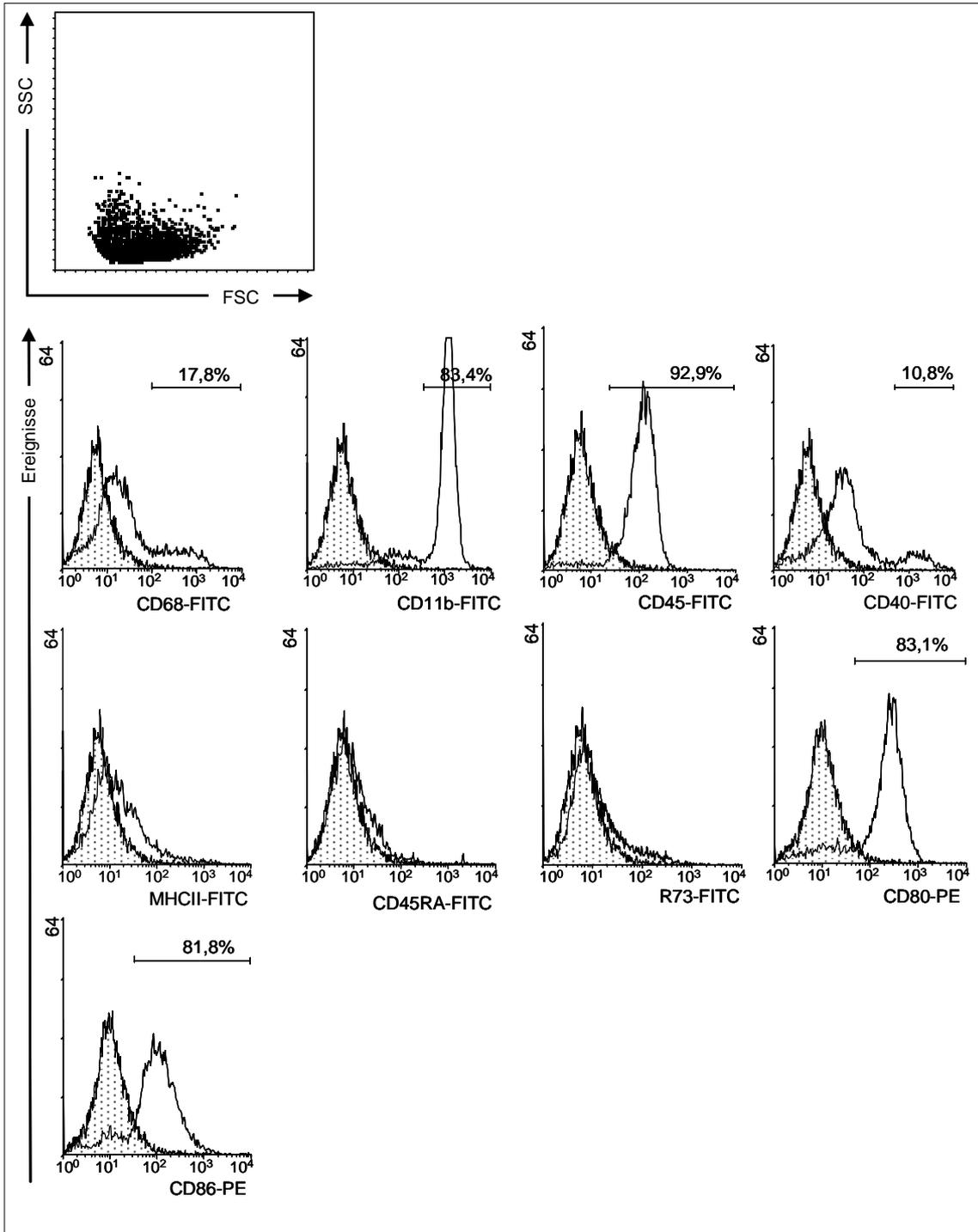


Abb. 4.8: Durchflusszytometrische Charakterisierung nicht-stimulierter Peritonealmakrophagen. Repräsentative Darstellung von zwei unterschiedlichen Isolierungen.

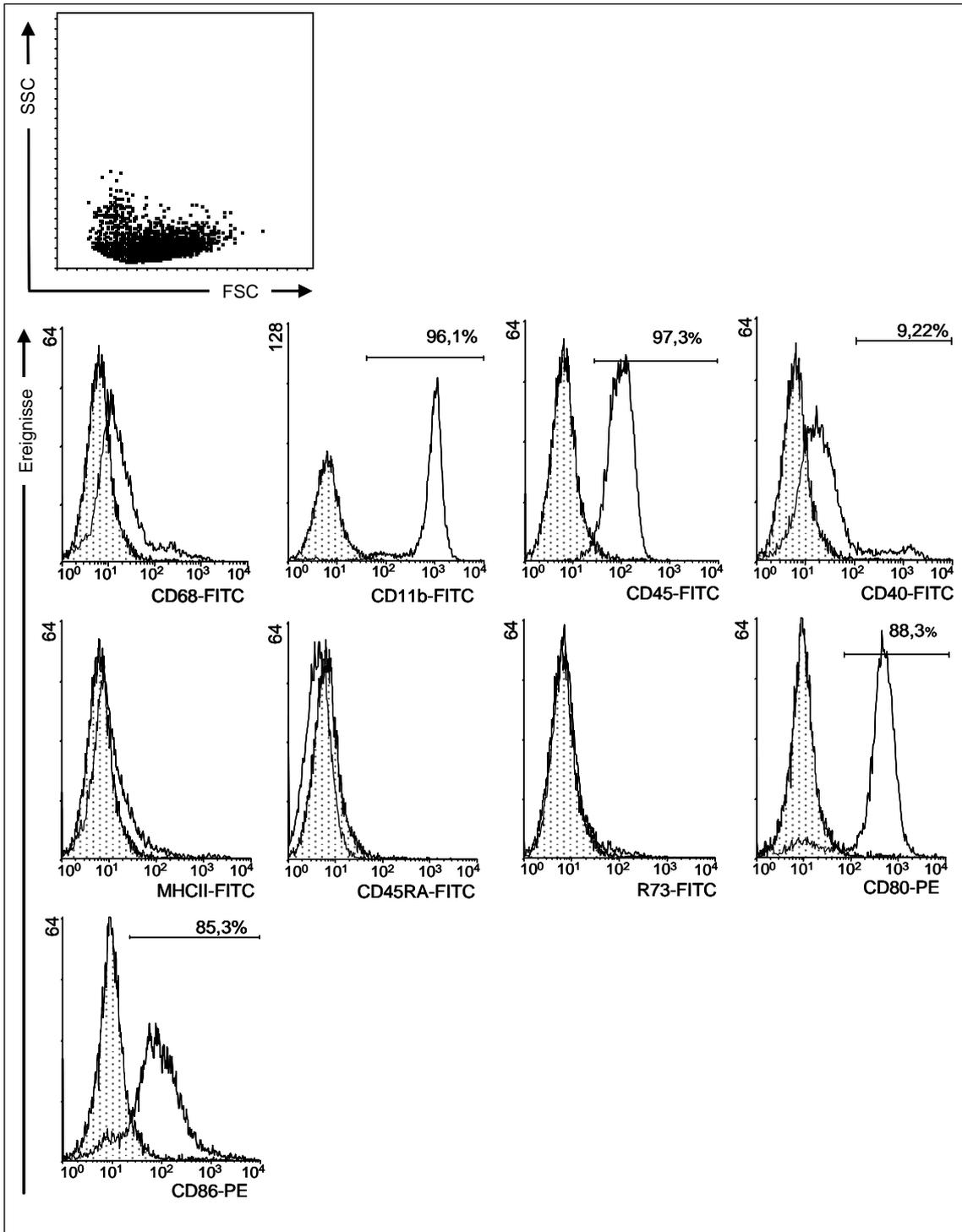


Abb. 4.9: Durchflusszytometrische Charakterisierung stimulierter Peritonealmakrophagen. Repräsentative Darstellung von drei unterschiedlichen Isolierungen.

Intrazellulärer Nachweis von CD68

CD68 befindet sich in erster Linie auf den Membranen von Lysosomen und Endosomen, während auf der (äußeren) Zellmembran nur geringe Mengen zu finden sind. Bei CD68 handelt es sich somit um einen intrazellulären Marker. Dies erfordert, dass die Zellen vor der Antikörperinkubation permeabilisiert werden; z. B. mit „Fix und Perm“ (s. auch Abschnitt 3.6).

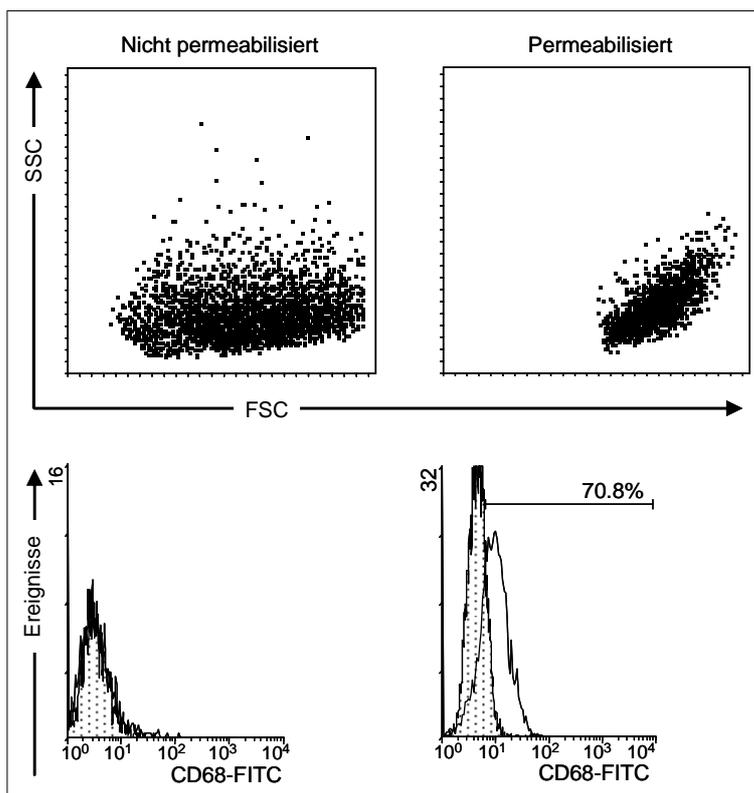


Abb. 4.10: Durchflusszytometrischer Nachweis von intrazellulärem CD68 in frisch isolierten Alveolarmakrophagen. Im Vergleich nicht-permeabilisierte und permeabilisierte Makrophagen.

Der Anteil CD68-positiver Zellen nach Permeabilisierung nahm bei den Alveolarmakrophagen stark zu (70,8 Prozent). Auch bei den Peritonealmakrophagen erhöhte sich der Anteil CD68-positiver Zellen nach Permeabilisierung deutlich (Abb. 4.11). Im Gegensatz zu den Alveolarmakrophagen war für ca. 20 Prozent der Peritonealmakrophagen eine Expression von CD68 auf der Zelloberfläche nachweisbar, die sich durch Stimulierung mit LPS nicht erhöhte (Abb. 4.8 und 4.9).

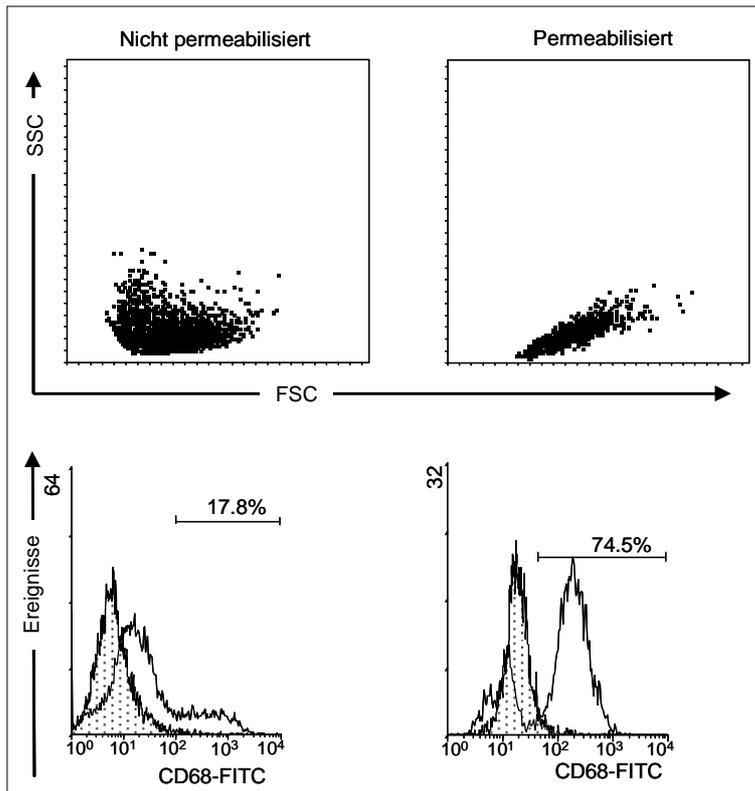


Abb. 4.11: Durchflusszytometrischer Nachweis von intrazellulärem CD68 in frisch isolierten Peritonealmakrophagen. Im Vergleich nicht-permeabilisierte und permeabilisierte Makrophagen.

4.4 Untersuchungen zur antigenpräsentierenden Funktion von Alveolar-makrophagen

In einer weiteren Versuchsserie wurde untersucht, ob Alveolar- und Peritonealmakrophagen naive T-Lymphozyten in einer „mixed leukocyte reaction“ aktivieren.

Bei einer „mixed leukocyte reaction“ oder gemischten Leukozytenreaktion werden Leukozyten zweier genetisch verschiedener Individuen kokultiviert. Hierbei handelt es sich einerseits um antigenpräsentierende Zellen und andererseits um T-Lymphozyten. Da die antigenpräsentierenden Zellen ein anderes Muster an Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes aufweisen als die T-Lymphozyten, erkennen diese sie als fremd und werden somit aktiviert.

Die in den Abb. 4.12 und 4.13 präsentierten Daten zeigen, dass weder Alveolar- noch Peritonealmakrophagen in der Lage waren, naive T-Lymphozyten zu aktivieren. Dies war unabhängig davon, ob sie mit LPS aktiviert waren oder nicht.

Dieses Ergebnis überrascht zumindest für die Peritonealmakrophagen, da bereits die frisch isolierten Zellen eine deutliche Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 aufwiesen (Abb. 4.8 und 4.9).

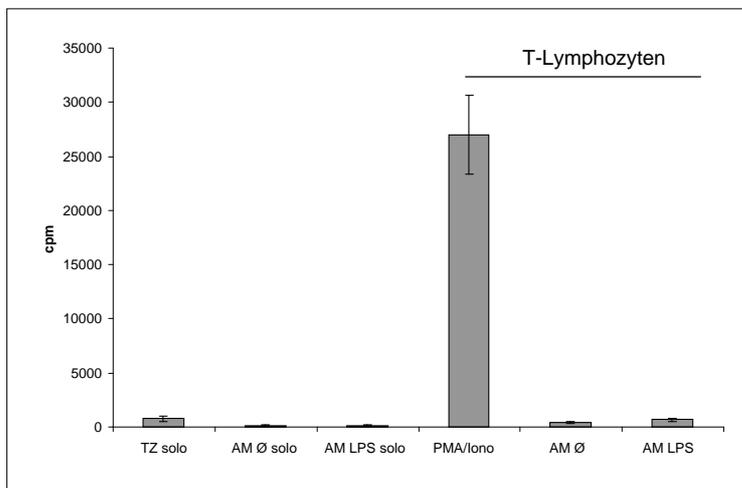


Abb. 4.12: Alveolarmakrophagen aktivieren keine naiven T-Lymphozyten *in vitro*. Getestet wurden nicht-aktivierte (AM Ø) und LPS-aktivierte (AM LPS) Alveolarmakrophagen. Um sicher zu stellen, dass die Präparation die T-Lymphozyten nicht geschädigt hatte, wurde ihre Fähigkeit zur Proliferation durch Inkubation mit PMA und Ionomycin (PMA/Iono) überprüft. Die „Autoproliferation“ von T-Lymphozyten (TZ solo), nicht-aktivierten und aktivierten Alveolarmakrophagen wurde ebenfalls überprüft.

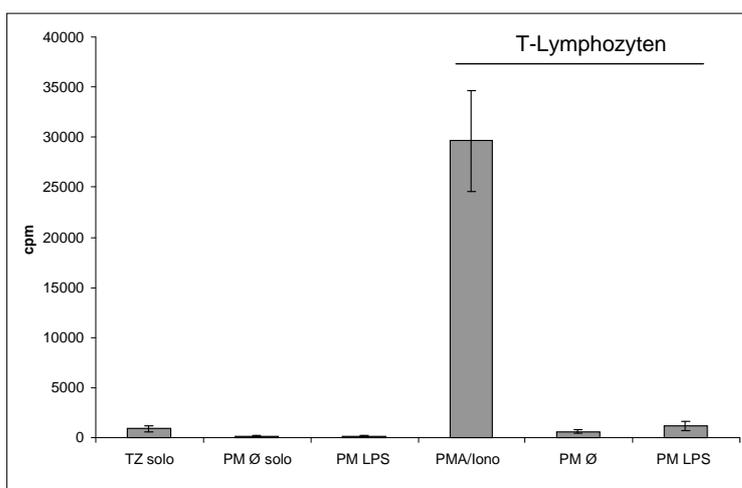


Abb. 4.13: Peritonealmakrophagen aktivieren keine naiven T-Lymphozyten *in vitro*. Getestet wurden nicht-aktivierte (PM Ø) und LPS-aktivierte (PM LPS) Peritonealmakrophagen. Um sicher zu stellen, dass die Präparation die T-Lymphozyten nicht geschädigt hatte, wurde ihre Fähigkeit zur Proliferation durch Inkubation mit PMA und Ionomycin (PMA/Iono) überprüft. Die „Autoproliferation“ von T-Lymphozyten (TZ solo), nicht-aktivierten und aktivierten Peritonealmakrophagen wurde ebenfalls überprüft.

4.5 Auswirkungen der LPS-Aktivierung

Mit LPS stimulierte Alveolarmakrophagen bildeten Zellaggregate in der Kultur (Abb. 4.14).

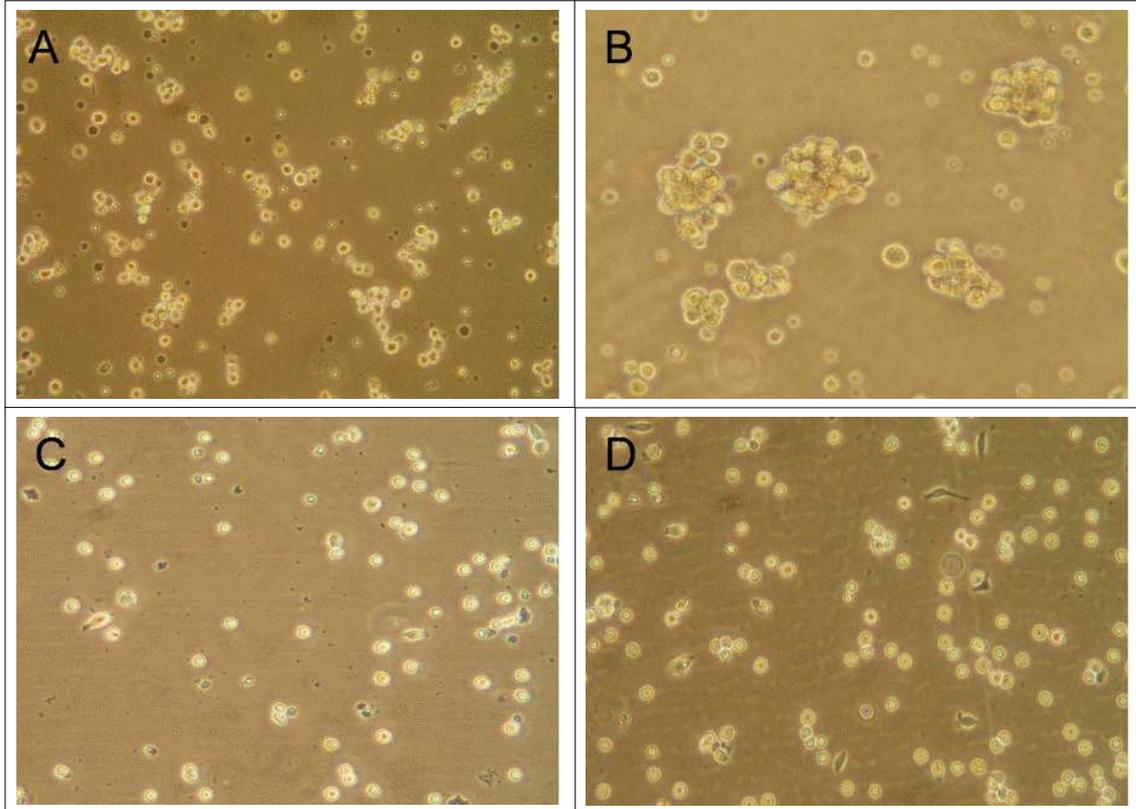


Abb. 4.14: Kultur nicht-stimulierter (A) und LPS- (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimulierter Tag 1 (B) Alveolarmakrophagen. Zum Vergleich: Nicht-stimulierte Tag 1 (C) und stimulierte Tag 1 (D) Peritonealmakrophagen. Auffällig ist die Bildung von Zellklustern bei aktivierten Alveolarmakrophagen. Diese Zellclusterbildung scheint aber nicht auf Proliferation zu beruhen wie in Abb. 4.15 gezeigt wird (Phasenkontrastmikroskopie, Vergrößerung 200-fach).

Stimulierte Alveolar- und Peritonealmakrophagen zeigten keine Proliferation (Abb. 4.15).

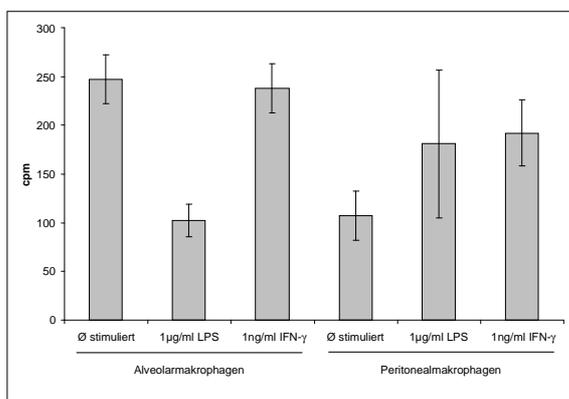


Abb. 4.15: Nachweis der Proliferation aktivierter Alveolar- und Peritonealmakrophagen. Alveolar- und Peritonealmakrophagen wurden für 72 Stunden mit LPS oder IFN- γ aktiviert und 24 Stunden vor Kulturrende radioaktiv markiertes Tritium hinzugegeben. Die anschließend gemessene geringe Radioaktivität deutet darauf hin, dass die Zellen sich nicht oder nur sehr gering geteilt haben. Der Grund für die in Abb. 4.14B dargestellte Zellclusterbildung liegt somit nicht in einer gesteigerten Zellteilung begründet.

4.6 Aktivierte Makrophagen sezernieren Stickstoffmonoxid

Die NO-Produktion von Alveolar- und Peritonealmakrophagen (s. hierzu Abb. A10.5 im Anhang) wurde quantitativ mit dem Griess Reagenz bestimmt.

In den Abbildungen 4.16 und 4.17 ist die NO-Produktion stimulierter Alveolar-makrophagen gezeigt. Hierzu wurden sie mit LPS (Abb. 4.16) oder IFN- γ (Abb. 4.17) inkubiert. Die im Überstand gemessene Konzentration an NO nahm sowohl bei den Alveolar-, als auch Peritonealmakrophagen mit der Zeit zu. Dies war unabhängig davon, ob sie mit LPS oder IFN- γ stimuliert wurden. Der Vergleich der Daten zeigt zudem, dass Alveolarmakrophagen 3 bis 4-mal mehr NO bildeten als Peritonealmakrophagen (siehe Appendix A10.4 und A10.5).

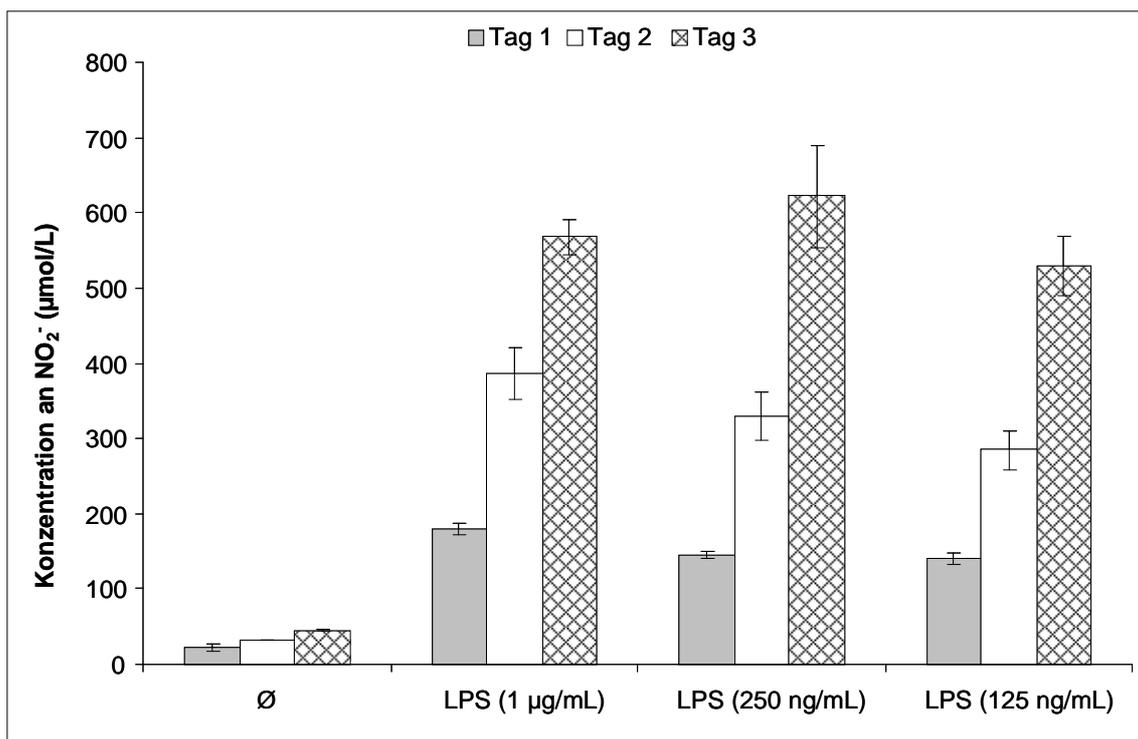


Abb. 4.16: Nachweis der NO-Produktion LPS-aktivierter Alveolarmakrophagen. Alveolar-makrophagen wurden mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen (1 µg/mL, 250 ng/mL und 125 ng/mL) für drei Tage stimuliert und die NO-Produktion mit dem Griess Reagenz bestimmt.

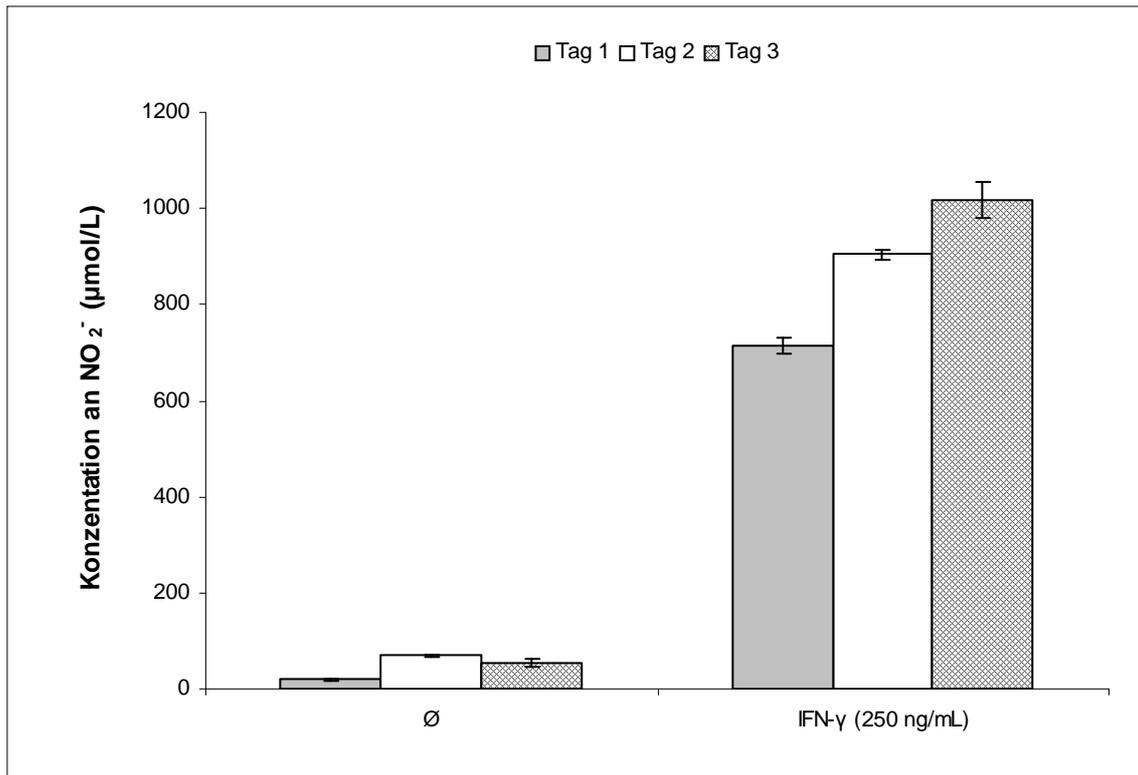


Abb. 4.17: Nachweis der NO-Produktion IFN- γ -aktivierter Alveolarmakrophagen. Alveolarmakrophagen wurden mit IFN- γ (250 ng/mL) für drei Tage stimuliert und die NO-Produktion mit dem Griess Reagenz bestimmt.

Für die Produktion von Stickstoffmonoxid aus Arginin benötigen die Zellen das Enzym iNOS (s. auch Abschnitt 3.11). Dies bedeutet, dass aktivierte Makrophagen, die NO produzieren, auch iNOS exprimieren müssen. Dieser Zusammenhang sollte durch den Nachweis iNOS-spezifischer mRNA und von iNOS selbst im Immunoblot hergestellt werden.

Zum einen wurde die Transkription des iNOS-Gens in der RT-PCR nachgewiesen. In LPS-stimulierten Alveolarmakrophagen war iNOS mRNA (Abb. 4.18) nachzuweisen – nicht aber in nicht-stimulierten Alveolarmakrophagen.



Abb. 4.18: Nachweis von iNOS mRNA in stimulierten Alveolarmakrophagen. Alveolarmakrophagen wurden zwei Tage mit 1 µg/mL LPS stimuliert und Gesamt-RNA aus 1×10^6 Zellen isoliert. Nur in aktivierten Alveolarmakrophagen war iNOS-spezifische mRNA in der RT-PCR nachweisbar (B), nicht aber in nicht-stimulierten Alveolarmakrophagen (C). In beiden Präparationen war die GAPDH-Kontrolle positiv (E, F). Basenpaarleiter (A, D, G).

Auch auf Proteinebene im Immunoblot wurde in stimulierten Alveolarmakrophagen iNOS nachgewiesen (Abb. 4.19). Bei den stimulierten Alveolarmakrophagen (Abb. 4.19) war eine Proteinbande zwischen 95 kD und 130 kD zu sehen; in diesem Größenbereich befindet sich das Protein iNOS. Bei den nicht-stimulierten Alveolarmakrophagen fehlte diese Bande.

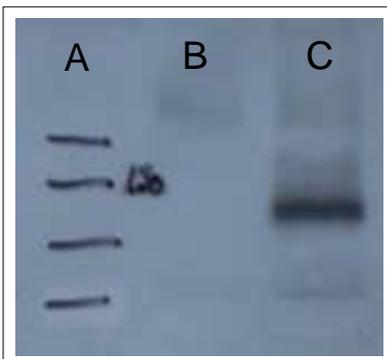


Abb. 4.19: Nachweis von iNOS im Immunoblot. Hierzu wurden bis zu 3 Millionen Zellen aufgearbeitet.
 A: Standard mit markierter Bande bei 130 kD
 B: nicht-stimulierte Alveolarmakrophagen
 C: LPS-stimulierte Alveolarmakrophagen (1 µg/mL), Tag 2. Im Lysat der stimulierten Alveolarmakrophagen ist zwischen 95 kD und 130 kD die iNOS-Bande zu erkennen.

Zusammenfassung

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst. Zum Vergleich wurden Peritonealmakrophagen untersucht; der Großteil der Ergebnisse hierzu ist im Anhang zu finden.

Tab. 4.1: Vergleich von Alveolar- und Peritonealmakrophagen.

	Alveolarmakrophagen	Peritonealmakrophagen
Zellausbeute pro Ratte	$3,0 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^6$
Reinheit	ca. 90-95 Prozent	ca. 60-70 Prozent
Expression von Makrophagenmarkern	CD68, CD11b	CD68, CD11b
Expression von MHC-Molekülen	MHCI	MHCI, MHCII
Expression kostimulatorischer Moleküle	CD80/CD86 nach Stimulierung mit LPS	CD80/CD86
Aktivierung naiver T-Lymphozyten	Nein	Nein
Zellproliferation	Nein	Nein
Produktion von NO	Stark erhöht nach Stimulierung mit LPS/IFN- γ	Geringfügig erhöht nach Stimulierung mit LPS
Nachweis von iNOS	nach Stimulierung mit LPS	nicht nachgewiesen (auch nicht nach Stimulierung mit LPS)

MHCI: MHC-Klasse-I-Moleküle; MHCII: MHC-Klasse-II-Moleküle

5 Beantwortung der Fragen

In der vorliegenden Arbeit wurden Alveolarmakrophagen der Ratte charakterisiert und ihre Aktivierung *in vitro* untersucht. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Alveolarmakrophagen der Ratte wurden mit einer bronchoalveolären Lavage isoliert. Wie hoch war die Ausbeute pro Lunge?

Im Durchschnitt wurden drei Millionen Alveolarmakrophagen pro Rattenlunge isoliert. Aus dem Peritoneum einer Ratte wurden zwar mehr als doppelt so viele Zellen isoliert, ihre Reinheit war aber mit 60-70 Prozent sehr viel geringer als für Alveolarmakrophagen mit ca. 90-95 Prozent.

2. Welche Oberflächenmarker wurden für die isolierten Alveolarmakrophagen nachgewiesen?

Für nicht-stimulierte Alveolarmakrophagen wurde die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen, der beiden Makrophagenmarker CD68 und CD11b und des kostimulatorischen Moleküls CD80 nachgewiesen. Zudem waren sie für den Leukozytenmarker CD45 positiv. Die mit LPS (1 µg/mL) stimulierten Alveolarmakrophagen exprimierten zusätzlich das kostimulatorische Molekül CD86.

3. Wie änderten sich die Eigenschaften isolierter Alveolarmakrophagen nach Stimulierung mit INF- γ und LPS?

Stimulierte Alveolarmakrophagen zeigten deutlich veränderte Eigenschaften. So war eine Zunahme der Zellgröße, die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie die Ausschüttung NO und die Expression von iNOS zu beobachten. Eine Aktivierung naiver T-Lymphozyten war nicht nachzuweisen.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Alveolarmakrophagen der Ratte *in vitro* zu charakterisieren. Sowohl ihr Phänotyp wurde mit immunhistologischen und durchflusszytometrischen Methoden untersucht, als auch die Möglichkeit, sie mit IFN- γ und LPS vollständig zu aktivieren (Abb. 1.1). Dies wurde mit dem Nachweis von iNOS und NO überprüft.

6.1 Makrophagen: Zellen der „*innate immunity*“

Makrophagen sind, nach der epithelialen Barriere, die erste „Verteidigungslinie“ zur Abwehr eindringender Erreger. Diese werden entweder phagozytiert und so unschädlich gemacht oder mit zelltoxischen Substanzen „bombardiert“. Dies gilt im besonderen Maße für die in dieser Arbeit untersuchten Alveolarmakrophagen. Sie befinden sich in den Alveolen und stehen somit direkt mit der Außenluft in Kontakt (s. hierzu auch die Einleitung).

In Abschnitt 1.4 der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass vollständig aktivierte Makrophagen in der Lage sind, auch Tumorzellen abtöten. Leider ist dies nicht immer der Fall und so genannte *tumour-associated macrophages* oder TAMS können vom Tumor dermaßen beeinflusst werden, dass sie die Tumorphoresion fördern statt hemmen (Balkwill F, Mantovani A, 2001; Mantovani A et al., 2002; Murdoch C, Lewis CE, 2005). Vollständig aktivierte Makrophagen (Abb. 1.1) schütten verschiedenste Mediatoren wie Zytokine (u.a. IL-1, IL-12, TNF), reaktive Sauerstoffspezies oder Stickstoffmonoxid (NO) aus. NO bzw. sein stabiles Endprodukt NO_2^- lassen sich dabei sehr einfach und kostengünstig im Zellkulturüberstand nachweisen. Makrophagen, die NO ausschütten, sind vollständig aktiviert (Abb. 1.1).

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiges Molekül in der angeborenen Immunabwehr, zum Beispiel zur Abwehr parasitischer Würmer, die die Makrophagen nicht phagozytieren können (Murphy K et al., 2008). Die Wirkungsweise von NO ist unspezifisch und extrem zelltoxisch – in manchen Experimenten auch für die

Makrophagen selbst (MacMicking J et al., 1997). Zudem ist NO ein wichtiges Effektormolekül bei der Transplantatabstoßung (Bingaman AW et al., 2000; Matuschek A et al., 2009). Diese wenigen Beispiele verdeutlichen, dass die Aktivierung von Makrophagen und damit die Produktion und Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) unter sehr kontrollierten Bedingungen ablaufen muss, da NO unspezifisch zelltoxisch wirkt und nicht zwischen Krankheitserregern und körpereigenen Zellen unterscheidet. Zudem unterliegen aktivierte Makrophagen keiner Kontrolle.

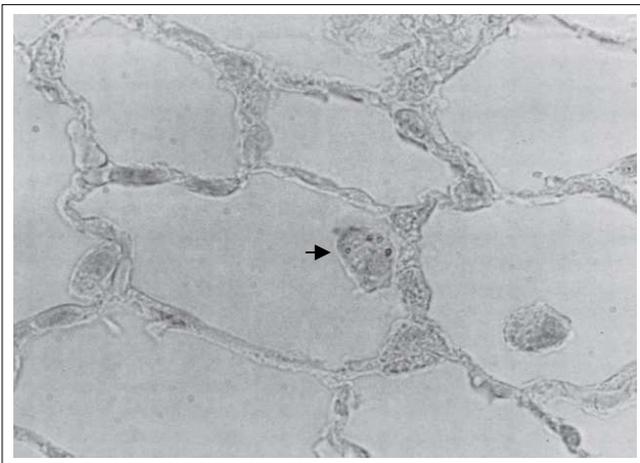


Abb. 6.1: Die Ingestion inhalierter Bakterien durch Alveolarmakrophagen ist eine wichtige Eigenschaft bei der Infektionsabwehr. Gezeigt ist eine Makrophage mit intrazellulären Staphylokokken (Pfeil).

Aus: Goldstein E, Lippert W, Warshauer D. Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection of the lung. J Clin Invest 1974; 54(3): 519-528.

6.2 Funktion der Makrophagen innerhalb des Immunsystems

Makrophagen spielen nicht nur bei der angeborenen Immunabwehr eine entscheidende Rolle, sondern sind auch eine wichtige Zellpopulation bei der erworbenen Immunabwehr. Sie können mit T-Lymphozyten interagieren. Hierzu exprimieren Makrophagen verschiedene Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, über die sie mit T-Lymphozyten in Kontakt treten. In diesem Zusammenhang wurden in dieser Arbeit die für die Kostimulation wichtigen Oberflächenmoleküle CD80, CD86 und CD40 immunhistologisch und durchflusszytometrisch untersucht. CD80 und CD86 finden sich nicht nur auf aktivierten Makrophagen, sondern auch auf anderen antigenpräsentierenden Zellen wie Dendritischen Zellen und B-Lymphozyten.

CD80 und CD86 sind Liganden für den Rezeptor CD28, der sich auf der Zelloberfläche naiver T-Lymphozyten befindet. Um naive T-Lymphozyten zu aktivieren, müssen sie von einer antigenpräsentierenden Zelle sowohl Liganden zur Kostimulation als auch das durch MHC-Klasse-II-Moleküle präsentierte Antigen erhalten (Murphy K et al., 2008). Makrophagen sind, im Gegensatz zu aktivierten Dendritischen Zellen, nicht in der Lage naive T-Lymphozyten zu aktivieren. Sie können nur bereits voraktivierte T-Lymphozyten (Effektor- oder Gedächtnis-T-Lymphozyten) reaktivieren (Murphy K et al., 2008) und deren Funktion regulieren (Bakker JM et al., 1998). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Auffassung (Abb. 4.12).

Die für die vorliegende Arbeit isolierten Alveolarmakrophagen waren positiv für die Makrophagenmarker CD68 und CD11b. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit wird durch Daten von Sone et al. bestätigt. Die Autoren fanden, dass ca. 97 Prozent der Zellen einer bronchoalveolären Lavage Alveolarmakrophagen sind (Sone S et al., 1980).

Die mit LPS stimulierten Alveolarmakrophagen waren positiv für CD80 und CD86 (für IFN- γ wurde dies nicht untersucht) und negativ für das kostimulatorische Molekül CD40. Auch wurde für sie in dieser Arbeit keine Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen gefunden. Dieses Ergebnis überrascht, da der klassische Weg der Makrophagenaktivierung zu einer Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen führt (Mosser DM, 2003; Gordon S, Taylor PR, 2005). Da LPS die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche von Makrophagen beeinflusst (Jephthah-Ochola J, 1988), kann zum jetzigen Zeitpunkt über die Gründe für die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse nur spekuliert werden. Andererseits soll LPS in der Lage sein, die durch IFN- γ induzierte Expression von MHCII-Molekülen zu hemmen (Adams DO, Hamilton TA, 1987).

Tab. 6.1: Überblick über die verschiedenen Funktionen von Makrophagen bei der Immunabwehr.

Makrophagenfunktion	Bedeutung für die zellvermittelte Immunität
Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies	Abtötung von Mikroben in den Phagosomen
Sekretion von Zytokinen (TNF, IL-1, IL-12)	TNF, IL-1: Auslösen von Inflammation („leukocyte recruitment“) IL-12: Induktion der Differenzierung von Th1 T-Lymphozyten, Produktion von IFN- γ
Produktion von NO	Hemmung der Proliferation aktivierter T-Lymphozyten, Abwehr von Erregern
Gesteigerte Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen	Aktivierung von voraktivierten T-Lymphozyten (Amplifizierung der T-Zell-Antwort)

6.3 Aktivierung von Makrophagen *in vitro* und *in vivo*: Die Bedeutung von IFN- γ

Aktivierte Makrophagen stellen eine der wirkungsvollsten Effektorzellen des Immunsystems dar (Neumann RP, 2003). Wie in der Einleitung beschrieben, werden bei der Aktivierung von Makrophagen zwei Wege unterschieden: der klassische und der alternative Weg.

Ohne an dieser Stelle das Gesagte der Einleitung zu wiederholen, soll doch der klassische Weg der Makrophagenaktivierung kurz in Erinnerung gerufen werden. Dieser erfolgt in zwei Schritten: Auf ein *priming* mit IFN- γ benötigen die Makrophagen ein zweites Signal, den *trigger*, um vollständig aktiviert zu werden (Abb. 1.1 u. 1.2); dies können Mitogene wie Lipopolysaccharide, abgekürzt LPS, sein, die an den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) binden. LPS stammt aus der Zellwand gramnegativer Bakterien (s. hierzu die Einleitung). Auch *in vivo* werden Makrophagen durch die Aufnahme von Mikroorganismen aktiviert (Murphy K et al., 2008). So kann zum Beispiel LPS auch eingeatmet werden und dadurch in die Lunge bzw. Alveolen gelangen, wo es an Alveolarmakrophagen bindet und diese vollständig aktiviert.

Als Quelle für IFN- γ kommen in erster Linie T-Lymphozyten mit einem Th1-Phänotyp infrage. IFN- γ ist zwar bedeutsam für das „*priming*“ als Voraussetzung zur vollständigen Aktivierung von Makrophagen (Abb. 1.1), jedoch werden in der aktuellen Literatur widersprüchliche Ergebnisse und Auffassungen zur Bedeutung von IFN- γ für die vollständige Aktivierung von Makrophagen präsentiert. Als sicheres Indiz für die vollständige Aktivierung von Makrophagen wurde in dieser Arbeit die Produktion von NO gewertet (Abb. 1.1). So zeigten Steinmüller et al., dass die intratracheale Exposition von IFN- γ zu einer deutlichen NO-Produktion von 90 bis 110 $\mu\text{mol/L}$ führte (Steinmüller C et al., 2000). Die Alveolarmakrophagen waren bei ihnen vollständig aktiviert. Auch Mantovani et al. beschreiben, dass Makrophagen allein mit IFN- γ vollständig aktiviert werden können (Mantovani A et al., 2004) und Prokhorova et al. weisen eine konzentrationsabhängige NO-Produktion nach.

Die allein aktivierende Eigenschaft von IFN- γ wird von Mosser bezweifelt. Er und Gordon zeigten, dass IFN- γ nicht in der Lage ist, die Produktion von NO zu induzieren (Mosser DM, 2003). Die Makrophagen benötigen für eine vollständige Aktivierung immer zwei Signale, d.h. IFN- γ muss immer mit TNF oder LPS kombiniert sein – *in vitro* entweder hintereinander oder kombiniert (Gordon S, 2003; Gordon S, Taylor PR, 2005). Auch Bingaman et al. beschreiben IFN- γ als essentielles erstes Signal der klassischen Aktivierung (Bingaman AW et al., 2000). Makrophagen, die ausschließlich für 48 Stunden mit IFN- γ (100 U/mL) inkubiert wurden, produzierten nur niedrige NO-Spiegel von 10 $\mu\text{mol/L}$; wurde IFN- γ (100 U/mL) mit TNF (500 U/mL) kombiniert, dann produzierten die Makrophagen 50 $\mu\text{mol/L}$ NO.

Morgan et al. beschreiben, dass auch nach alleiniger LPS-Gabe eine erhöhte NO-Bildung durch Alveolarmakrophagen zu messen war (Morgan DL, Shines CJ, 2004). Bakker et al. untersuchten die Wirkung von LPS auf Makrophagen im Detail. Die Autoren überprüften LPS-Konzentration von 0,01-100 $\mu\text{g/mL}$ mit

einer Inkubationszeit von 24 Stunden und fanden eine konzentrationsabhängige Zunahme der NO-Produktion: ca. 70 $\mu\text{mol/L}$ bei 0,01 $\mu\text{mol/mL}$ LPS; ca. 90 $\mu\text{mol/L}$ bei 1 $\mu\text{mol/mL}$ LPS und ca. 100 $\mu\text{mol/L}$ bei 100 $\mu\text{mol/mL}$ LPS (Bakker JM et al., 1998). Jesch et al. sowie Hirano beschreiben ebenfalls eine von der LPS- und IFN- γ -Dosis abhängige NO-Produktion nach 24 Stunden Inkubation (Jesch NK et al., 1997; Hirano S, 1998). Prokhorova S et al. zeigten, dass LPS (1 oder 10 ng/mL) und IFN- γ (1 U/mL) die NO-Produktion synergistisch steigerten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Produktion von NO nach Inkubation von Alveolarmakrophagen mit LPS oder IFN- γ untersucht. Dabei wurde eine konzentrationsabhängige NO-Produktion nach Stimulation mit LPS gemessen (Abb. 4.16). Noch stärker war die NO-Produktion, wenn die Alveolarmakrophagen mit IFN- γ (250 ng/mL) stimuliert wurden (Abb. 4.17). Hingegen war eine Konzentration von 1 ng/mL IFN- γ ohne Wirkung auf die NO-Bildung. In der vorliegenden Arbeit spielte neben dem Faktor Konzentration auch der Faktor Zeit eine große Rolle. Die Inkubationszeiten betragen 24, 48 und 72 Stunden, wobei die Zunahme der NO-Produktion mit der Zeit anstieg.

Schlussbemerkung: Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass hohe Konzentrationen von IFN- γ (250 ng/mL) die NO-Produktion zeitabhängig induzieren. Inwieweit Kontaminationen mit geringen Spuren an LPS für diese Ergebnisse verantwortlich sind, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden. Die Daten dieser Arbeit zeigen jedoch, dass das intensiv untersuchte Phänomen der Makrophagenaktivierung im Detail immer noch nicht vollständig verstanden ist.

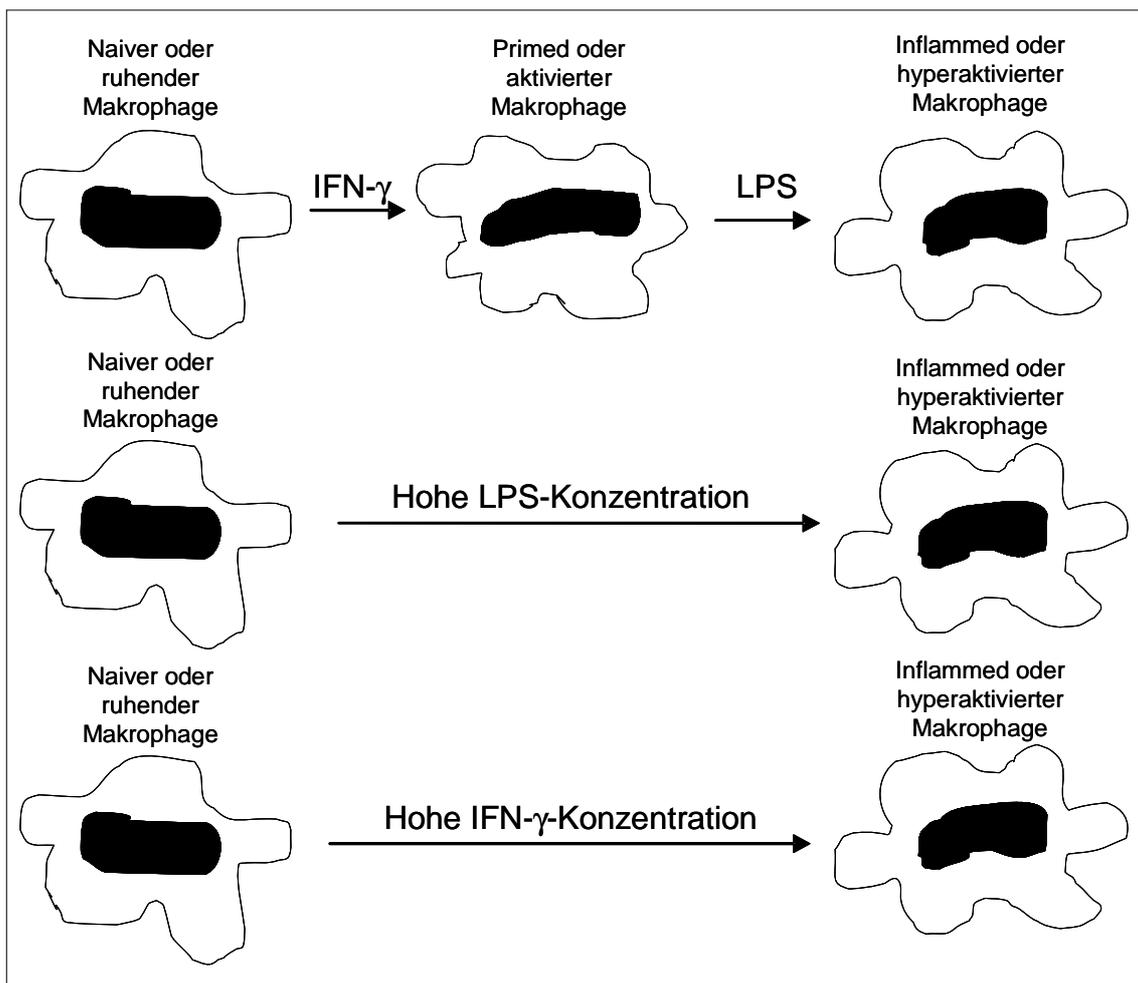


Abb. 6.2: Schematisierte Darstellung der Makrophagenaktivierung. Wie bereits in der Einleitung dargestellt (Abb. 1.1), werden Makrophagen über einen zweistufigen Weg aktiviert. Der vollständig aktivierte (inflammatorische („inflammated“) oder hyperaktivierte) Makrophage sezerniert u.a. Stickstoffmonoxid (NO) (Abb. 1.1). Zusätzlich zu dieser „klassischen“ Aktivierung von Makrophagen mit IFN- γ und LPS sind, wie in dieser Arbeit gezeigt, höhere Konzentrationen an LPS (zwischen 125-1000 ng/mL) oder IFN- γ (250 ng/mL) in der Lage, Makrophagen vollständig zu aktivieren.

7 Ausblick

Makrophagen spielen eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr. Ein wesentlicher Schwerpunkt dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Aktivierung von Alveolarmakrophagen *in vitro*. Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS (125, 250, 1000 ng/mL) bis zu drei Tage stimuliert. Nachfolgend wurden die NO-Spiegel gemessen. Die anschließende Bestimmung der NO-Spiegel zeigte, dass die Stärke der NO-Produktion von der Dosis an LPS abhängig ist. Zusätzlich wurden die Alveolarmakrophagen mit IFN- γ (250 ng/mL) aktiviert. Auch diese Makrophagen waren in der Lage, NO zu bilden.

In weiterführenden Experimenten sollten auf jedenfall die minimalen Konzentrationen an LPS und IFN- γ ermittelt werden, bei der noch eine NO-Produktion möglich ist. Zudem sollte die in Abb. 1.1 gezeigte zweistufige Aktivierung von Alveolarmakrophagen überprüft werden. Möglicherweise reagieren Alveolarmakrophagen empfindlicher auf LPS und IFN- γ als andere Makrophagenpopulationen wie Peritonealmakrophagen. Dies wäre vorstellbar, da sich Alveolarmakrophagen im Alveolarraum der Lunge befinden, wo sie ständig mit Mikroorganismen, Staubpartikeln, Pollen u.s.w. in Kontakt kommen.

8 Zusammenfassung

Makrophagen spielen als Zellen der angeborenen Abwehr eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Ziel dieser Arbeit war die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Alveolarmakrophagen der Ratte.

Hierzu wurden die durch eine bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Alveolarmakrophagen immunhistologisch und durchflusszytometrisch untersucht. Zusätzlich wurden sie *in vitro* mit LPS und IFN- γ stimuliert. Die Produktion von Stickstoffmonoxid wurde mit dem Griess Reagenz bestimmt und die Expression von iNOS im Immunoblot nachgewiesen. Zudem wurde die Interaktion mit naiven T-Lymphozyten untersucht. Als Vergleichszellen wurden Peritonealmakrophagen verwendet.

Bei den aus bronchoalveolären Lavagen gewonnenen Zellen handelte es sich eindeutig um CD68- und CD11b-positive Alveolarmakrophagen. Vollständig aktivierte Alveolarmakrophagen exprimierten zum Teil andere Oberflächenmoleküle als nicht-aktivierte. So stieg nach Stimulierung der Anteil der Makrophagen, die die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimierten, auf ca. 80 Prozent an. Ebenso bildeten sie große Mengen an Stickstoffmonoxid (380 $\mu\text{mol/L}$ NO nach 48 Stunden bei 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS) und exprimierten auch das Enzym iNOS. Die aktivierten Alveolarmakrophagen waren nicht in der Lage, naive T-Lymphozyten zu aktivieren.

Die Stimulierung der Alveolarmakrophagen *in vitro* hat gezeigt, dass LPS und IFN- γ in den getesteten Konzentrationen in der Lage waren, Makrophagen vollständig zu aktivieren. Die zweistufige Aktivierung von Makrophagen durch ein *Priming* mit IFN- γ und eine darauf folgende vollständige Aktivierung mit LPS, ist bei hohen lokalen Konzentrationen auch nur mit LPS bzw. IFN- γ möglich. Dies unterstreicht die besondere Bedeutung der beiden Mediatoren für die Aktivierung von Makrophagen.

9 Literaturverzeichnis

- Adams DO, Hamilton TA. Molecular transductional mechanisms by which IFN- γ and other signals regulate macrophage development. *Immunol Rev* 1987; **97**: 5-27
- Bakker JM, Brough-Holub E, Kroes H, Van Rees EP, Kraal G, Van Iwaarden JF. Functional immaturity of rat alveolar macrophages during postnatal development. *Immunology* 1998; **94**: 304-309
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; **357**(9255): 539-545
- Bingaman AW, Pearson TC, Larsen CP. The role of CD40L in t cell-dependent nitric oxide production by murine macrophages. *Transpl Immunol* 2000; **8**: 195-202
- Chitko-McKown CG, Chapes SK, Brown RE, Phillips RM, McKown RD, Blecha F. Porcine alveolar and pulmonary intravascular macrophages: comparison of immune functions. *J Leukoc Biol* 1991; **50**: 364-372
- Goldstein E, Lippert W, Warschauer D. Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection of the lung. *J Clin Invest* 1974; **54** (3): 519-528
- Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 9-17
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 23-35
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 953-964
- Hamilton TA, Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol Today* 1987; **8**: 151-158
- Haskó G, Pacher P, Deitch EA, Vizi ES. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol Ther* 2006; **113**(2): 264-275
- Hirano S. Nitric oxide-mediated cytotoxic effects of alveolar macrophages on transformed lung epithelial cells are independent of the β_2 integrin-mediated intercellular adhesion. *Immunology* 1998; **93**: 102-108
- Jephthah-Ochola J, Urmston J, Fracas S, Halloran PF. Regulation of MHC expression in vivo. Bacterial lipopolysaccharide induces class I and II MHC

- products in mouse tissues by a T cell-independent, cyclosporine-sensitive mechanism. *J Immunol* 1988; **141**(3): 792-800
- Jesch NK, Dröger M, Enders G, Rieder G, Vogelmeier C, Messer K, Krombach F. Expression of inducible nitric oxide synthases and formation of nitric oxide by alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environ Health Perspect* 1997; **105**: 1297-1300
- Klein J. Immunologie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1991
- Lehnert BE, Valdez YE, Fillak DA, Steinkamp JA, Stewart CC, Flow cytometric characterization of alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 1986; **39**: 285-298
- Lehnert BE. Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung. *Environ Health Perspect* 1992; **97**: 17-46
- Lohmann-Matthes ML, Steinmüller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; **7**: 1678-1689
- MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol* 1997; **15**: 223-350
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; **25**: 677-686
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; **23**: 549-555
- Matuschek A, Ulbrich M, Timm S, Schneider M, Germer C-T, Ulrichs K, Otto C. Analysis of parathyroid graft rejection suggests alloantigen-specific production of nitric oxide by iNOS-positive intragraft macrophages. *Transplant Immunol* 2009; **21**: 183-191
- Morgan DL, Shines CJ. Alveolar macrophage cytotoxicity for normal lung fibroblasts is mediated by nitric oxide release. *Toxicol in Vitro* 2004; **18**: 139-146
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 209-212
- Murdoch C, Lewis CE. Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *Int J Cancer* 2005; **117**: 701-708
- Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology, Taylor & Francis Group, 2008

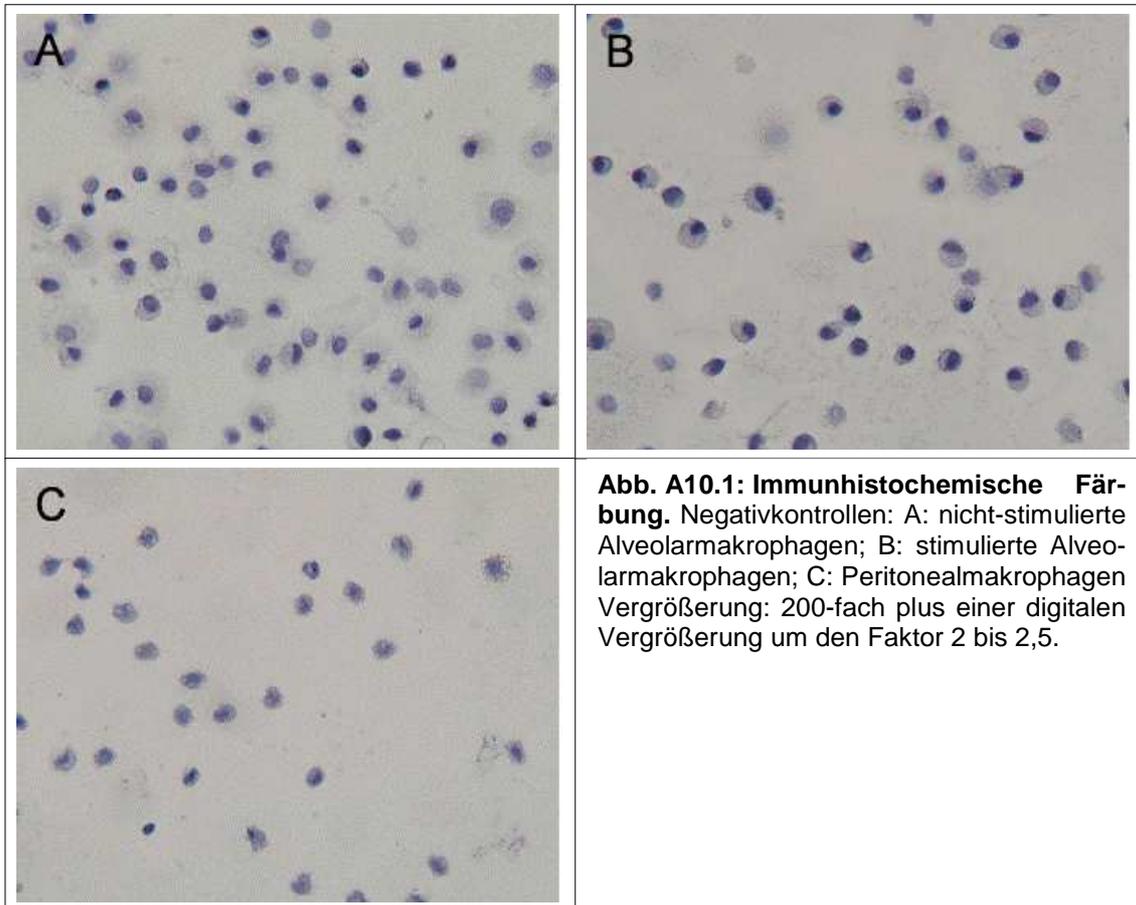
- Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; **3**(1): 65-70)
- Neumann RP. Der Einfluss von Katecholaminen auf die Cytokinproduktion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes in vitro. Inauguraldissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Marburg, 2003
- Prokhorova S, Lavnikova N, Laskin DL. Functional characterization of interstitial macrophages and subpopulations of alveolar macrophages from rat lung. *J Leukoc Biol* 1994; **55**: 141-146
- Ren D, Sun R, Wang S. Role of inducible nitric oxide synthase expressed by alveolar macrophages in High Mobility Group Box 1-induced acute lung injury. *Inflam Res* 2006; **55**: 207-215
- Rutherford MS, Witsell A, Schook LB. Mechanisms generating functionally heterogenous macrophages: chaos revisited. *J Leukoc Biol* 1993; **53**: 602-618
- Schmidt A, Sucke J, Fuchs-Moll G, Freitag P, Hirschburger M, Kaufmann A, Garn H, Padberg W, Grau V. Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ. *J Leukoc Biol* 2007; **81**: 186-194
- Sherman MP, Lehrer RI. Superoxide generation by neonatal and adult rabbit alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 1984; **36**(1): 39-50
- Sone S, Poste G, Fidler IJ. Rat alveolar macrophages are susceptible to activation by free and liposome-encapsulated lymphokines. *J Immunol* 1980; **124**: 2197-2202
- Steinmüller C, Franke-Ullmann G, Lohmann-Matthes ML, Emmendörffer A. Local activation of nonspecific defense against a respiratory model infection by application of interferon- γ . *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; **22**: 481-490
- Ulbrich M. Die Rolle von T-Lymphozyten und Makrophagen bei der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate. Inauguraldissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg, 2007
- Van der Veen RC, Dietlin TA, Gray JD, Gilmore W. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. *Cell Immunol* 2000; **199**: 43-49

10 Appendix

Tabelle A10.1: Überblick über die Isolierung und die Zahl der gewonnenen Zellen (Alveolar- und Peritonealmakrophagen) für die jeweilige Isolierung. MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Alveolarmakrophagen		Peritonealmakrophagen	
Isolierungs-Nr.	Zellzahl pro Isolierung	Isolierungs-Nr.	Zellzahl pro Isolierung
A-1	2,0x10 ⁶	P-1	7,2x10 ⁶
A-2	1,8x10 ⁶	P-2	4,8x10 ⁶
A-3	3,4x10 ⁶	P-3	9,2x10 ⁶
A-4	3,3x10 ⁶	P-4	12,0x10 ⁶
A-5	3,0x10 ⁶	P-5	9,8x10 ⁶
A-6	3,3x10 ⁶	P-6	6,0x10 ⁶
A-7	3,4x10 ⁶	P-7	9,0x10 ⁶
A-8	6,0x10 ⁶	P-8	8,3x10 ⁶
A-9	4,1x10 ⁶	P-9	8,4x10 ⁶
A-10	3,7x10 ⁶	P-11	5,0x10 ⁶
A-11	3,7x10 ⁶	P-12	5,9x10 ⁶
A-12	2,8x10 ⁶	MW	7,8x10 ⁶
A-13	5,4x10 ⁶	SD	2,2x10 ⁶
A-14	3,0x10 ⁶		
A-15	3,3x10 ⁶		
A-16	1,8x10 ⁶		
A-17	2,4x10 ⁶		
A-18	2,7x10 ⁶		
A-19	3,5x10 ⁶		
A-20	2,4x10 ⁶		
A-21	2,8x10 ⁶		
A-22	3,1x10 ⁶		
A-23	1,9x10 ⁶		
A-24	2,5x10 ⁶		
A-25	3,1x10 ⁶		
A-26	2,0x10 ⁶		
A-28	2,5x10 ⁶		
A-29	1,9x10 ⁶		
MW	3,0x10 ⁶		
SD	1,0x10 ⁶		

Abbildung A10.1 zeigt die Negativkontrollen von nicht-stimulierten (A) und mit LPS stimulierten Alveolarmakrophagen (B) sowie von nicht-stimulierten Peritonealmakrophagen (C).



Um die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zu überprüfen, wurden sie an Lymphknotenzellen getestet (Abb. A10.2). Die Lymphknotenzellen lagen in der Durchflusszytometrie als große wenig granuläre Zellen vor. Sie waren nicht positiv für die Makrophagenmarker CD68 und CD11b. Alle untersuchten Zellen waren positiv für den Leukozytenmarker CD45. Sie waren negativ für CD40. Die Lymphknotenzellen bestanden zu ca. 12 Prozent aus B-Lymphozyten (CD45RA). Insgesamt waren ca. 85 Prozent der Zellen positiv für den T-Lymphozytenmarker R73. Sie waren nicht positiv für die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86.

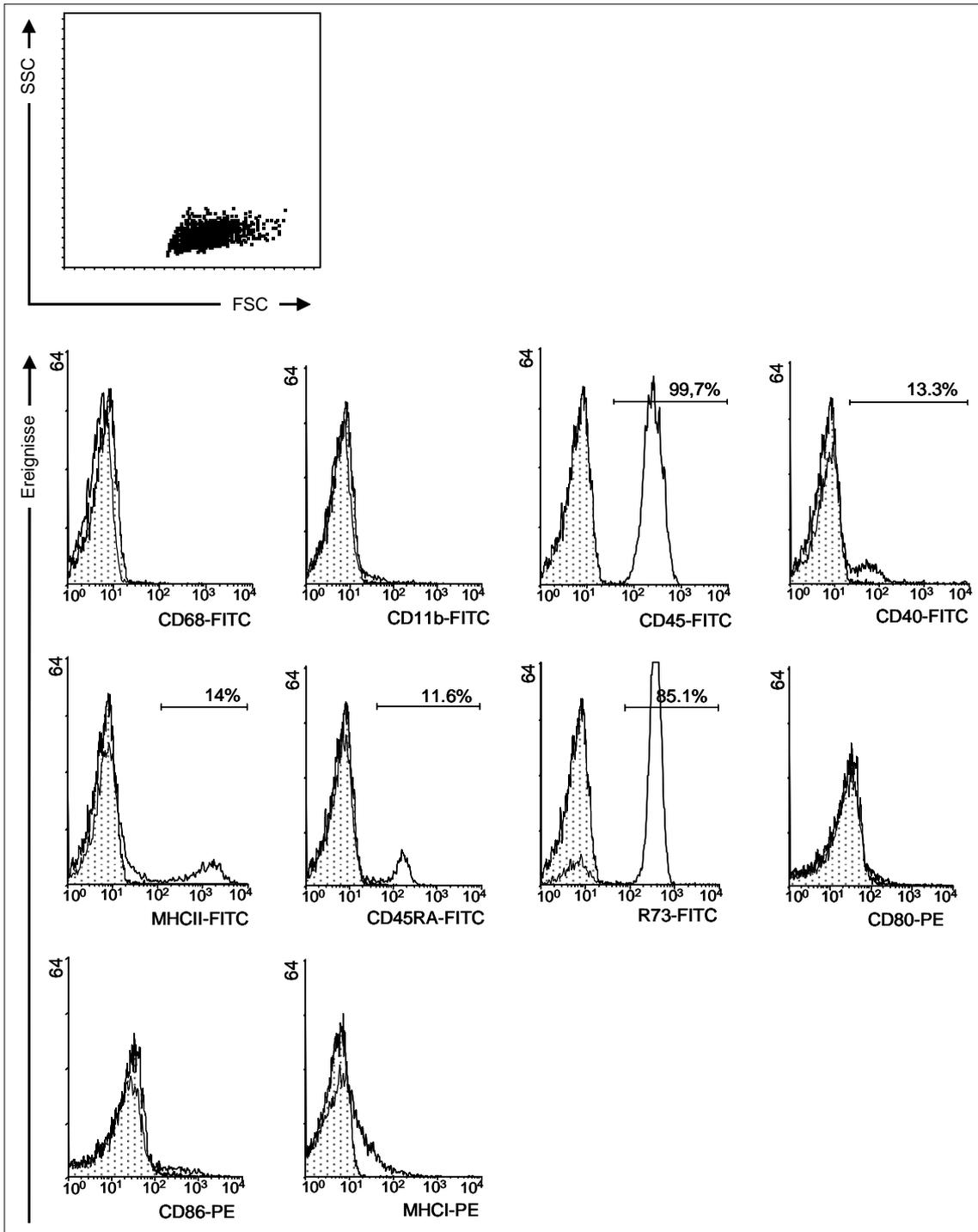


Abb. A10.2: Durchflusszytometrische Charakterisierung frisch isolierter Lymphknoten-zellen.

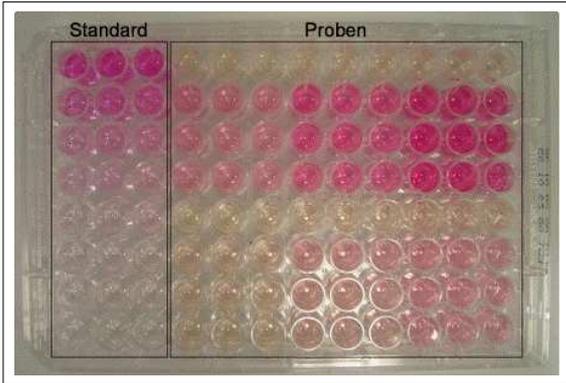


Abb. A10.3: Messfertiger Ansatz zur NO-Bestimmung in einer Flachboden-Mikroplatte mit 96 Vertiefungen.

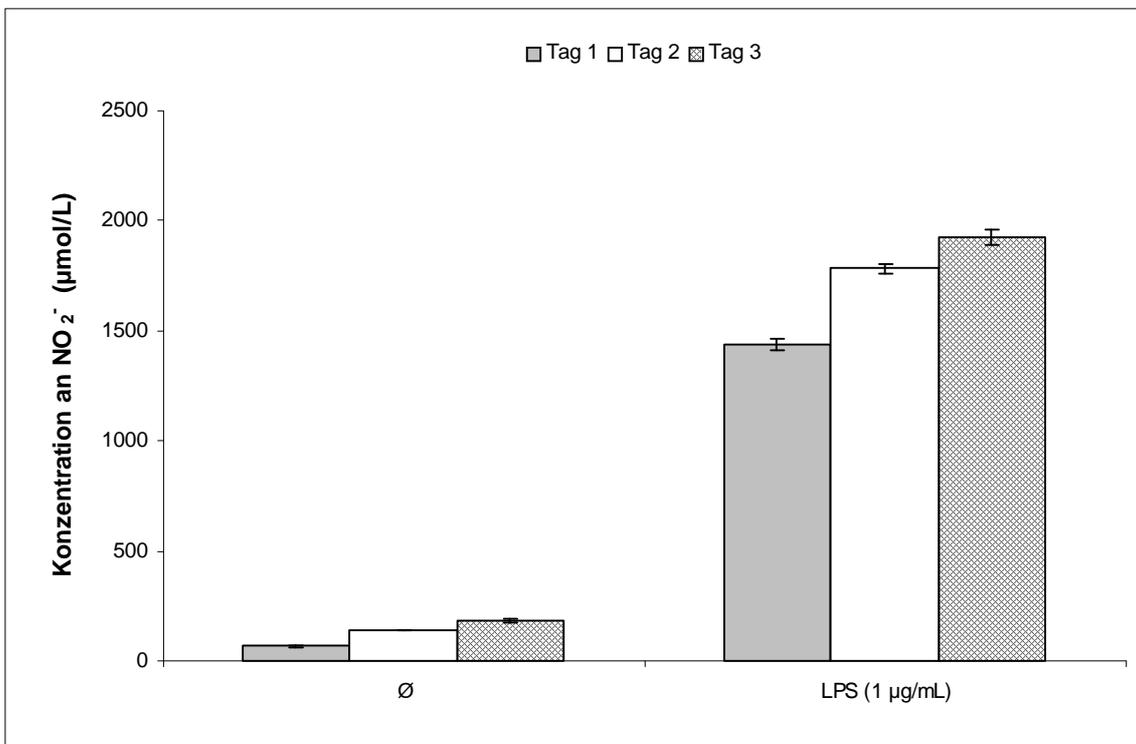


Abb. A10.4: Bestimmung der NO-Produktion aktivierter Alveolarmakrophagen. Alveolarmakrophagen wurden mit LPS (1µg/mL) für drei Tage stimuliert und die NO-Produktion mit dem Griess Reagenz bestimmt.

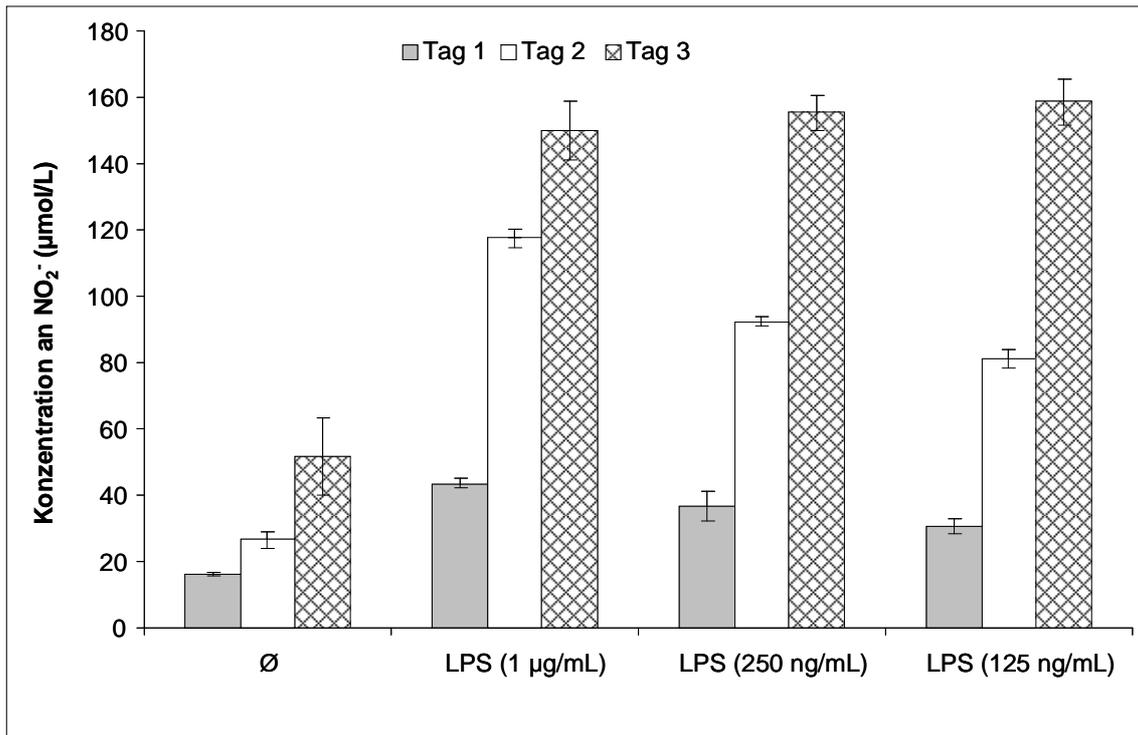


Abb. A10.5: Nachweis der NO-Produktion aktivierter Peritonealmakrophagen. Peritonealmakrophagen wurden mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen (1 µg/mL, 250 ng/mL und 125 ng/mL) für drei Tage stimuliert und die NO-Produktion mit dem Griess Reagenz bestimmt.

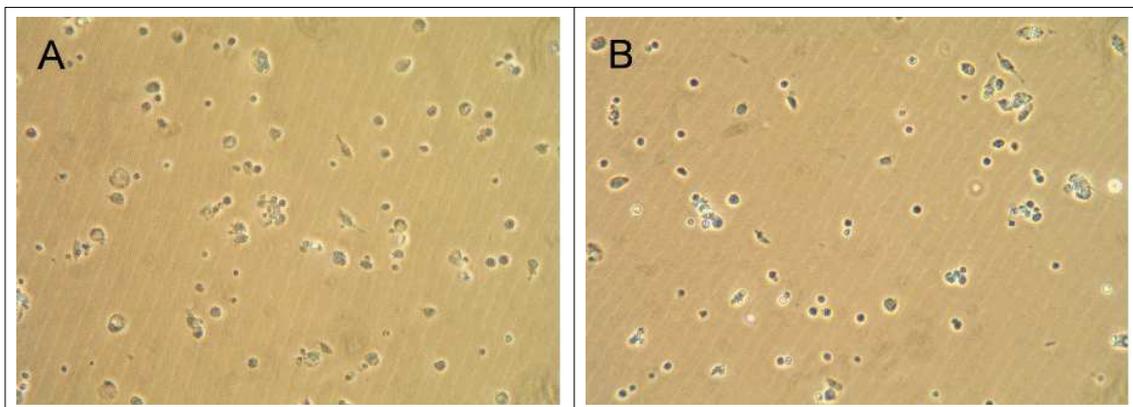


Abb. A10.6: Trypanblau-Färbung stimulierter (A) und nicht-stimulierter (B) Peritonealmakrophagen am Tag 1. Phasenkontrastmikroskopie, Vergrößerung 200-fach.

Übersicht A10.1: Komponenten für das Acrylamidgel

Laufpuffer, pH 8,3: 3,1 g/L Tris ultrapure (AppliChem), 1 g/L SDS (Merck) und 14,4 g/L Glycin (AppliChem) in einem Liter destilliertem Wasser.

Towbin-Puffer/Blotpuffer, pH 8,3: Tris ultrapure (25 mmol/L), Glycin (152 mmol/L) und Methanol (20 Prozent) (Sigma-Aldrich) in destilliertem Wasser (Angaben als Endkonzentration).

TBS („Tris buffered saline“), pH 7,6: 24,2 g/L Tris, 80 g/L NaCl und 38 mL 1 mol/L HCl in einem Liter destilliertem Wasser. Vor Verwendung 1:10 verdünnt.

Polyacrylamid-Gel 12 Prozent: Für zwei Gele wurde ein Endvolumen von 10 mL benötigt. Dies setzte sich aus 3,3 mL destilliertem Wasser, 4 mL 30 Prozent Acrylamid (Roth, Karlsruhe), 2,5 mL 1,5 mol/L Tris ultrapure (pH 8,8), 0,1 mL 10 Prozent SDS, 0,1 mL 10 Prozent Ammoniumpersulfat (Roth) und 4 µL TEMED (Roth) zusammen.

Sammelgel 7,5 Prozent: Für zwei Gele wurden ca. 4 mL benötigt. Dies setzte sich zusammen aus 2,12 mL destilliertem Wasser, 1 mL 30 Prozent Acrylamid, 0,75 mL 0,5 mol/L Tris (pH 6,8), 40 µL 10 Prozent SDS, 40 µL Ammoniumpersulfat und 4 µL TEMED.

Reduction Mix: 132 mmol/L Tris-HCl, pH 6,8, 4,2 Prozent SDS, 10 Prozent β-Mercaptoethanol, 21 Prozent Glycerol und 0,01 Prozent Bromphenolblau (Angaben als Endkonzentration).

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. C.-T. Germer, Direktor der chirurgischen Universitätsklinik, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel der Klinik.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Otto, Leiter der Experimentellen Transplantations-Immunologie, danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen im Forschungsbereich der Chirurgischen Klinik I.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Otto für die Überlassung des Themas und für die zahlreichen Gespräche und Diskussionen, die zum Fortschritt meiner Dissertation beitrugen.

Prof. Dr. med. C.-T. Germer danke ich für die Übernahme des Korreferats. Ebenso gilt mein Dank Manuela Schneider, Bettina Mühling, Dr. Irina Chodnevsckaja, Monika Koospal, Sabine Gahn und Frau L. Stevenson für die vielfältige und überaus freundliche Unterstützung. Danken möchte ich auch Andrea Prappacher, Tierpflegerin in der Experimentellen Transplantationsimmunologie.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anja Matuschek, die mir bei der Fertigstellung der Arbeit in vielfältiger Weise zur Seite stand.

Lebenslauf

Christina Mertens -

Persönliche Angaben

Nationalität	Deutsch
Geburtsdatum	13.09.1983
Geburtsort	Köln, Deutschland
Familienstand	Ledig

Schulausbildung

21. Juni 2003	Abitur am Ursulinengymnasium Köln
---------------	-----------------------------------

Studium

April 2004 – Oktober 2005	Studium der Zahnmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn mit erfolgreicher Absolvierung des Vorphysikums 05. April 2005
November 2005 – Juli 2011	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians Universität Würzburg
14. März 2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2008	Beginn meiner Dissertation in der Experimentellen Transplantationsimmunologie (ETI) an der Universität Würzburg bei Prof. Dr. Otto mit dem Schwerpunkt der Charakterisierung von Alveolarmakrophagen
Juli 2011	Medizinisches Staatsexamen

Berufserfahrung

Oktober 2011	Assistenzärztin in der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim
--------------	--

Praxiserfahrung

August 2003 – Oktober 2003	Krankenpflegepraktikum am Kinderkrankenhaus Köln-Porz
Dezember 2003 – März 2004	Laborpraktikum an der Klinik für Epileptologie in Bonn
Februar 2006 – März 2006	Krankenpflegepraktikum am Krankenhaus Holweide
August 2007 – September 2007	Famulatur in der Unfallchirurgie am Krankenhaus Merheim
Februar 2008 – März 2008	Famulatur in einer hausärztlichen Praxis in Köln
August 2009 – September 2009	Laborfamulatur in Würzburg im Rahmen der Promotion
August 2009	Famulatur in der Neurologie am Krankenhaus Merheim

Praktisches Jahr an der Julius-Maximilians Universität Würzburg

Februar 2010 – Juni 2010	1. Terial: Neurologie (Stroke Unit, neurologische Allgemeinstation, Ambulanz, Intensivstation, Elektrophysiologie)
Juni 2010 – Oktober 2010	2. Terial: Innere Medizin (Kardiologie, hämatoonkologische Ambulanz)
Oktober 2010 – Januar 2011	3. Terial: Chirurgie (Unfallchirurgie, Intermediate Care Station, visceralchirurgische Allgemeinstation)