

Struktur und Entwicklung des Immunsystems der Hühnerlunge

Aus dem Institut für Tieranatomie I
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tieranatomie (I), insbesondere Systematische und
Topographisch-klinische Anatomie
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H.-G. Liebich

und dem

Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
Lehrstuhl für Physiologie
Vorstand: Prof. Dr. M. Stangassinger

Angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. Sven Reese und Prof. Dr. Bernd Kaspers

„Struktur und Entwicklung des Immunsystems der Hühnerlunge“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Grammatia Zengerling
aus Backnang

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Priv.-Doz. Dr. S. Reese

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

αφιερωμένη με αγάπη στους γονείς μου

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	Anatomie der Vogellunge und ihrer Luftsäcke	2
2.1.1	Lunge	2
2.1.2	Luftleitendes System	2
2.1.3	Gasaustauschendes Gewebe	4
2.1.4	Lungen-Luftsack-System	5
2.1.5	Atemmechanik	8
2.2	Das Immunsystem	10
2.2.1	Die angeborene Immunabwehr	12
2.2.1.1	Makrophagen	12
2.2.1.2	Free avian respiratory macrophages (FARMs)	13
2.2.1.3	Dendritische Zellen (DCs)	14
2.2.2	Die adaptive Immunabwehr	15
2.2.2.1	Lymphozyten	15
2.2.2.1.1	B-Lymphozyten	15
2.2.2.1.2	Immunglobuline	15
2.2.2.1.3	T-Lymphozyten	17
	Das Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT)	17
2.2.2.2	Schleimhäute	19
2.2.2.3	Aufbau des Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebes	19
2.2.2.4	Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT) beim Säuger	20
2.2.2.5	Darm-assoziierte lymphatische Gewebe beim Huhn	22
2.2.2.6	Paranasales und paraoculares lymphatisches Gewebe	22
2.2.2.7	Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe beim Säuger	22
2.2.2.8	Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe beim Huhn	24
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Tiere	28
3.2	Histologie	29
3.2.1	Lichtmikroskopie	29
3.2.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten	29
3.2.1.1.1	Material	29
3.2.1.1.2	Durchführung	30
3.2.1.2	Immunhistologie	32
3.2.1.2.1	Material	32

3.2.1.2.2	Agaroseapplikation in die Lunge.....	34
3.2.1.2.3	Organentnahme und Einbettung.....	35
3.2.1.2.4	Anfertigung von Schnitten.....	35
3.2.1.2.5	Einfachfärbung.....	36
3.2.2	Transmissionselektronenmikroskopie.....	38
3.2.2.3	Material.....	38
3.2.2.4	Fixierung und Organentnahme.....	39
3.2.2.5	Einbettung in Kunstharz.....	39
3.2.2.6	Trimmen und Schneiden.....	40
3.2.3	Rasterelektronenmikroskopie.....	40
3.2.3.7	Material.....	40
3.2.3.8	Fixierung und Organentnahme.....	41
3.2.3.9	Durchführung.....	41
4	ERGEBNISSE.....	43
4.1	Altersabhängige Entwicklung des lymphatischen Gewebes in der Hühnerlunge.....	44
4.1.1	Erste Entwicklungsphase (erster bis siebter Lebenstag).....	44
Primärbronchus.....	44	
Parabronchale Wand.....	47	
Interparabronchale Septen und Zwickel.....	50	
4.1.2	Zweite Entwicklungsphase (zweite bis fünfte Lebenswoche).....	54
Primärbronchus.....	54	
Parabronchale Wand.....	58	
Interparabronchale Septen und Zwickel.....	61	
4.1.3	Dritte Entwicklungsphase (sechste bis achte Lebenswoche).....	62
Primärbronchus.....	62	
Parabronchus Wand.....	64	
Interparabronchale Septen und Zwickel.....	64	
4.1.4	Vierte Entwicklungsphase (dreizehnte Lebenswoche).....	67
Primärbronchus.....	67	
Parabronchus Wand.....	68	
Interparabronchale Septen und Zwickel.....	71	
5	DISKUSSION.....	75
5.1	Methoden.....	75
5.1.1	Applikationstechnik der Agarose.....	75
5.1.2	Herstellung von Gefrierschnitten.....	76
5.1.3	Beurteilung der Agarose in der Immunhistologie.....	77
5.2	Ergebnisdiskussion.....	77

5.2.1	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe	77
5.2.2	Ergebnisse des Lungenparenchyms.....	82
5.2.3	Schlussfolgerung.....	85
5.2.4	Klärungsbedarf.....	87
6	ZUSAMMENFASSUNG	88
7	SUMMARY	90
8	LITERATURVERZEICHNIS	92
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	99
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	101
11	PROTOKOLLVERZEICHNIS	104
12	TABELLENVERZEICHNIS.....	104
13	HERSTELLERVERZEICHNIS.....	105
13.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	105
13.2	Geräte in alphabetischer Reihenfolge.....	106

1 Einleitung

In der modernen industriellen Geflügelhaltung sind Verluste durch Infektionskrankheiten ein bedeutender ökonomischer Faktor. Zur Prophylaxe werden sehr gerne Vakzinierungen der Bestände durchgeführt, wobei der Aerosolvakzinierung eine besonders große Bedeutung zukommt. Ein wesentliches Problem in der gezielten Weiter- und Neuentwicklung derartiger Impfstoffe ist, dass nur sehr wenig über das Immunsystem der Hühnerlunge und seiner Entwicklung in den ersten Lebenswochen bekannt ist. Gerade die Mechanismen der lokalen unspezifischen und spezifischen Abwehr im aviären Atmungstrakt sind bisher weitgehend ungeklärt. Dies ist umso verwunderlicher, als die Infektion bei vielen der epidemiologisch bedeutenden aviären Infektionskrankheiten über den Atmungstrakt erfolgt.

Voraussetzung zur Untersuchung des Immunsystems ist die Möglichkeit, die verschiedenen zellulären und humoralen Faktoren des Immunsystems spezifisch unterscheiden zu können. Die zahlreichen für Säugetiere etablierten spezifischen Methoden und Reagenzien sind leider nur zum geringen Teil auf das Huhn übertragbar. Erst in den letzten Jahren wurden zunehmend auch für das Huhn geeignete spezifische Antikörper z. B. zur Differenzierung der verschiedenen Komponenten der zellulären Abwehr entwickelt und damit die Möglichkeiten der Untersuchung des aviären Immunsystems wesentlich verbessert.

Ein Panel an spezifischen Antikörpern gegen die zellulären Komponenten des aviären Immunsystems soll in der vorliegenden Arbeit genutzt werden, um die Struktur und zelluläre Zusammensetzung des Immunsystems der Hühnerlunge und seine Entwicklung in den ersten drei Lebensmonaten zu untersuchen und darzustellen. Die Untersuchungen sollen dabei an einer unter standardisierten Bedingungen gehaltenen SPF-Hühnerlinie durchgeführt werden, um Referenzdaten für zukünftige Untersuchungen an Hühnern, die z. B. unter konventionellen Haltungsbedingungen aufgezogen werden oder einem erhöhten Infektionsdruck ausgesetzt sind, zu erhalten.

2 Literatur

2.1 Anatomie der Vogellunge und ihrer Luftsäcke

2.1.1 Lunge

Die Vogellunge unterscheidet sich wesentlich von der des Säugers. Sie liegt dorsal im Thorax und ist allseitig bis auf geringe Reste mit der Wand der Pleurahöhle verwachsen. Sie wird medial durch die Wirbel, dorsal durch deren Querfortsätze und dorsolateral durch die Rippen und die Interkostalmuskulatur begrenzt. Ventral wird die Pleurahöhle durch das Septum horizontale abgeschlossen, das von der Ventralkante der Wirbelkörper entspringt und sich lateral an den Vertebralrippen anheftet. Die eng benachbarten Rippen hinterlassen an der Dorsal- und Lateralfläche der Lunge tiefe Sulci costales. Durch die tief einschneidenden Rippen und die Verwachsung mit der Pleura kann die Lunge im Cavum pleurae keine Bewegungen ausführen und ist somit volumenkonstant (1).

2.1.2 Luftleitendes System

Die Trachea teilt sich, wie es vom Säuger bekannt ist, in die beiden Primärbronchen, die die Luft den beiden Lungen zuführen. Am Primärbronchus lässt sich eine Pars extrapulmonalis und eine Pars intrapulmonalis unterscheiden. Das weitere Verzweigungsmuster des Bronchialbaums unterscheidet sich wesentlich von dem des Säugers. Der Primärbronchus tritt medioventral in die Lunge ein und durchzieht sie in ihrer gesamten Länge (Abbildung 1). Er steht durch das Ostium abdominale mit dem abdominalen Luftsack in Verbindung. Von der Pars intrapulmonalis gehen vier Gruppen von Sekundärbronchen ab. Als erste Gruppe entspringen 4 Bronchi medioventrales aus der Dorsalwand des Primärbronchus. Es folgen die 7 bis 10 Bronchi mediodorsales (2, 3) und 4 bis 7 Bronchi lateroventrales, deren Abgänge sich gegenüberliegen. Aus der Lateralwand des hinteren Teils des intrapulmonalen Hauptbronchus wird noch eine vierte Gruppe Sekundärbronchen abgegeben, die Bronchi laterodorsales, die sich in den sogenannten Neopulmo verzweigen. Von den einander zugekehrten Flächen dieser Sekundärbronchengruppen nehmen die Parabronchen, auch Lungenpfeifen genannt, ihren Ursprung. Sie vernetzen sich und verbinden Medioventro- und Mediodorsobronchen miteinander (4). In der Vogellunge

besitzen die Trachea, der Primärbronchus und die Anfangsabschnitte der Sekundärbronchen ein zilientragendes Epithel.

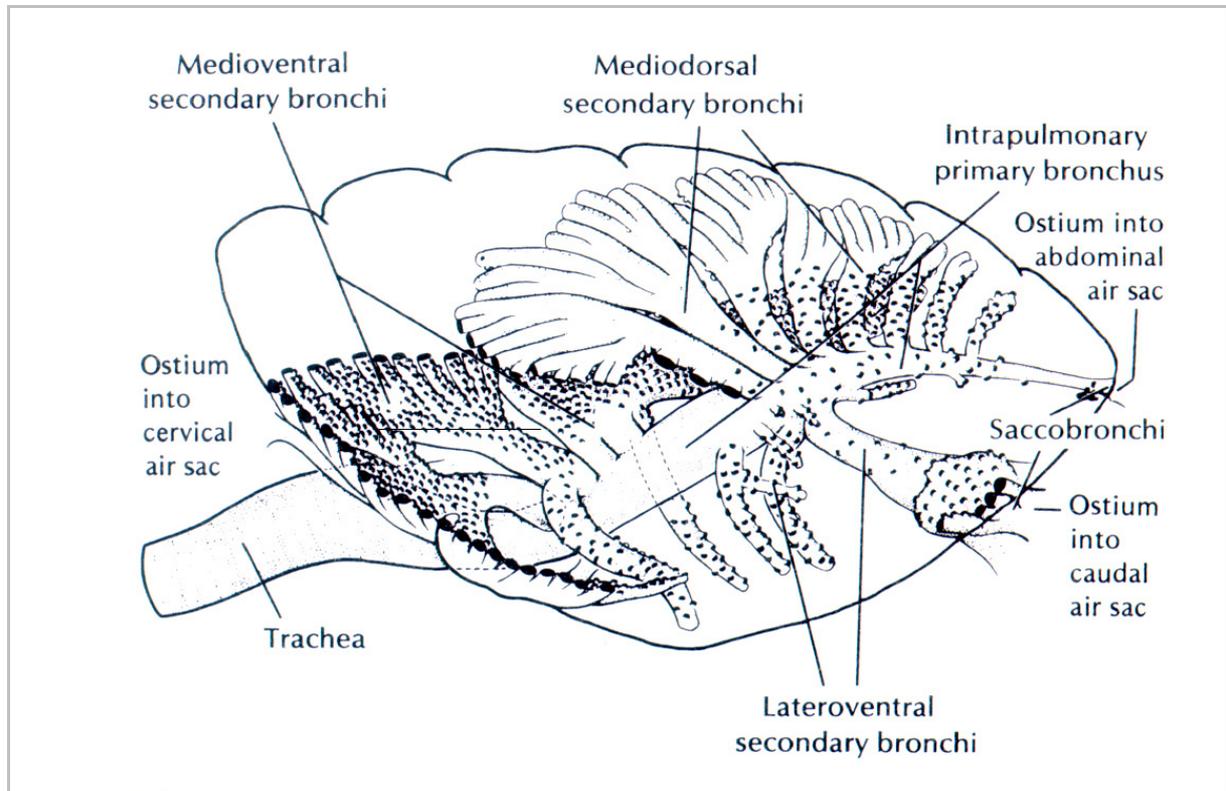


Abbildung 1: Verzweigungsmuster der Sekundärbronchen an der linken Lunge eines Schwanes (1).

Der Primärbronchus und die aus ihm hervorgehenden Bronchi medioventrales, mediodorsales und lateroventrales mit ihren Parabronchen bilden den phylogenetisch älteren Teil der Vogellunge, den Palaeopulmo (5). Das Parabronchennetz des phylogenetisch jüngeren Neopulmo entspringt von den Bronchi laterodorsales, der Basis der Bronchi mediodorsales, dem Primärbronchus und dem unteren Teil des ersten Bronchus medioventralis (5). Im Neopulmo wechselt, im Gegensatz zum Palaeopulmo, die Richtung des Luftstromes mit der Atemphase. Somit kommen in der hochentwickelten Vogellunge die beiden, bereits von Salt und Zeuthen 1960 (6) diskutierten Weisen der Belüftung vor: Die unidirektionale und die bidirektionale Ventilation. Die Ursache der unidirektionalen Ventilation des Palaeopulmo wird kontrovers diskutiert. Bereits *Hazelhoff* (7) stellte die Vermutung auf, dass auf Grund der Anordnung der Abgangswinkel und der Querschnittsverhältnisse der Vento- und Dorsobronchen besondere strömungsdynamische Bedingungen herrschen müssen. Dabei soll sowohl bei der

Inspiration als auch bei der Expiration die Luft in die Mediodorsobronchen eintreten, in einer Richtung durch die Parabronchen hindurchstreichen und durch die Medioventrobronchen wieder austreten (1).

2.1.3 Gasaustauschendes Gewebe

Die Parabronchen sind rundherum mit Luftkapillaren besetzt, in denen der Gasaustausch stattfindet. Sie zeigen einen regelmäßig hexagonalen Bau und werden voneinander durch Bindegewebslagen getrennt, in denen die versorgenden Gefäße liegen (Abbildung 2) (8). Ein meist regelmäßig sechseckiger Bau der Parabronchen zeigt, dass sie in einer optimal dichten Packung angeordnet sind (Abbildung 3). Dem runden Lumen des Parabronchus folgen peripher große und tiefe Räume, die von Duncker als Atrien bezeichnet wurden (8). Die einzelnen Atrien werden durch sehr dünne Septen voneinander getrennt. Folgt man den Atrien weiter in die Peripherie, so gelangt man in die Infundibula, von denen wiederum die Luftkapillaren entlassen werden. Sie verbinden sich untereinander in allen Richtungen und bilden so ein dichtes Netzwerk. Das ähnlich ausgebildete Netzwerk der Blutkapillaren ist mit dem der Luftkapillaren sehr innig verwoben (8).

Vergleicht man die Dichte des gasaustauschenden Gewebes des Huhnes mit der eines Säugetieres, so fällt auf, dass der Vogel den Säuger weit übertrifft. Die Dichte des gasaustauschenden Gewebes (=Oberfläche der Blut-Gas-Barriere pro Volumeneinheit gasaustauschenden Gewebes) liegt beim Haushuhn, *Gallus gallus f. domestica*, bei $179.5 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ (9), dagegen beträgt die des Säugers lediglich ein Zehntel hiervon (10). Die Blut-Gas-Barriere des Huhnes wird wie beim Säuger vom Endothel, der Basalmembran und den Epithelzellen gebildet. Die Dicke dieser Barriere ist beim Haushuhn jedoch deutlich niedriger als die eines Säugetieres entsprechender Körpermasse.

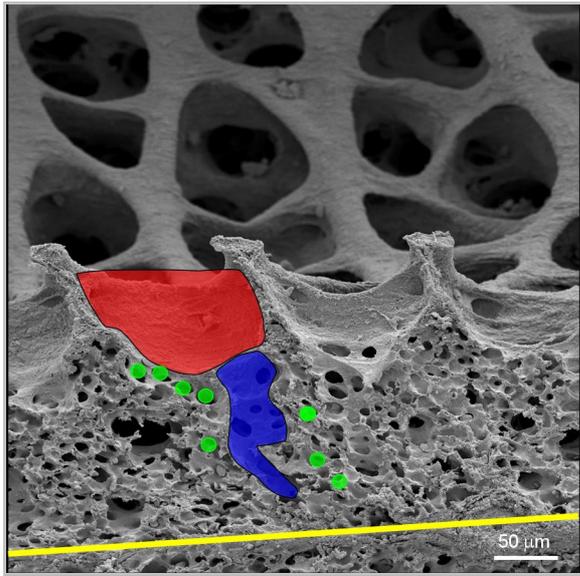


Abbildung 2: Längsschnitt durch einen Parabronchus.

Parabronchuswand: Atrium (rot), Infundibulum (blau), Luftkapillaren (grün). Zwischen zwei benachbarten Parabronchen liegt das interparabronchiale Septum (gelb).

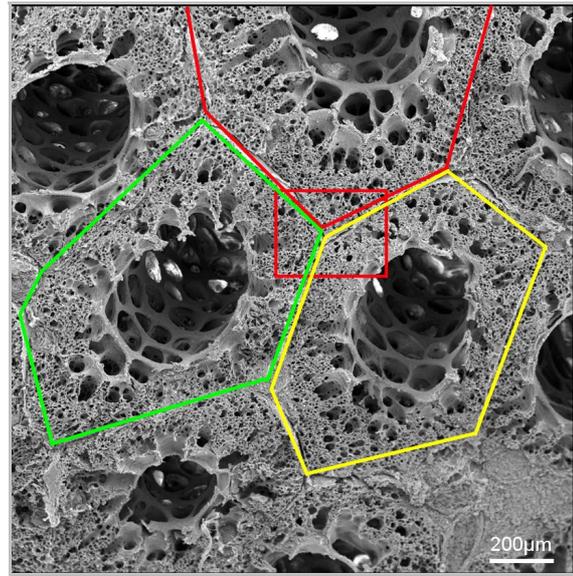


Abbildung 3: Querschnitt durch mehrere Parabronchen.

Die typische hexagonale Form der Parabronche ist farblich hervorgehoben. Benachbarte Parabronchen treffen unter Bildung eines Zwickels zusammen (rotes Rechteck).

2.1.4 Lungen-Luftsack-System

Das Lungen-Luftsack-System der Vögel ist nicht nur der komplizierteste, sondern auch der effizienteste Atmungsapparat, der in der Wirbeltierreihe entwickelt worden ist. Die Lungen werden in ihrem Volumen bei der Atmung praktisch nicht verändert. Der Belüftung dienen die blasebalgartig funktionierenden Luftsäcke, die an die Primärbronchen angeschlossen sind. Hierbei handelt es sich um passiv dehnbare, sehr dünnwandige Gebilde. Ihre Wand besteht aus Bindegewebe, das elastische Elemente sowie glatte Muskelzellen enthält und durch ein einschichtiges Plattenepithel ausgekleidet wird. Sie liegen kranial und ventral der Lunge und sind kaudal der Lunge dorsal und teilweise zwischen den Eingeweiden wieder zu finden. Durch die Atembewegungen wird ihr Füllungszustand verändert und sie ventilieren dadurch wie Blasebälge die volumenkonstante Lunge. In der Embryonalentwicklung wachsen aus der Lunge die Anlagen der Luftsäcke in das ventral der Lunge gelegene und mit ihr verwachsene Septum postpulmonale ein. Dabei wird das Septum in zwei Anteile gespalten. Der dorsale Teil bleibt als Septum horizontale ventral der Lunge liegen und der ventral sich abgespaltene Teil wird zum Septum verticale. Beide Septen nehmen ihren Ursprung an der Crista ventralis der

Brustwirbel und ziehen zur Brustwand. Dabei setzt das Septum horizontale auf Höhe der Interkostalgelenke und das Septum obliquum am Lateralrand des Brustbeins an. Der Raum zwischen den beiden Septen und der seitlichen Brustwand wird als Cavum subpulmonale bezeichnet. Sein kranialer Abschnitt wird vom thorakalen Luftsack, Saccus thoracicus cranialis, und der kaudale vom hinteren thorakalen Luftsack, Saccus thoracicus caudalis, ausgefüllt. Die Wände dieser beiden Luftsäcke verwachsen vollständig mit denen des Cavum subpulmonale, so dass nur noch eine dünne Membran ihre Grenze bildet (11).

Der kaudal der Lungen gelegene Teil des primären Septum postpulmonale steigt senkrecht dorsal zur Wirbelsäule auf und bleibt einheitlich. Durch diesen Teil bricht der Primärbronchus in die Peritonealhöhle durch und entfaltet sich in ihr zum großen abdominalen Luftsack, Saccus abdominalis (Abbildung 4). Alle Luftsäcke sind bis auf den Saccus clavicularis paarig ausgebildet.

Funktionell lassen sie sich in eine vordere und in eine hintere Luftsackgruppe einteilen. Die vordere Luftsackgruppe besteht aus dem paarigen Saccus cervicalis, dem paarigen Saccus thoracalis cranialis und dem unpaaren Saccus clavicularis (Abbildung 5). Alle Luftsäcke dieser Gruppe finden über die Medioventrobronchen Anschluss an das luftleitende System der Hühnerlunge. Die hintere Luftsackgruppe wird vom paarigen Saccus thoracalis caudalis und dem paarigen Saccus abdominalis gebildet. Erstgenannter ist über den ersten Bronchus ventrolateralis und der abdominale Luftsack über den Primärbronchus direkt an das luftleitende System angeschlossen (5).

Kranial des Perikards dehnen sich der Schlüsselbeinluftsack, Saccus clavicularis, und der Halsluftsack, Saccus cervicalis, aus. Sie ragen weit kranial bis in die Knochen des Schultergürtels und des unteren Halsbereiches hinein, wobei die beidseitige Anlage des Schlüsselbeinluftsacks zu einem unpaaren Luftsack verschmilzt.

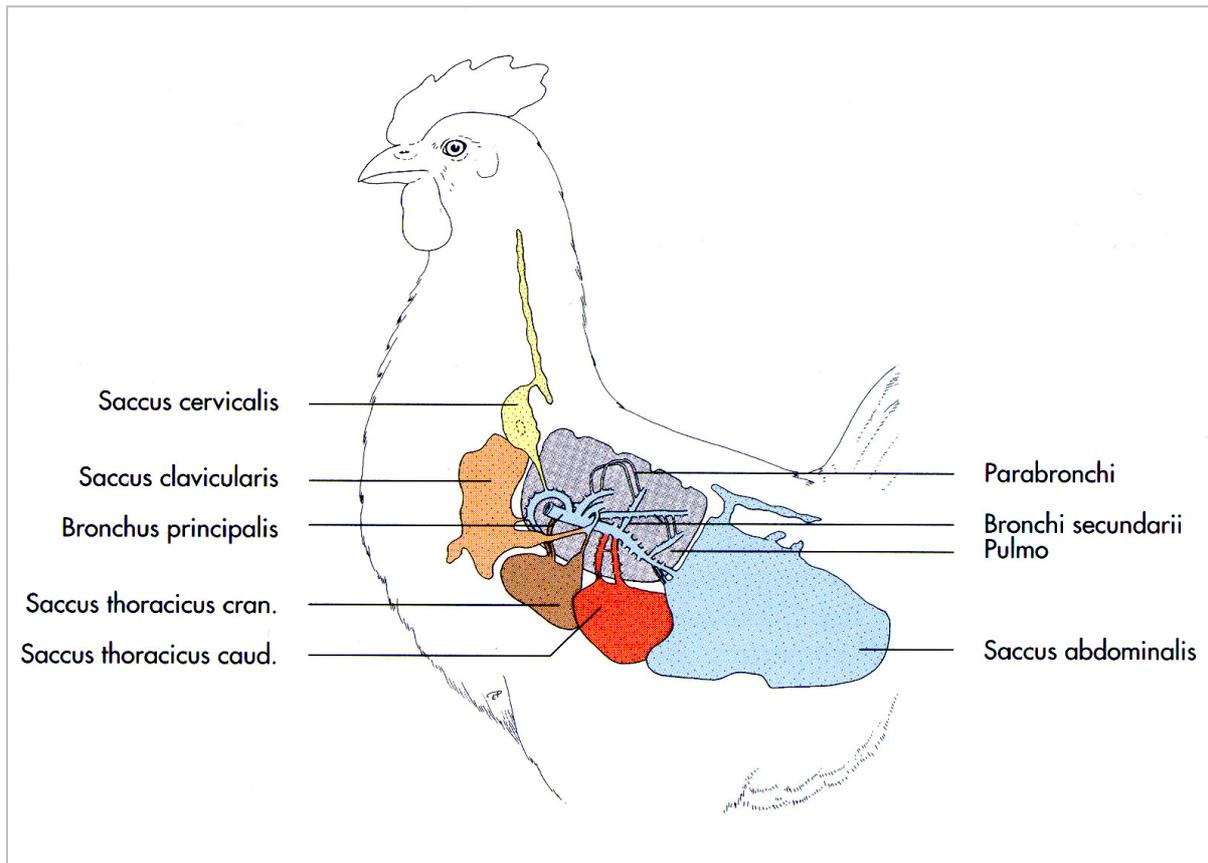


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Lungen-Luftsack-Systems (12).

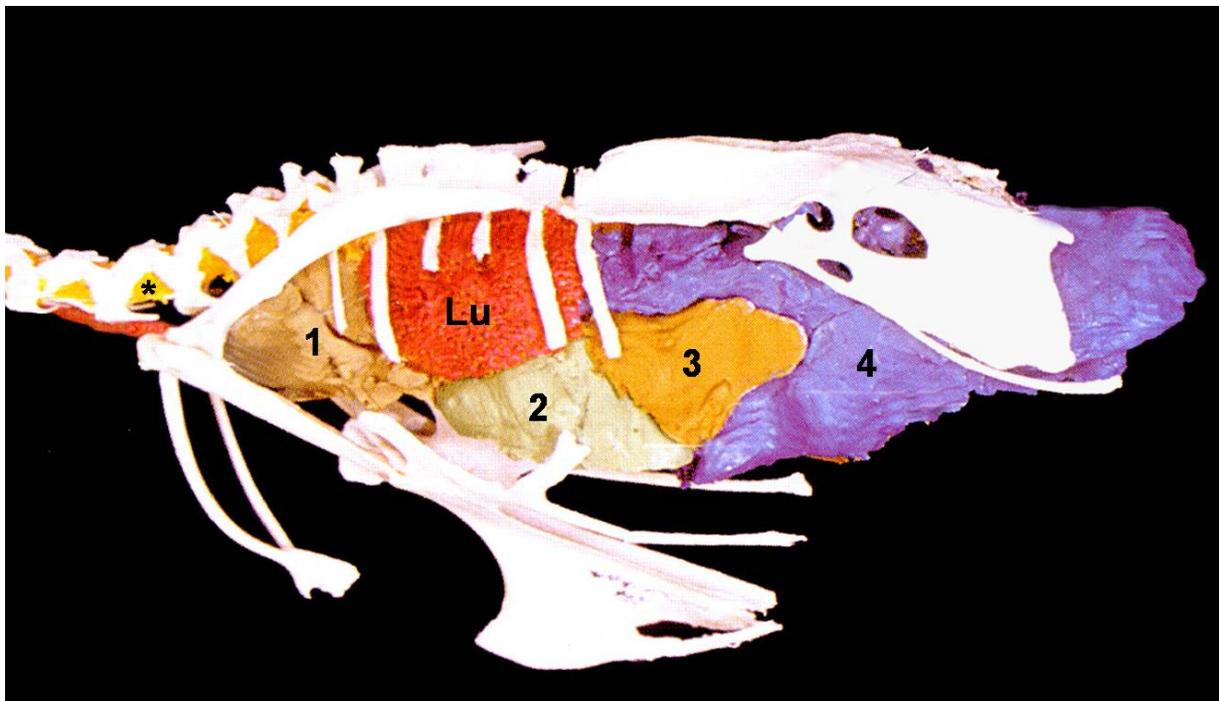


Abbildung 5: Ausgusspräparat des Lungen-Luftsack-Systems (12).

Lunge (Lu), Schlüsselbein- (1), kranialer Thorakal- (2), kaudaler Thorakal- (3), Abdominal- (4), und Halsluftsack (*)

2.1.5 Atemmechanik

Während der Atmung verändern sich die Volumina der Luftsäcke, wodurch sie in ihrer Funktion einem Blasebalg ähneln. Für das Verständnis der Atemmechanik ist es an dieser Stelle wichtig zu erwähnen, dass den Vögeln im Gegensatz zu den Säugetieren ein Zwerchfell fehlt. Die Inspirationsbewegung kann nur durch das Zusammenspiel der Interkostalmuskulatur und der Mm. levatores costarum durchgeführt werden. Dabei werden der Thorax und somit der Thorakoabdominalraum und passiv auch die Luftsäcke erweitert (Abbildung 6). Die Expiration erfolgt vor allem durch die Kontraktion der Bauchmuskulatur und ist bei den Vögeln stets aktiv (11).

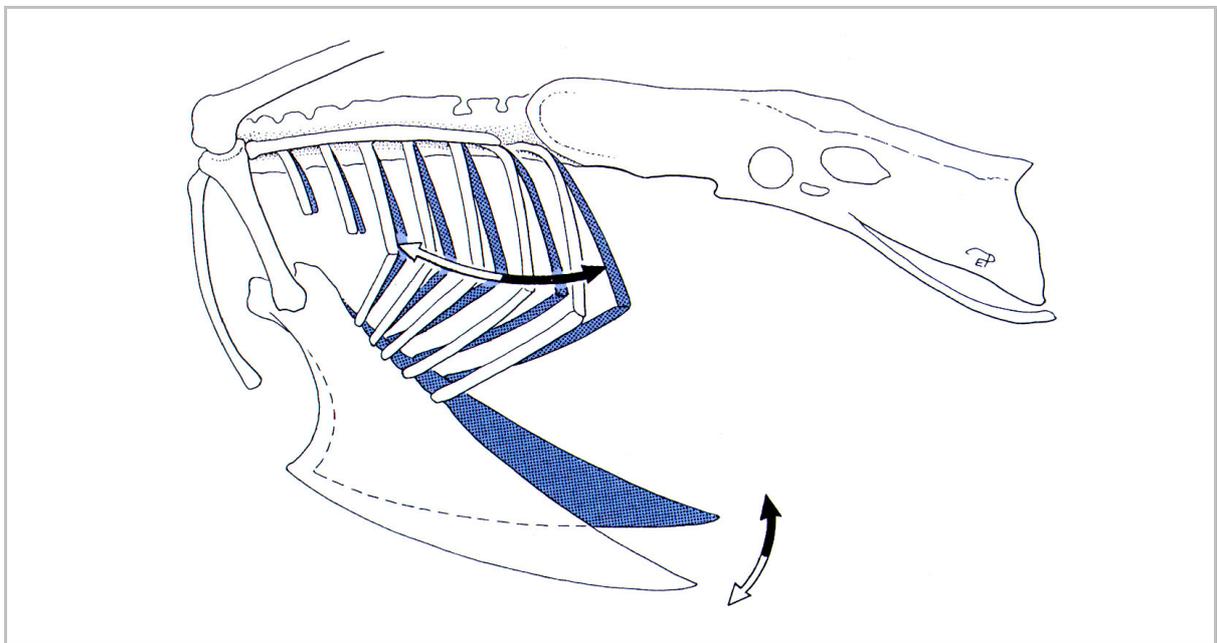


Abbildung 6: Inspirations- (weiß) und Expirationsstellung (blau) von Rippen und Sternum (12).

Während der Inspiration strömt die frische Luft über den Primärbronchus einerseits in die hintere Luftsackgruppe, andererseits gelangt sie unter Umgehung der Medioventrobronchen in die Mediodorso- und die Lateroventrobronchen zu den Parabronchen und durchstreicht somit das gasaustauschende Gewebe. Gleichzeitig strömt in die ebenfalls erweiterten vorderen Luftsäcke verbrauchte Luft aus den Medioventrobronchen ein (Abbildung 7) (3). In der Expirationsphase werden die Luftsäcke komprimiert und die darin enthaltene Luft ausgepresst. Dadurch gelangt die gespeicherte Frischluft aus den abdominalen Luftsäcken, wie zuvor beschrieben, über die Mediodorso- und Lateroventrobronchen in die Parabronchen. Die

verbrauchte Luft aus der Lunge gelangt gemeinsam mit der verbrauchten Luft aus der vorderen Luftsackgruppe über die Medioventrobronchen in den Primärbronchus und wird abgeatmet (11).

Es wurden viele Vermutungen aufgestellt und Untersuchungen durchgeführt, die den unidirektionalen Luftfluss erklären sollten. Frühe Untersucher wie *Vos* (13), *Dotterweich* (14, 15), *Brandes* (16) und *Bethe* (17) postulierten, dass mechanische bzw. anatomische Klappen (Sphincteren), die sich zyklisch öffnen und schließen, verantwortlich für den unidirektionalen Fluss seien. Spätere Untersuchungen von *King & Payne* (18), *Duncker* (1), *Scheid, Slama & Piiper* (19) und *Jones, Effmann & Schnidt-Nielsen* (20) konnten jedoch solche Klappen in der Vogellunge nicht nachweisen.

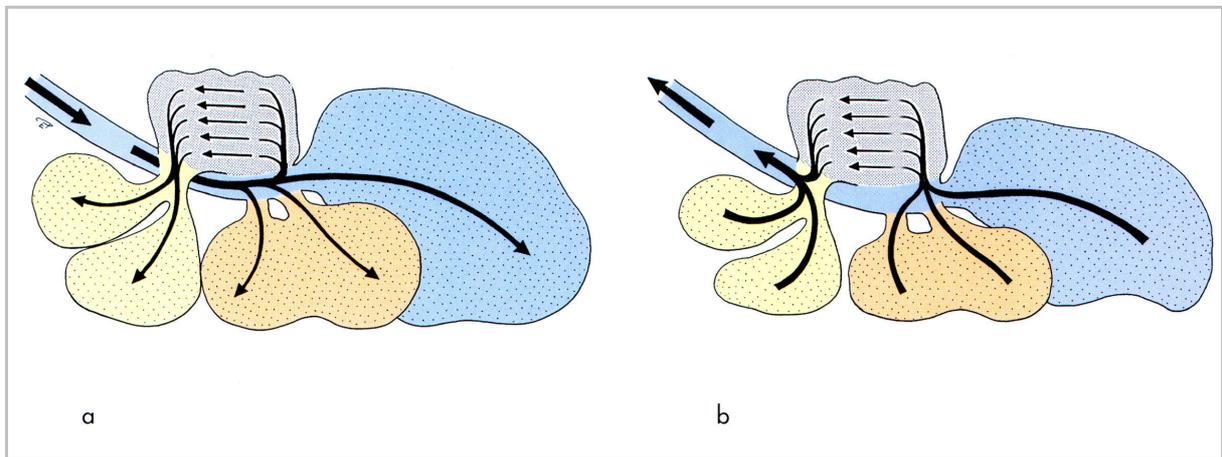


Abbildung 7: Schema des unidirektionalen Luftstromes durch die Lunge während der Inspiration und Expiration (12).

a) Zeigt den Luftstrom in der Inspirationsphase und b) die Verhältnisse während der Expiration. Schlüsselbein- und Halsluftsack (gelb) bilden die vordere Luftsackgruppe, kranialer bzw. kaudaler Brustluftsack (orange) und abdominaler Luftsack (blau) die hintere Luftsackgruppe.

Dotterweich vermutete bereits im Jahre 1930 und später auch *Hazelhoff* (7), dass Anordnung, Abgangswinkel und Querschnittsverhältnisse der Medioventro- und Mediodorsobronchen diese besonderen strömungsdynamischen Bedingungen ergeben. Nachfolgende Untersuchungen von *Dotterweich* (21) lassen ihn die Theorie der Ventile eher unwahrscheinlich erscheinen. Jüngere Untersuchungen hingegen von *Banzett et al.*, *Butler et al.* und *Wang et al.* (22-25) weisen auf eine Verengung des Primärbronchus auf Höhe der Medioventrobronchen-Abgänge hin, die den unidirektionalen Fluss erklären kann. Dabei soll die eingeatmete Luft an der Engstelle beschleunigt werden und so an den Öffnungen der Medioventrobronchen vorbeistreichen. *Banzett et al.* (22, 23) und *Wang et al.* (25) nannten diesen Vorgang

„inspiratory aerodynamic valving“ (IAV). Wang *et al.* (26) beschreiben in ihrer Arbeit eine solche Verengung des Primärbronchus kurz vor dem Abgang des ersten Medioventrobronchus bei der Gans (*Anser anser*) (Abbildung 8). Auf Grund der vermuteten Funktion nannten sie diese Struktur „segmentum accelerans“ (Beschleunigungssegment).

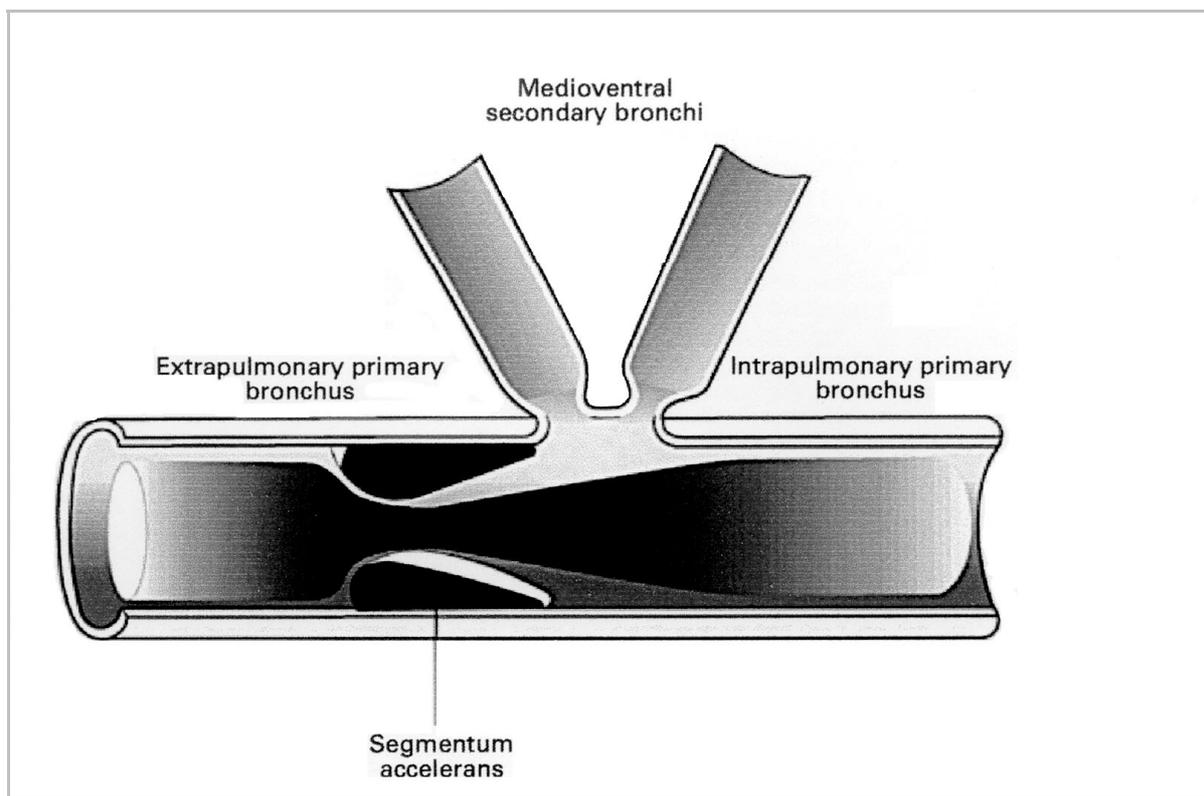


Abbildung 8: Schema des Primärbronchus mit seinem extra- und intrapulmonalen Anteil und den Abgängen der Medioventrobronchen kurz nach seinem Eintritt in die Lunge (26).

Das Beschleunigungssegment ist den Abgängen der Medioventrobronchen direkt vorgelagert. Die eingeatmete Luft wird durch das sich verengende Lumen beschleunigt und an den Medioventrobronchen vorbei geleitet.

Beim Haushuhn (*Gallus gallus f. domestica*) konnte von Maina & Africa (27) eine epitheliale Schwellung an der gleichen Stelle beobachtet werden, die, ähnlich dem „segmentum accelerans“ von Banzett und Wang, den Luftfluss in der Hühnerlunge erklären soll.

2.2 Das Immunsystem

Täglich sind Mensch und Tier von Krankheitserregern umgeben, die ein potenzielles Risiko für ihre Gesundheit darstellen. Dringt ein Pathogen ein, so wird dieses sofort durch die angeborenen (unspezifischen) Abwehrmechanismen bekämpft. Gelingt es

dem Erreger, die angeborene Abwehr zu umgehen, so tritt die adaptive (spezifische) Immunabwehr in Kraft. Beide Systeme sind nicht voneinander zu trennen und ergänzen sich in hervorragender Art und Weise. Sie sind wie ein Uhrwerk ineinander verzahnt und können nur gemeinsam einen optimalen Schutz für Mensch und Tier gewährleisten.

Beide Abwehrsysteme bestehen aus zwei Komponenten. Einerseits den Zellen des jeweiligen Systems, als zelluläre Abwehr bezeichnet und andererseits den Bestandteilen, die im Plasma gelöst sind. Da die Körperflüssigkeiten früher als Humores (Säfte) bezeichnet wurden, spricht man auch von der humoralen Immunität. Die zelluläre adaptive Immunität wird von den B- und T-Zellen getragen und die von den Plasmazellen gebildeten Antikörper (=Immunglobuline) vermitteln die humorale adaptive Immunität. Bei der angeborenen Immunabwehr bilden die Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen den zellulären Bestandteil. Die humorale angeborene Immunität wird unter anderem von den Interferonen (IFN), dem Komplementsystem und dem von Alexander Fleming im Jahre 1929 entdeckten unspezifischen Lysozym gebildet (28). Die Zellen der spezifischen und unspezifischen Abwehr nehmen ihren Ursprung im Knochenmark. B-Zellen und Phagozyten reifen beim Säugetier im Knochenmark heran, die T-Zellen hingegen wandern in den Thymus aus, um hier ihre Reifung zu vollziehen. Nach Abschluss der Reifung gelangen beide Typen von Lymphozyten ins Blut, von wo aus sie in die peripheren lymphatischen Organe - Lymphknoten, Milz und das lymphatische Gewebe der Schleimhäute einwandern.

Man kann das Immunsystem als ein Organ ansehen, das über den ganzen Körper verteilt ist und den Wirt gegen Pathogene verteidigt, wo auch immer diese eindringen oder sich ausbreiten. Innerhalb des Immunsystems existieren unterschiedliche anatomische Kompartimente, von denen jedes einzelne eine gezielte Reaktion gegen Pathogene hervorrufen kann, die in diesem speziellen Bereich des Körpergewebes vorhanden sind. Eines dieser Kompartimente bilden die peripheren Lymphknoten und die Milz. Dieses Kompartiment reagiert auf Antigene, die Gewebe befallen haben oder sich im Blut ausbreiten. Ein weiteres Kompartiment des adaptiven Immunsystems befindet sich nahe der Oberfläche. Es handelt sich um das Immunsystem der Schleimhaut, auch als *Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (Tissue)* bezeichnet oder kurz MALT genannt. Zwei weitere Anteile bilden die serösen Häute der Körperhöhlen (Pleura und Peritoneum) und die Haut (29).

2.2.1 Die angeborene Immunabwehr

2.2.1.1 Makrophagen

Makrophagen gehören gemeinsam mit den dendritischen Zellen und den B-Lymphozyten zu den drei antigenpräsentierenden Zelltypen des Immunsystems. Sie kommen in fast allen Körpergeweben vor und spielen bei der angeborenen Immunabwehr eine essentielle Rolle. Sie entwickeln sich aus einer myeloiden Vorläuferzelle, von der aus sich Monozyten differenzieren, die ins Blut gelangen und hier zirkulieren. Erst wenn sie ins Gewebe auswandern, differenzieren sie sich weiter zu Makrophagen. Im Gewebe warten diese Zellen auf Pathogene, die sie mit Hilfe von Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche erkennen. Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem der Makrophagen-Mannoserezeptor (30), die Scavenger-Rezeptoren, die Gruppe der Toll-like Rezeptoren (TLR) (31) sowie die Komplementrezeptoren. Über diese Rezeptoren wird der Makrophage aktiviert und beginnt einerseits mit der Phagozytose, andererseits mit der Produktion verschiedener Cytokine, wie IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-12 (32). Cytokine sind Proteine, die durch die Bindung an spezifische Rezeptoren Reaktionen auslösen und somit als interzelluläre Botenstoffe wirken. Sie induzieren eine lokale Entzündung und ermöglichen so Effektorzellen und löslichen Substanzen, wie den Komplementkomponenten und den Immunglobulinen, das Eindringen in das Gewebe. Neben diesen lokalen Effekten haben einige dieser Cytokine (TNF- α , IL-1, IL-6) die Fähigkeit, als sogenannte endogene Pyrogene zu wirken. Das bedeutet, sie sind in der Lage, zentral Fieber auszulösen, was zur Folge hat, dass das Temperaturoptimum für das Bakterienwachstum überschritten wird. Gleichzeitig ist die adaptive Immunantwort bei höheren Temperaturen intensiver (28). TNF- α ist in der Lage, die Wanderung der dendritischen Zellen aus der Peripherie zu den lymphatischen Organen zu stimulieren und somit eine hoch potente antigenpräsentierende Zelle zu unterstützen (33) (34).

Ein weiterer Zelltyp der angeborenen Immunantwort, der durch die Cytokine der Makrophagen aktiviert wird, ist die natürliche Killerzelle (NK-Zelle) (35, 36). Der Tötungsmechanismus der NK-Zellen ist derselbe, wie der von cytotoxischen T-Zellen. Hierbei werden an der Oberfläche der gebundenen Zielzelle cytotoxische Granula freigesetzt. Die darin enthaltenen Effektorproteine durchdringen die Membran der Zielzelle und leiten eine Apoptose ein. Wie bereits erwähnt, liegen die Gewebsmakrophagen in den verschiedensten Geweben bereit zur Antigenaufnahme.

In besonders großer Zahl findet man sie beispielsweise in der Leber als Kupffer-Zellen, in der Milz, wo sie gealterte Blutzellen beseitigen und in der Lunge als Alveolarmakrophagen.

Die anatomischen und funktionellen Unterschiede der Hühnerlunge zum Säuger bringen auch hinsichtlich der Lokalisation von Zellen der unspezifischen Abwehr deutliche Unterschiede mit sich.

2.2.1.2 Free avian respiratory macrophages (FARMs)

Die große Oberfläche und die dünne Blut-Gas-Barriere der Vogellunge machen diese zum wirksamsten Atmungsapparat in der Wirbeltierreihe. Gleichzeitig aber bieten diese Gegebenheiten Umwelttoxinen und pathogenen Mikroorganismen mehr Angriffsmöglichkeiten. Vom Säugetier weiß man, dass nach Antigenkontakt die erste entscheidende zelluläre Abwehr durch die Alveolarmakrophagen erfolgt. Da die Vogellunge keine Alveolen besitzt, wird das Äquivalent beim Geflügel als *free (surface) avian respiratory macrophages* (FARMs) bezeichnet. Einigen Untersuchern, wie *Ficken et al.* (37), *Toth & Siegel* (38), *Toth et al.* (39), *Maina & Cowley* (40) gelang es, mittels Lavage Makrophagen aus der Lunge zu gewinnen und zu quantifizieren. *Stearns et al.* (41) hingegen konnten keine FARMs gewinnen. *Lorz & López* berichten, dass „avian respiratory macrophages“ nur im subepithelialen Bindegewebe zu finden waren und niemals an der luminalen Oberfläche des Atrien- oder Parabronchenepithels beobachtet werden konnten (42). Andere Gruppen wiederum haben versucht, mittels Lichtmikroskopie mononukleäre Phagozyten nachzuweisen und zu lokalisieren. Sie berichten von FARMs auf der Oberfläche der Vogellunge. Bei Säugetieren, wie Mäusen, Ratten und Meerschweinchen, können durch Lungenlavage jeweils $0,55-1,55 \times 10^6$, $2,86-4,43 \times 10^6$ und $1,08-1,77 \times 10^7$ Alveolarmakrophagen gewonnen werden. Diese Werte sind annähernd 20mal höher als die des wesentlich größeren Huhnes. Die Zahl der gewonnenen FARMs aus Untersuchungen des Haushuhns von *Toth & Siegel* (38) liegt bei $2,5 \times 10^5$. *Maina & Cowley* (40) konnten ähnlich niedrige Ergebnisse für die Taube ermitteln, bei der die Anzahl der Makrophagen nur $1,6 \times 10^5$ ausmachte. Untersuchungen beim Menschen sind von *Hof et al.* (43) durchgeführt worden, wobei vergleichend Nichtraucher und Raucher untersucht wurden. Die Werte der Raucher sind mit $5,2 \times 10^7$ gegenüber den Nichtrauchern mit $1,5 \times 10^7$ deutlich höher. *Toth et al.* (44) postulieren, dass die „Knappheit der FARMs in der Vogellunge auf einen Abwehrmangel des Atmungsapparates des Geflügels gegenüber Bakterien, sowie Mykoplasmen, Pilzen

und Viren hinweist, die die Hauptursache einer Pneumonie und Aerosacculitis sind“. Große wirtschaftliche Schäden in der Geflügelindustrie werden von Lungenerkrankungen verursacht, wie *Mensah & Brain* (45), *Ficken et al.* (37) und *Klika et al.* (46) berichten. Dabei soll die hohe Mortalität mit der geringen Anzahl an FARMs korrelieren, wofür es aber keine wissenschaftlichen Belege gibt. Die niedrige Zahl an FARMs kann einerseits eine Abwehrschwäche in vorderster Front des Atmungsapparates bedeuten, andererseits ist es möglich, dass eine Ergänzung dieser scheinbar „unzureichenden Abwehr“ durch andere Mechanismen erfolgt. Es ist aber auch denkbar, dass Makrophagen in der Lage sind, bei Bedarf schnell in die Lunge einzuwandern. Hierfür spricht, dass bei intratrachealer Verabreichung einer hitzeinaktivierten *Escherichia coli*- oder apathogener *Pasteurella multocida* Vaccine ein deutlicher Anstieg der FARMs beobachtet werden (39, 44) konnte.

2.2.1.3 Dendritische Zellen (DCs)

Dendritische Zellen bilden, ihre anatomische Lokalisation, Oberflächenmoleküle und Funktionen betreffend, eine heterogene Gruppe von Zellen. Vorläufer der dendritischen Zelle werden über den Blutstrom in verschiedene Körpergewebe verteilt und differenzieren sich hier zu unreifen dendritischen Zellen, zu denen auch die Langerhans Zellen der Haut gehören. Unreife dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit, Antigene mittels Phagozytose (47) (48) und Makropinozytose (49) aufzunehmen, zu prozessieren und, in erhöhtem Maße an MHC-II-Moleküle gebunden, an ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Durch den stattgefundenen Antigenkontakt wird die Zelle dazu veranlasst, in die T-Zellbereiche von lymphatischen Organen abzuwandern. Hier reift sie heran, wodurch sie in der Lage ist, mit antigenspezifischen B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen Kontakt aufzunehmen. Costimulierende Moleküle, die erst durch die Reifung exprimiert werden, helfen bei der Aktivierung der T-Zellen und regen diese somit zur Proliferation an. Im lymphatischen Gewebe werden T- und B-Zellen durch Chemokine von dendritischen Zellen angelockt, wodurch die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens dieser beiden Zelltypen deutlich erhöht wird (50, 51). Auf diese Art und Weise kann die Aktivierung der B-Zelle und somit der Beginn der Antikörperproduktion durch die T-Zelle mit eingeleitet werden.

2.2.2 Die adaptive Immunabwehr

2.2.2.1 Lymphozyten

Die adaptive Immunabwehr wird, wie in Abschnitt 2.2 bereits erwähnt, von den Lymphozyten gebildet. Es gibt zwei Hauptgruppen von Lymphozyten: die B-Lymphozyten oder auch B-Zellen genannt und die T-Lymphozyten, auch als T-Zellen bezeichnet. Sie entstehen beide im Knochenmark aus der lymphatischen Vorläuferzelle, aber nur die B-Lymphozyten reifen beim Säugetier auch dort heran. Beim Vogel hat sich ein besonderes Organ ausgebildet, das die B-Zellreifung übernimmt, die Bursa Fabricii (52). Die T-Zellen vollziehen ihre Reifung sowohl beim Säuger als auch bei den Vögeln im Thymus, der Prägungsstätte dieser Zellen.

2.2.2.1.1 B-Lymphozyten

Zur Erkennung der Antigene dient den B-Zellen membrangebundenes Immunglobulin, das auch als B-Zell-Rezeptor (*BCR*) bezeichnet wird. Jede B-Zelle exprimiert in ihrer Zellmembran einen anderen BCR und erkennt damit nur ein bestimmtes, spezifisches Antigen. Die BCR sind gegen eine Vielzahl verschiedener Pathogene gerichtet. Dies ermöglicht den B-Zellen eine Fülle verschiedener Antigene von Viren, Bakterien und anderen krankheitserregenden Organismen zu erkennen. Nach Bindung dieses spezifischen Antigens in einem peripheren lymphatischen Organ und zusätzlicher Interaktion mit T-Helferzellen, kann sich diese B-Zelle zur Plasmazelle differenzieren und das spezifische Immunglobulin in löslicher Form als Antikörper sezernieren (28).

2.2.2.1.2 Immunglobuline

Immunglobuline bestehen aus zwei identischen schweren (heavy- oder H-) Ketten und zwei identischen leichten (light- oder L-) Ketten. Sowohl die H- als auch die L-Kette bestehen wiederum aus einer variablen (V-) Region, die für die Bindung des Antigens zuständig ist und einer konstanten (C-) Region, welche die Effektor- oder Signalfunktionen vermittelt. Die Immunglobuline (Ig) von Hühnern unterscheiden sich in diesem Aufbau nicht von denen des Säugers. Jedoch ist ihr Entstehungsmechanismus ein etwas anderer, als er von Maus und Mensch bekannt ist. Bei Mensch und Maus werden die variable Region der leichten Kette (V_L) und die der schweren Kette (V_H) jeweils von mehr als einem DNA-Abschnitt oder Gensegment codiert. Im Fall der V_L -Region sind zwei verschiedene Gensegmente an

ihrer Bildung beteiligt, das $V_{(\text{variable})}$ -Gen-Segment und das $J_{(\text{joining})}$ -Gen-Segment. Entsprechend wird die V_H -Region von den drei Gensegmenten V , $D_{(\text{diversity})}$ und J codiert. Dieses Zusammenfügen verschiedener Gensegmente wird unter dem Begriff der Genumlagerung oder auch Gene rearrangement verstanden. Sie führt dazu, dass ein vollständiges Exon für die variable Region der entsprechenden Kette gebildet wird. Bei Mensch und Maus kommen ca. 65 V-Segmente für die schwere Kette, ungefähr ebenso viele für die beiden Varianten der leichten Kette, ca. 30 D Varianten und vier bis sechs J-Segmente pro Locus vor. Bei der somatischen Rekombination der DNA werden nun zufällig V- und J- (und D-) Segmente miteinander kombiniert, wodurch sich die Anzahl verschiedener Moleküle potenziert (28). Die konstanten Regionen der jeweiligen Kette werden anschließend mittels RNA-Spleißen zusammengebaut. Die C_H -Region bestimmt die Klasse oder den Isotyp des Antikörpers und somit seine Effektorfunktionen. Sie werden von getrennten Genen codiert, die stromabwärts der V-Gene im Locus der schweren Kette liegen. Jede B-Zelle beginnt mit der Expression von IgM als B-Zell-Rezeptor und durch die Differenzierung zur Plasmazelle mit der Produktion von IgM-Antikörpern. Später wird dieselbe V-Region in IgG-, IgA- oder IgE-Antikörpern exprimiert. Diese Umschaltung wird als Isotypwechsel bezeichnet und durch externe Signale während der Immunantwort stimuliert.

Diese Vielfalt der einzelnen Segmente, wie wir es gerade bei Maus und Mensch kennengelernt haben, kommt beim Huhn nicht vor. Im Hühnengenom finden sich im Locus für die leichte Kette nur ein einzelnes funktionelles V_L - und ein J_L -Gensegment und für die schwere Kette neben 15 D-Segmenten mit sehr geringer Sequenzvariation nur jeweils ein einziges funktionelles V_H - und J_H -Segment. Somit ist die Erzeugung eines vielfältigen Antikörper-Repertoires über den Mechanismus des Gene rearrangments nicht möglich (53). Interessanterweise konnten, dem funktionellen V-Segment der leichten Kette angrenzend, weitere 25 homologe Gensegmente gefunden werden. Im Locus der schweren Kette konnten sogar 80 dieser Segmente nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um sogenannte Pseudogene. Sie sind den angrenzenden Genen homolog, codieren aber keine funktionsfähigen Produkte. Aus diesen Pseudogenen werden sowohl für die schwere als auch für die leichte Kette Sequenzblöcke in die rearrangierten V-Gene transferiert (54). Dieses Ereignis wird auch als „gene conversion“ bezeichnet. Durch diesen

Mechanismus können theoretisch bis zu 10^{11} verschiedene Antikörpermoleküle generiert werden.

2.2.2.1.3 T-Lymphozyten

T-Zellen bilden zwei Klassen, von denen die eine nach Aktivierung zu cytotoxischen T-Zellen wird. Diese Klasse wird auch als $CD8^+$ -T-Zelle bezeichnet. Bei der zweiten Klasse der T-Zellen handelt es sich um die $CD4^+$ -T-Zelle, auch bekannt unter dem Begriff T-Helferzelle oder T_H -Zelle. Beide Klassen von T-Zellen exprimieren als charakteristisches Merkmal das CD3-Molekül auf ihrer Zelloberfläche. Des Weiteren lassen sich die T-Helferzellen in zwei Untergruppen einteilen, die T_H1 - und T_H2 -Zellen. Erstere sind für die Bekämpfung intrazellulärer Bakterieninfektionen von Bedeutung, da sie in der Lage sind, befallene Makrophagen zu aktivieren. Letztere Untergruppe ist von großer Bedeutung für die Antikörperproduktion durch Plasmazellen, da die meisten B-Zellen, die ein Antigen erkannt haben, ein zusätzliches Signal von einer T_H2 -Zelle benötigen, bevor sie proliferieren und sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren.

Alle T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren (TCR), die jeweils spezifisch für ein Antigen sind. Jeder TCR besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, einer α -Kette und einer β -Kette einerseits oder aus einer γ -Kette und einer δ -Kette andererseits. Daraus ergibt sich auch die Bezeichnung α/β_1 T-Zell-Rezeptor oder TCR2 und γ/δ T-Zell-Rezeptor oder TCR1 (28). Beim Säugetier stellen die γ/δ T-Zellen eine Minderheit der T-Zellen dar. Sie bilden jedoch den Hauptanteil der epidermalen Lymphozyten und konnten auch im Dünndarm von Mäusen identifiziert werden (55). Beim Huhn kommen γ/δ T-Zellen dagegen wesentlich häufiger vor und stellen im Blut bis zu 30 % der T-Zellen dar. Auch im Hühnerdarm konnten viele der $CD8^+$ T-Zellen aus dem Epithel als γ/δ -T-Zellen identifiziert werden (56). Allgemein wird von den γ/δ -T-Zellen vermutet, dass ihre Hauptaufgabe in der Überwachung der Epithelintegrität zu suchen ist (57). Zusätzlich sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass beim Huhn ein dritter Typ eines T-Zell-Rezeptors vorkommt, der TCR3. Dieser entspricht in seiner Funktion weitestgehend dem α/β_1 T-Zell-Rezeptor, unterscheidet sich aber von diesem in seinem Aufbau.

Das Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT)

Die Struktur und Verteilung von lymphatischem Gewebe beim Vogel unterscheidet sich deutlich von dem des Säugers. Einer der wesentlichen Unterschiede ist in der

Ausbildung der Lymphknoten zu sehen. Die aviären Lymphknoten sind weder strukturell noch funktionell mit denen eines Säugers vergleichbar (58) und fehlen bei manchen Vogelarten sogar ganz. Des Weiteren besteht der Thymus der Vögel aus mehreren separat angelegten Lappen. Andererseits hat sich bei den Aves ein spezialisiertes Organ zur B-Zelldifferenzierung entwickelt, die Bursa Fabricii. Vögel besitzen außerdem im oculonasalen Bereich deutliche Anhäufungen von lymphatischem Gewebe, die Hardersche Drüse. Trotz der strukturellen Unterschiede ist die Funktion der Lymphozyten und der peripheren lymphatischen Organe jedoch sehr ähnlich. Weitere Anhäufungen von lymphatischem Gewebe finden sich an den großen Schleimhautoberflächen des Körpers. Diese Oberflächen haben entweder auf Grund ihrer physiologischen Funktionen, wie zum Beispiel dem Gasaustausch in der Lunge oder der Nahrungsaufnahme im Darm, dünne und durchlässige Barrieren ins Körperinnere oder sie besitzen auf Grund ihrer anatomischen Lage direkten Kontakt zur Außenwelt. Es überrascht daher nicht, dass viele Erreger diesen Weg zum Eindringen in den Wirt wählen. Das an diesen Stellen ausgebildete lymphatische Gewebe, ist unter dem Begriff Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe (*mucosa-associated lymphoid tissues, MALT*) (59) bekannt. Prinzipiell kann das MALT in zwei Seiten unterteilt werden (Abbildung 9). Das ist zum einen die induktive Seite, an der die Antigene von den mucosalen Oberflächen aufgenommen werden und zur Stimulation von naiven T- und B-Zellen dienen. Dem gegenüber steht die Effektor-Seite. Hier werden Effektorzellen angetroffen, die nach der Extravasation und Differenzierung ihren Aufgaben nachgehen. Als Beispiel sei die Produktion von sekretorischem IgA (sIgA) durch die Plasmazellen genannt. Diese Effektorzellen findet man über die gesamte Lamina propria der Schleimhäute verstreut. Nur die induktive Seite, gebildet aus organisiertem Gewebe, wird als MALT bezeichnet. Das MALT stellt das der Schleimhaut eigene spezialisierte Immunsystem dar. Es umfasst, je nach seiner Lage, beispielsweise das *Larynx-assoziierte lymphatische Gewebe* kurz als LALT (60) und das *Darm-assoziierte lymphatische Gewebe* (*gut-associated lymphoid tissues*), kurz GALT genannt (61). Auch Organe, wie die Glandula parotis, besitzen in ihrem Ausführungsgang das Duct-(Ausführungsgang)-assoziiertes lymphatisches Gewebe (DALT) (62). Eine weitere große Schleimhautoberfläche bieten zweifelsfrei die Lungen. Auch hier ist ein entsprechendes lymphatisches Gewebe ausgebildet, das auf Grund seiner Lokalisation an den Bronchen, unter der Bezeichnung *Bronchus-assoziiertes*

lymphatisches Gewebe (BALT) (63, 64) bekannt ist. Weiterhin stehen Organe wie das Auge in direktem Kontakt mit der Außenwelt. Auch hier haben sich einerseits in der Konjunktiva, andererseits im Lymphabflussgang der Tränendrüse Strukturen entwickelt, die von verschiedenen Autoren entsprechend ihrer genauen Lage als *Konjunktiva-(Conjunctiva)-assoziiertes lymphatisches Gewebe* (CALT) (65) und als *Lacrimal drainage-associated lymphoid tissue* (LDALT) (66) getrennt voneinander betrachtet werden. Knop E. und Knop N. hingegen sehen die Gesamtheit dieser lymphatischen Gewebe am Auge als eine Einheit und sprechen vom *Augen-(Eye)-assoziierten lymphatischen Gewebe* (EALT) (67), das aber bisher keiner anerkannten Nomenklatur entspricht. Es verwundert nicht, dass auch in der Schleimhaut des Nasopharynx solches Gewebe ausgebildet ist, welches entsprechend als *Nose- oder Nasopharynx-associated lymphoid tissue* (NALT) bezeichnet wird (68). Der wohl am besten untersuchte Anteil des MALT aber ist das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT) mit seinen Peyerschen Platten (PP), dem Caecum und den isolierten Lymphfollikeln (isolated lymphoid follicle, ILF) (69).

2.2.2.2 Schleimhäute

Die Schleimhäute bilden eine Barriere des Körpers zur Außenwelt. Ihre Gesamtoberfläche beträgt beim erwachsenen Menschen ca. 250 m² (29) und bietet somit Pathogenen eine große Angriffsfläche. Das Epithel der Schleimhaut, Epithelium mucosae, bildet die äußerste Grenze, gefolgt von der Lamina propria mucosae. In der Epithelschicht sind zwischen den eigentlichen Epithelzellen auch sekretorische Zellen zu finden, wie zum Beispiel die Becherzellen. Sie sind für die Produktion von serösen oder mukösen Sekreten zuständig und bieten auf diese Weise einen zusätzlichen Schutz. Eine durchgehende Basalmembran bildet die Grenze zwischen dem Epithel und der darunterliegenden Lamina propria mucosae. Diese subepitheliale Schicht besteht aus lockerem Bindegewebe, sowie Blut- und Lymphgefäßen und enthält abhängig von der Lokalisation Nervenfasergeflechte, glatte Muskelzellen und Zellen des Immunsystems. Dazu gehören Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten.

2.2.2.3 Aufbau des Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebes

Das Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe ähnelt in seinem Aufbau dem eines Lymphknotens. Es besitzt T-Zell Regionen mit dazwischen liegenden Anhäufungen von B-Zellen und einer Vielzahl von antigenpräsentierenden Zellen. Ein wesentlicher

Unterschied zum Lymphknoten ist das Fehlen von zuführenden Lymphgefäßen. Afferente Lymphgefäße sind im MALT überflüssig, da dieses Gewebe seine Antigene von den Schleimhautoberflächen erhält. Dazu ist das direkt über dem Lymphfollikel gelegene Epithel, auch Follikel assoziiertes Epithel (FAE) genannt, mit M-Zellen ausgestattet. Hierbei handelt es sich um spezialisierte Epithelzellen, die sich auf die Aufnahme von Antigenen, wie beispielsweise Bakterien (70) und Viren (71) aus dem Lumen spezialisiert haben. Sie besitzen an ihrer lumenseitigen Fläche Mikrofalten statt Mikrovilli. Dementsprechend bezeichnet man sie auch als Mikrofaltenzellen oder M-Zellen. Die Partikel werden mittels Endo- oder Phagozytose aufgenommen, in Vesikeln durch das Zellinnere in Richtung Basalmembran transportiert und in den Extrazellularraum abgegeben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transzytose. An ihrer basalen Oberfläche besitzt die Zellmembran der M-Zelle tiefe Falten. In den dadurch gebildeten Taschen liegen antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen (Abbildung 9). Diese Zellen nehmen die durch die M-Zelle abgegebenen Partikel auf, prozessieren sie und präsentieren sie den darunter liegenden Lymphozyten. Bei diesen Lymphozyten handelt es sich um naive T- und B-Zellen, die durch die Wände spezialisierter Blutgefäße, den postkapillären Venolen mit hohem Endothel (high endothelial venules, HEV) hindurch treten, so die Lamina propria erreichen (72) und auf die Präsentation von Fremdprotein warten. Diese HEV bilden mit ein charakteristisches Merkmal des MALT. Die genauere Funktion des MALT soll anhand des GALT erörtert werden.

2.2.2.4 Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT) beim Säuger

Das Darm-assoziierte Immunsystem ist der größte und komplexeste Teil des Immunsystems. Es hat nicht nur den größten Antigenkontakt, verglichen mit allen anderen lymphatischen Geweben des Körpers, sondern es muss noch zusätzlich zwischen invasiven Organismen und harmlosen Antigenen unterscheiden, wie beispielsweise Futtermittelantigenen und Kommensalen. Die meisten Erkenntnisse zur Struktur und Funktion des Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebes stammen aus Untersuchungen am GALT von Säugetieren. Das GALT besteht aus den Peyerschen Platten, dem Caecum und isolierten Lymphfollikeln (isolated lymphoid follicle, ILF) (69). Die Peyerschen Platten sind makroskopisch sichtbare lymphoide Aggregate in der Submukosa entlang des gesamten Dünndarmes. Reife Peyersche Platten bestehen aus großen B-Zell-Follikeln und zwischen ihnen eingelagerten T-Zellarealen. Die Lymphozytenansammlungen werden durch das

Follikel-assoziierte Epithel (FAE) und der weniger gut organisierten subepithelialen Dome Region (SED) vom Lumen getrennt. Das FAE unterscheidet sich vom normalen Darmepithel durch die geringere Ausstattung mit Verdauungsenzymen und einem weniger ausgeprägten Zottensaum. Zusätzlich kommen im FAE eine große Anzahl von B-, T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen vor. Das markanteste Charakteristikum jedoch sind die darin enthaltenen M-Zellen. Wie bereits in Abschnitt 2.2.2.3 erwähnt, handelt es sich hierbei um Zellen, die der Aufnahme von Partikeln aus dem Lumen dienen. Des Weiteren kommen in den PP zahlreiche DCs vor, die sowohl in den Dome Regionen als auch in der Lamina propria zu finden sind. Über ihre genauen Funktionen wird noch rege geforscht und diskutiert (61).

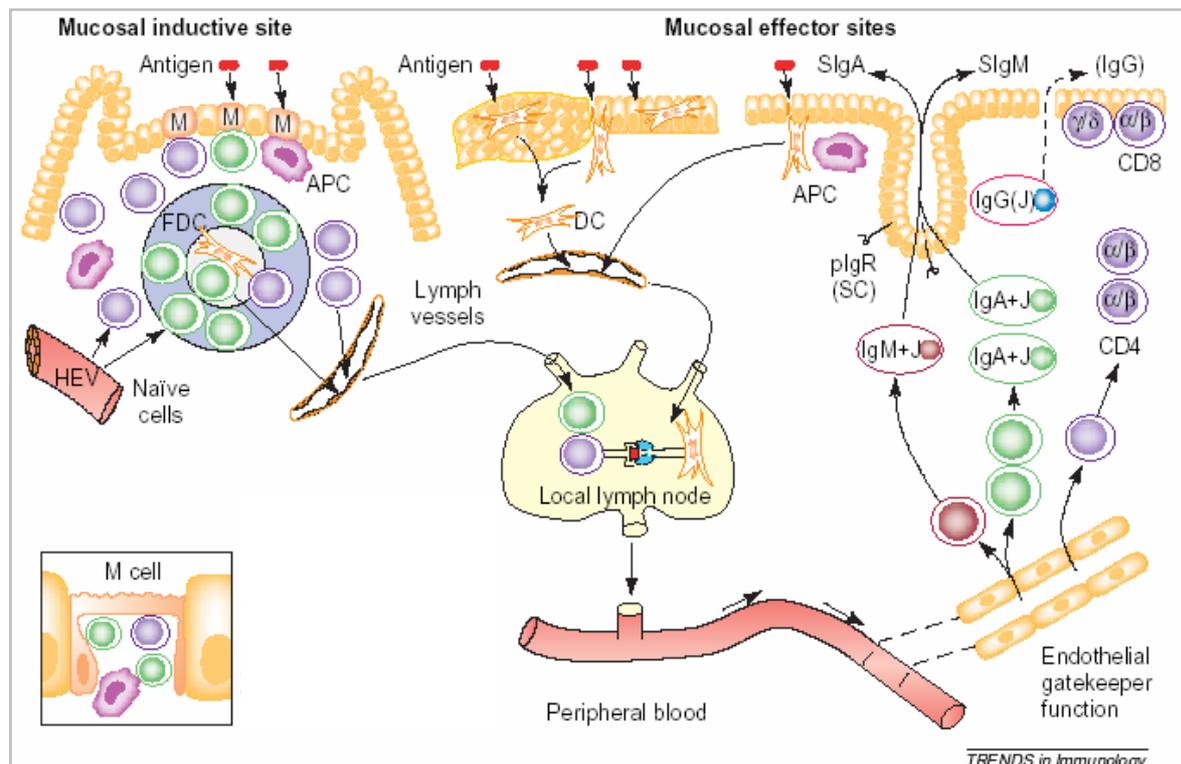


Abbildung 9: Schematische Darstellung der induktiven und Effektor-Seite am Beispiel des Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) beim Menschen (modifiziert nach (69)).

Antigene können aktiv durch die M-Zellen (M) des Follikel-assoziierten Epithels aufgenommen werden und gelangen so zu den subepithelial gelegenen antigenpräsentierenden Zellen (APC). Zu ihnen gehören die dendritischen Zellen (DC), die Makrophagen, die B-Zellen und die follikulär dendritischen Zellen. Diese nehmen die Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren sie den T-Zellen (links in der Abbildung). Zusätzlich können Antigene auch in den Bereichen der Effektor-Sites direkt durch intra- oder subepithelial gelegene DCs aufgenommen werden, die dann über die Lymphbahnen den Lymphknoten erreichen und hier als reife DCs in der Lage sind, T-Zellen zu stimulieren (dargestellt in der Mitte der Abbildung anhand des NALTs). Naive T- und B-Zellen erreichen das MALT über die high endothelial venules (HEV). Die aktivierten T-Zellen und Plasmazellen verlassen den Lymphknoten und gelangen über die Blutbahn (über spezielle Endothelien) zu den Effektor-Sites. Hier üben sie als cytotoxische T-Zellen ($CD8^+$, lila), T-Helferzellen ($CD4^+$, lila) und immunglobulinproduzierende Plasmazellen (IgG rosa, IgA grün und IgM rot) ihre Effektorfunktionen aus (rechts in der Abbildung anhand des GALTs dargestellt).

2.2.2.5 Darm-assoziierte lymphatische Gewebe beim Huhn

Das GALT beim Huhn besteht aus der Bursa Fabricii, diffusen lymphoiden Infiltraten, den Tonsillae caecales, dem Meckelschen Divertikel und den Peyerschen Platten (PP). Die PP des Huhnes sind im distalen Ileum lokalisiert. Ihre Anzahl variiert bei zwölf Wochen alten Tieren zwischen fünf und sechs PP. Histologisch können die PP von der Umgebung durch ihre typische Struktur abgegrenzt werden. Sie tragen ein abgeflachtes Epithel, in dem keine Becherzellen mehr zu finden sind. Sowohl die mikroskopische Struktur als auch die Zahl der PP sind beim Huhn nicht so gut entwickelt wie beim Säuger. Das lymphatische Gewebe der PP beim Huhn besteht aus germinalen Zentren und diffus verteiltem lymphatischem Gewebe (73). Antigene im Darm werden durch Makrophagen und DCs aus germinalen Zentren, aber auch von Makrophagen des diffus verteilten lymphatischen Gewebes und von Epithelzellen aufgenommen und prozessiert.

Das Meckelsche Divertikel, der Rest des embryonalen Dottersacks, enthält ebenfalls lymphoide Infiltrate, die im Alter von zwei Wochen ihren Anfang nehmen und bis zum Alter von fünf bis sieben Wochen germinale Zentren aufweisen (74).

2.2.2.6 Paranasales und paraoculares lymphatisches Gewebe

Die Hardersche Drüse oder auch Nickhautdrüse genannt, ist bei allen Hausvögeln wesentlich größer als die eigentliche Tränendrüse, Glandula lacrimalis, und liegt der medialen Fläche des Augapfels an. Sie besitzt einen einheitlichen Ausführungsgang, welcher tief an der Innenfläche der Nickhaut in den Konjunktivalsack einmündet (75). Das Interstitium der Harderschen Drüse zeigt deutliche Ansammlungen von lymphatischem Gewebe. Intraepithelial lässt sich eine starke Infiltration durch IgA-produzierende Plasmazellen nachweisen. Die Einwanderung der Lymphozyten beginnt bereits zwischen dem 17. und 18. Embryonaltag. Erste Plasmazellen werden in der Zeit um den Schlupf und germinale Zentren im Alter von drei bis vier Wochen beobachtet (76).

2.2.2.7 Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe beim Säuger

Die Existenz von lymphatischem Gewebe in Lunge und Darm ist seit über hundert Jahren bekannt. Schon im Jahre 1677 beschrieb Peyer die nach ihm benannten Peyerschen Platten des Darmes. Auch in der Lunge wurden bereits 1875 von Klein (77) Ansammlungen von Lymphozyten beobachtet und genauer beschrieben. Seit

der Erstbeschreibung dieses Gewebes ist viel Zeit vergangen und auch viel darüber geforscht worden. *Bienenstock et al.* (63) untersuchten das bronchale lymphatische Gewebe verschiedener Tierarten (Kaninchen, Meerschweinchen, Maus, Huhn, Ratte, Hund, Schwein und Hamster) und verglichen dessen Aufbau mit dem des GALT. Die dabei entdeckte strukturelle Ähnlichkeit veranlasste *Bienenstock et al.* zur Bezeichnung Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT). Bei Untersuchungen an Ratten konnte an den Aufteilungsstellen der Bronchen einerseits, aber auch entlang der luftleitenden Wege andererseits, regelmäßig BALT lokalisiert werden. Dabei lag das gefundene BALT immer zwischen einer Arterie und dem Bronchus (78). Bei den meisten bisher untersuchten Tierarten konnte BALT erst nach der Geburt gefunden werden (63, 79, 80). Während der ersten drei Lebenstage konnte bei Untersuchungen an Mäusen und Ratten kein BALT detektiert werden, obwohl vereinzelt B- und T-Zellen in der Lunge zu sehen waren. Die ersten BALT Strukturen wurden frühestens im Alter von vier Tagen an den Eintrittsstellen des Bronchus in den kranialen Lungenlappen beobachtet. Mit zunehmendem Alter entwickelte sich BALT auch entlang des Bronchalbaumes. Während seiner Entwicklung konnten zunächst im Alter von vier Tagen B-Zellen und mit acht Tagen dann auch T-Zellen gefunden werden (79). Zwei Wochen nach der Geburt konnte eine deutliche Zunahme der Lymphozyten verzeichnet werden. Diese wiesen aber bis zum Alter von vier Wochen keine Separierung in T- und B-Zellareale auf. Erst bei den zwölf Wochen alten Tieren sind Sekundärfollikel regelmäßig beobachtet worden. Ähnliche Entwicklungsstudien an spezifisch pathogenfrei (SPF) und keimfrei gehaltenen Ratten zeigten eine zeitliche Verzögerung der BALT-Entwicklung im Vergleich zu konventionell gehaltenen Tieren (81). Jedoch unterschied sich das BALT in seinem generellen Entwicklungsmuster nicht von dem der konventionell gehaltenen Ratten. *Milne et al.* (82) konnten durch subkutane Transplantationen von fetalen Mäuselungen zeigen, dass BALT sich trotz einer keimfreien Umgebung entwickelt. Im Gegensatz zur Lage des BALT, die nach Meinung von Plesch (83) vorgegeben ist, scheint seine weitere Entwicklung jedoch Antigen-abhängig zu sein (84). *Hiller et al.* (85) untersuchten das BALT bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen. Dabei fiel auf, dass BALT bei Kindern und Jugendlichen vorkam, jedoch kaum bei gesunden Erwachsenen. Unter pathologischen Bedingungen hingegen, wie beispielsweise bei chronischen Lungeninfektionen, Immundefizienz und Autoimmunerkrankungen (86) (87) (88, 89), wurde BALT auch bei Erwachsenen

beobachtet. Ähnlich verlief eine klinische Studie mit Rauchern und Nichtrauchern, in der gezeigt wurde, dass das Vorkommen von BALT bei Rauchern vermehrt war (90). Die von *Hiller et al.* (91) untersuchten Lungen von Kindern zeigten typische Sekundärfollikel und parafollikuläre Zonen. Die Follikel bestanden aus dem germinalen Zentrum mit einer gleichen Anzahl an B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen und wenigen Makrophagen. Außen zeigte der Follikel eine Corona aus B-Zellen mit vereinzelt vorkommenden CD4⁺ T-Zellen. In den parafollikulären Bereichen hingegen konnten gleich viele B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei deutlich mehr CD4⁺ als CD8⁺ T-Zellen beobachtet wurden. Allen untersuchten Spezies ist jedoch gemein, dass dem BALT ein durch Lymphozyten mehr oder weniger stark infiltriertes Epithel aufliegt, das Lymphoepithel (LE). Es kann vom umliegenden Epithel durch das Fehlen von Zilien und Becherzellen unterschieden werden. Beim Menschen weist das LE eine geringe Anzahl von B- und T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) auf (91), während es bei Ratten vor allem aus CD4⁺ T-Zellen und nur wenigen B-Zellen besteht.

2.2.2.8 Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe beim Huhn

Bienenstock et al. (63) untersuchten das bronchale lymphatische Gewebe von verschiedenen Säugetierspezies (Kaninchen, Meerschweinchen, Maus, Huhn, Ratte, Hund, Schwein und Hamster) und auch das des Huhnes. Bei der Untersuchung des Primärbronchus gelang es ihnen sogar, bei einem Huhn fingerförmige, lumenwärts gerichtete Verdickungen der Mucosa mit Hilfe einer Lupe zu erkennen. Die anschließende histologische Untersuchung zeigte, dass es sich hierbei um BALT handelte. Zusätzlich konnten in diesem lymphatischen Gewebe immer wieder germinale Zentren gefunden werden. In späteren Studien wurde die postnatale Entwicklung von BALT beim Huhn mittels einfacher histologischer Färbungen, später auch immunhistologisch untersucht. Manche Untersucher konnten erste Lymphozyteninfiltrate bereits beim Eintagsküken beobachten (Abbildung 10) (64). Bei den ersten gesichteten Lymphozyten handelte es sich um T-Zellen, die zeitlich vor den B-Zellen einwanderten (92). B-Lymphozyten werden im Primärbronchus erst im Alter von zwei Wochen beobachtet, kommen im Parenchym hingegen bereits beim Eintagsküken vor (93). Die eingewanderten T- und B-Lymphozyten beginnen sich als nächstes zu organisieren. Dabei werden B-Zellen in der Peripherie des lymphatischen Gewebes angetroffen, die T-Zellen hingegen eher in ihrem Zentrum (92). In der zweiten Lebenswoche konnten erste germinale Zentren gefunden werden

(64, 94). Bei der Untersuchung von SPF Tieren hingegen, wurden erste germinale Zentren im Alter von drei Wochen beobachtet (93). Bei den konventionell gehaltenen Tieren konnten mit sechs Wochen, um fast jeden Sekundärbronchus-Abgang, BALT-Knoten gefunden werden (64). In den reifen BALT-Knoten wiesen die T- und B-Zellen ein charakteristisches Verteilungsmuster auf. Die germinalen Zentren und auch ein weiterer großer Teil der Lymphozyteninfiltrate bestanden aus B-Lymphozyten, die nun die dominierende Lymphozytenart darstellten (93). In ihrer Peripherie wurden auch Plasmazellen gefunden. $CD4^+$ T-Zellen lagen in dieser Studie von *Fagerland et al.* hauptsächlich in dicht gepackten Nestern und formten große asymmetrische, parafollikuläre Kappen um die germinalen Zentren. Die $CD8^+$ T-Zellen hingegen zeigten eine eher diffuse Verteilung in den Bereichen zwischen den germinalen Zentren. Nur wenige $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen konnten in den germinalen Zentren gefunden werden (93). Untersuchungen an Puten zeigten, dass BALT bei gesunden Tieren, verglichen zu Tieren, die mit *Bordetella avium* infiziert wurden, deutliche Unterschiede in der Ausprägung des BALT aufwiesen (95, 96). Die anschließende Untersuchung von Hühnern, die unter verschiedenen Haltungsbedingungen aufgewachsen sind, zeigten ähnliche Ergebnisse (64, 93). Alle bisher durchgeführten Studien weisen darauf hin, dass einerseits eine altersabhängige Entwicklung des BALT stattfindet, andererseits aber auch der Antigenkontakt bei seiner Ausbildung eine wesentliche Rolle zu spielen scheint. BALT Gewebe konnte jedoch nur an den Sekundärabgängen der drei letzten Sekundärbronchentypen (siehe Abschnitt 2.1.2) nachgewiesen werden (92, 93). Mit zunehmendem Alter wurden kleine Infiltrate von Leukozyten im Lungenparenchym beobachtet (92, 94). Diese waren direkt unter dem Lumen des Parabronchus lokalisiert. Ihre zelluläre Zusammensetzung war beschränkt auf nicht-lymphoide Zellen und T-Zellen. Diese $CD3^+$ T-Zellnester bestanden hauptsächlich aus $CD8^+$ Zellen, die TCR1 exprimierten. Die im restlichen Gewebe um die Parabronchen gelegenen (92) vereinzelt Leukozyten bestanden aus T-, B- und nicht-lymphoiden Zellen. Dabei handelte es sich bei den $CD3^+$ T-Zellen meistens um $CD8^+/-TCR2^+$ -Zellen und einige wenige $CD4^+/-TCR1^+$ -Zellen (92). Die nachgewiesenen B-Zellen hingegen lagen etwas weiter entfernt vom Lumen des Parabronchus. Einzelne gelegene nicht-lymphoide Zellen kamen im Parenchym zahlreich vor. Es handelte sich um (CVI-ChNL-68.1 und 74.2 positive) Makrophagen, die MHC-Klasse II exprimierten. Direkt um die Muskelfasern, die das Parabronchuslumen begrenzen,

lassen sich mit einem Antikörper für follikulär dendritische Zellen, dem CVI-ChNL-4.3, Zellen in diesen Bereichen anfärben (92). Das von *Jeurissen et al.* (92) und *Fagerland et al.* (93) untersuchte Epithel, direkt über dem BALT, unterlag ebenfalls altersabhängigen Veränderungen. Bei jungen Tieren ist es flach und zilienlos und wird mit dem Alter zunehmend zilientragend und hochprismatisch (93). M-Zellen konnten jedoch in keiner untersuchten Altersstufe identifiziert werden (64). Erste Lymphozyteninfiltrate wurden bei den eine Woche alten Tieren erstmals beobachtet und nahmen bis zur vierten Lebenswoche an Größe und Anzahl stetig zu (64). In einer fortführenden Studie konnte durch immunhistologische Färbungen gezeigt werden, dass es sich hierbei fast ausschließlich um $CD8^+$ T-Zellen handelte. Nur selten kamen auch reife Plasmazellen darin vor (93). In der Lamina propria des Epithels außerhalb der BALT Regionen (non-BALT) und direkt über diesen konnten diffus verteilte B-Zellen gefunden werden. (93) Färbungen mit anti-Immunglobulin-Antikörpern zeigten in dieser Studie, dass zunächst IgG-Plasmazellen in der Lamina propria vorkommen und erst mit zwei Wochen Plasmazellen aller Isotypen darin zu finden waren.

Im BALT selbst konnten Plasmazellen besonders häufig in den Eckbereichen der Lymphozyteninfiltrate und der Peripherie der germinalen Zentren beobachtet werden. In jedem Altersstadium war die Zahl der Immunglobulin produzierenden Plasmazellen in den als „non-BALT“, bezeichneten Bereichen, signifikant höher als im BALT selbst (93). Kleine Ansammlungen von T-Zellen wurden im Lungenparenchym, dem Bindegewebe und den gasaustauschenden Regionen gefunden. Ähnliche Ansammlungen von Plasmazellen konnten hingegen nicht dargestellt werden. Dennoch konnten im Parenchym vereinzelt B-Zellen beobachtet werden. Ab dem Alter von zwei Wochen wurden die B-Zellen zum dominierenden Zelltyp im BALT. Sie kamen in den Lymphozytenbereichen um die germinalen Zentren zahlreich vor und überschritten sich oft mit den $CD4^+$ Zellregionen. *Fagerland et al.* (93) machen deutlich, dass auf Grund des Fehlens von Plasmazellen bis zur ersten Lebenswoche der Antikörperschutz des Jungtieres entweder über maternale Antikörper oder aber durch Antikörper aus einer anderen Region des Körpers gewährleistet wird.

Obwohl das Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe, sein genauer Aufbau und viele Funktionen beim Säugetier bereits bekannt sind, weiß man beim Huhn über die Funktion dieses Gewebes erstaunlich wenig.

In einer nachfolgenden Studie von *Bienenstock et al.* (97) konnte gezeigt werden, dass die Thymektomie frisch geschlüpfter Küken keine Auswirkung auf die Ausbildung des BALT hatte.

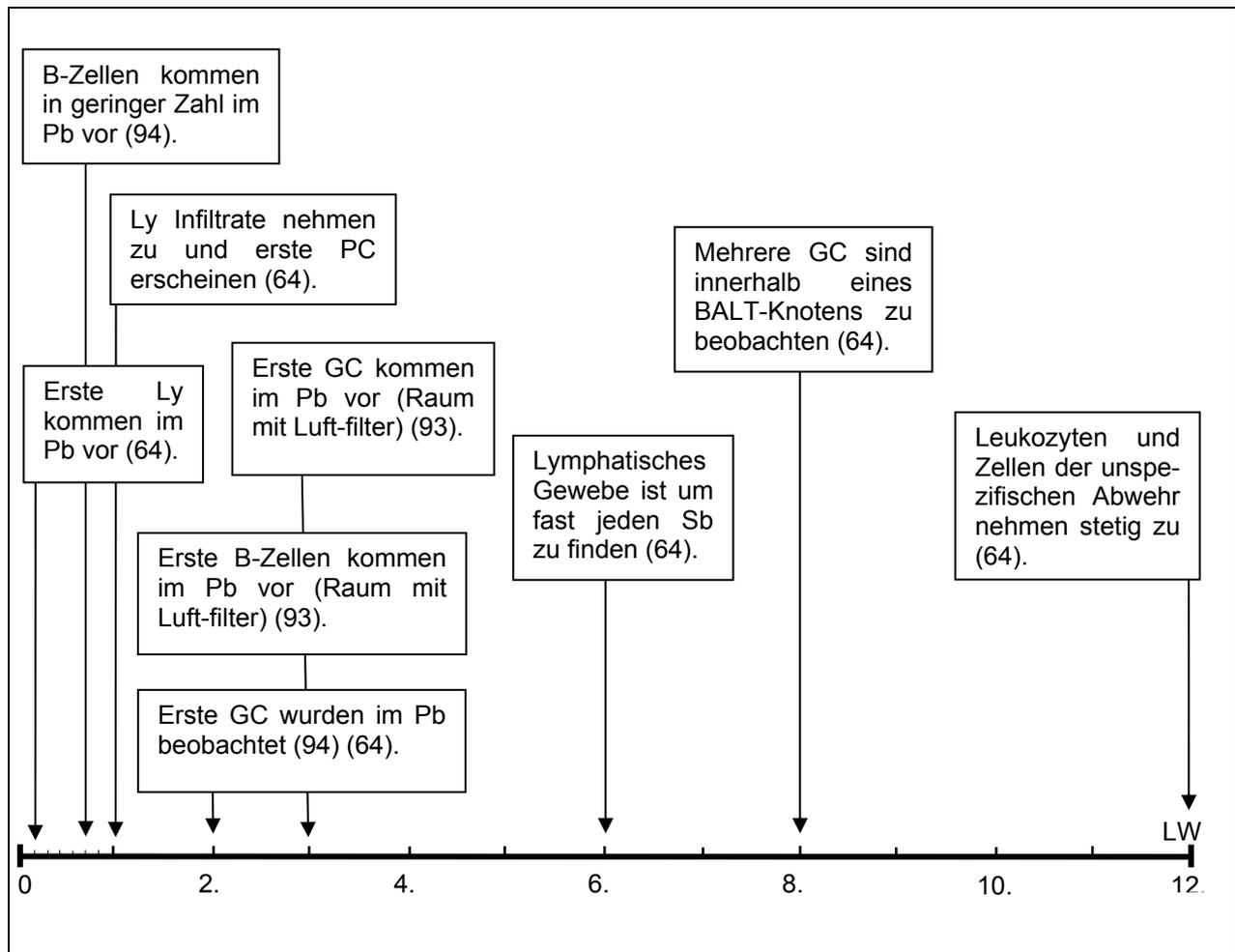


Abbildung 10: Übersicht über die altersabhängige BALT Entwicklung vom Eintagsküken bis zur zwölften Lebenswoche (LW) anhand verschiedener Literaturangaben.

Lymphozyten (Ly), Primärbronchus (Pb), Parenchym (Pa), Plasmazellen (PC), Sekundärbronchus (Sb), germinale Zentren (GC).

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Für die Anfertigung der histologischen Schnitte, der rasterelektronenmikroskopischen und der elektronenlichtmikroskopischen Präparate wurden M11-Hühner (B^{2/2}-Haplotyp) verwendet. Die M11-Eier wurden vom Institut für Tierzucht in Mariensee bezogen. Die Eier wurden unter Standardbedingungen ausgebrütet und die Tiere in kleinen Gruppen in Gitterrostkäfigen gehalten. Sie erhielten handelsübliches Alleinfutter und Wasser ad libitum.

Alter der Tiere	Anzahl der untersuchten Tiere		
	Immunhistologie	Rasterelektronen- mikroskopie	Transmissionselek- tronenmikroskopie
1 Tag	3	1	1
3 Tage	3	1	1
1 Woche	3	1	1
2 Wochen	3	1	1
3 Wochen	3	1	1
4 Wochen	3	1	1
6 Wochen	3	1	1
8 Wochen	3	1	1
12 Wochen	3	1	1

Tabelle 1: Probenentnahmeplan für die jeweilige Untersuchungsmethode.

3.2 Histologie

3.2.1 Lichtmikroskopie

3.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten

3.2.1.1.1 Material

- **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2**
 - 8,0 g Natriumchlorid (NaCl)¹
 - 1,45 g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na₂HPO₄·2H₂O)¹
 - 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)¹
 - 0,2 g Kaliumchlorid (KCl)¹
 - ad 1000 ml Aqua dest.
- **gepuffertes Formaldehyd**
 - 162 ml 37%iges Formaldehyd⁷
 - ad 1000 ml PBS
- **Einbettkassetten⁷**
- **Alkoholreihe**
 - 1 x 70%iges Ethanol
 - 1 x 96%iges Ethanol⁵
 - 2 x Isopropanol⁵
 - 2 x Xylol⁵ zur Klärung
- **Paraffinreihe**
 - Paraffin Typ 1¹¹
 - Paraffin Typ 3¹¹
 - Paraffin Typ 6¹¹
 - Paraffin Typ 9¹¹
- **Einbett-Gießformen**
- **Objektträger¹²**
- **Kunstharz (Eukitt®)⁴**

3.2.1.1.2 Durchführung

Nach Schlagbetäubung und Ausblutung des Tieres wurde die Pars cervicalis der Trachea freipräpariert und möglichst weit kranial so durchtrennt, dass sich die Trachea bis zum Brusteingang abheben ließ. Um eine vollständige Füllung der Lunge mit Formalin zu gewährleisten, wurde das freie Ende der Trachea über das Niveau der Lunge gehoben. Hierdurch war es möglich, bei vollständiger Füllung des Lungen-Luftsacksystems, den Flüssigkeitsspiegel in der Trachea zu erkennen. Eine stumpf geschliffene Einmalkanüle wurde in die Trachea eingeführt und das verbliebene Lumen der Trachea zum Zweck des Druckausgleichs nicht verschlossen. Auf diese Weise konnten Zerreißen durch Überdruck im Lungengewebe verhindert werden. Mit einer Spritze wurde die phosphatgepufferte 6 %ige Formalinlösung langsam eingegeben und die Trachea anschließend mit einer Arterienklemme verschlossen. Nach einer einstündigen Fixierung bei Raumtemperatur wurde das Huhn ventral eröffnet. Um das Brustbein abheben zu können, mussten die Rippen auf Höhe der Synchronosis intercostalis durchtrennt werden. Das Schlüssel- und Rabenschnabelbein wurden ebenfalls durchtrennt und das gesamte Brustbein konnte nach weiterer Durchtrennung der umliegenden Muskulatur abgehoben werden (Abbildung 11). Nach Entfernung von Herz, Oesophagus, Leber und des Magen-Darm-Traktes lagen die Lungen frei zugänglich. Zunächst wurde die Facies costalis der Lunge vorsichtig von den Rippen gelöst und von dort weiter dorsal und kranial präpariert, bis sich die Lunge herausheben ließ. Die deutlichen Sulci costales auf der Dorsalfläche der Lunge dienten als Orientierungshilfe, um die Lunge in der Transversalebene in möglichst vergleichbare Scheiben zu schneiden. Auf diese Art und Weise wurden die Lungen altersabhängig in zwei, drei oder vier Scheiben geschnitten (Abbildung 12). Sowohl bei den ein und drei Tage als auch bei den ein und zwei Wochen alten Tieren wurde die Lunge auf Grund ihrer geringen Größe als Ganzes eingebettet. Die Scheiben wurden in beschriftete Einbettkassetten gelegt und eine weitere Stunde in 6%igem Formalin nachfixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gewässert, um Formalinrückstände auszuwaschen. Es folgte eine routinemäßige Entwässerung der Proben. Anschließend wurden die Lungen für 6 h in 60°C warmes Paraffin Typ I verbracht.

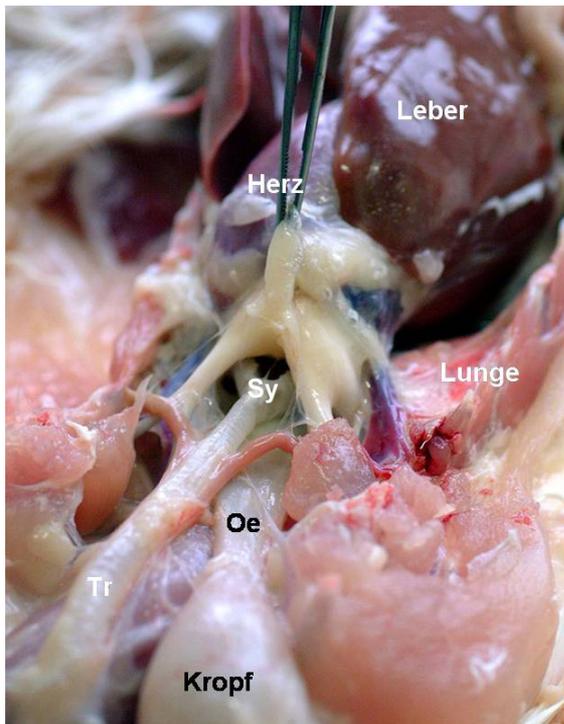


Abbildung 11: Stand der Präparation nach dem Abheben des Sternums.
Syrinx (Sy), Oesophagus (Oe), Trachea (Tr)

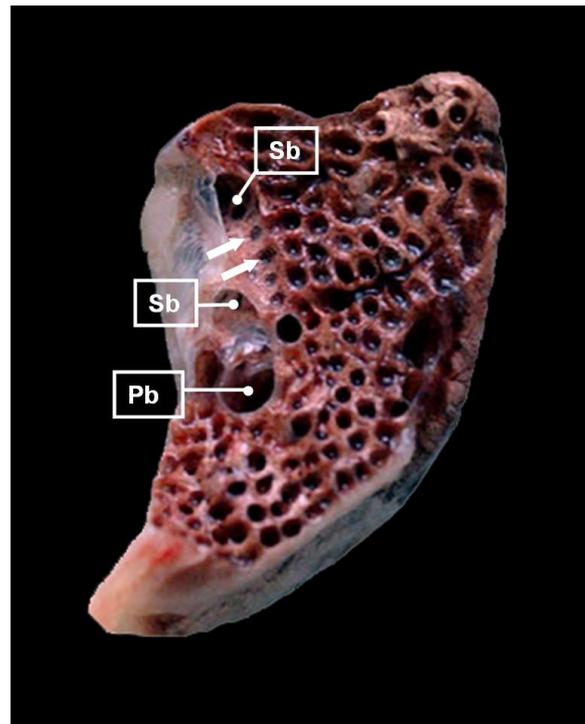


Abbildung 12: Ansicht auf den Querschnitt einer Lungenscheibe.
Zu sehen sind der Primärbronchus (Pb) und zwei Sekundärbronchen (Sb). Der obere der beiden Sb lässt mehrere Abgänge von Parabronchen erkennen (Pfeile).

Die Paraffinreihe wurde in sechsständigen Abständen durchgezogen (Typ III, Typ VI und 2 x Typ IX). Das Ausgießen erfolgte in Paraffin Typ IX mit dem Gerät AP280 der Firma Microm[®]. Dabei wurden die Lungen so eingebettet, dass sie von kaudal nach kranial geschnitten werden konnten. Alle Blöcke wurden von kaudal angeschnitten. Zur Herstellung der Paraffinschnitte diente ein Rotationsmikrotom der Firma Microm. Nach dem Strecken der 5 µm dicken Schnitte im 37°C warmen Wasserbad, wurden sie auf Objektträger aufgezo-gen. Die Präparate wurden über Nacht im 37°C Wärmeschrank getrocknet und bis zu ihrem Gebrauch in Objektträgerkästen gelagert. Unmittelbar vor Verwendung wurden die Schnitte für 10 min in Xylol gestellt, um das Paraffin aus dem Gewebe herauszulösen. Anschließend erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, 96%iges Ethanol, 70%iges Ethanol) und ein kurzes Spülen mit Aqua dest. Die Färbung, Entwässerung und Klärung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Hämatoxylin 10 min

Aqua dest.

Bläuen in fließendem Leitungswasser 10 min

Eosin 3 min

Aqua dest.

70%iges Ethanol bis keine Farbwolken mehr abgehen

96%iges Ethanol 3 min

Isopropanol 2 x 2 min

Xylol 2 x 5 min

Protokoll 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Schnitte wurden mit Eukitt® eingedeckelt.

3.2.1.2 Immunhistologie

3.2.1.2.1 Material

- **ROTI®GAROSE (Agarose Low Melt)⁷**
1,5%ige Agaroselösung (in PBS gelöst s. 3.2.1.1.1)
- **Knopfkanülen oder stumpf geschliffene Einmalkanülen in verschiedenen Größen**
- **Flüssiger Stickstoff**
- **Tissue Tek® O. C. T.™ Compound¹⁵**
- **Microtomklingen S35¹³**
- **SuperFrost®Plus Objektträger¹²**
- **Aceton⁷**
- **PBS + 1%iges BSA (Bovines Serumalbumin)¹**

- **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2 (s. 3.2.1.1.1)**

- **Blockierlösung**

500 µl Pferdserum¹⁹ (normal horse serum S-2000®)
ad 5 ml PBS +1%iges BSA

- **Antikörper**

Bei allen Antikörpern handelt es sich um Zellkulturüberstände, die mit PBS verdünnt wurden.

Klonname	Antigen	Verdünnung	Zellpopulation	Zitat
CT3	CD3	1:20	T-Zellen	(98)
3-294 o. 2-6	CD4	1:20	T-Helferzellen	(99)
3-298	CD8	1:20	Cytotoxische T-Zellen	(100)
16-6	CD45	1:1200	Alle Leukozyten	nicht publiziert
AV-20	Bu1	1:50	B-Zellen	(101)
Kul01		1:100	Makrophagen, DC	(102)
TCR-1	TCR $\gamma\delta$	1:100	$\gamma\delta$ -T-Zellen	(103)
TCR-2	TCR $\alpha/\nu\beta$ 1	1:100	$\alpha\beta$ -T-Zellen	(104)

Tabelle 2: Antikörperspezifität und Quelle

- **anti-Maus-Ig-Biotin¹⁶ (10 µg/ml in PBS)**

- **StreptABComplex/HRP¹⁰**

nach Anleitung des Herstellers angemischt

- **DAB-Lösung**

1 DAB-Tablette³

100 µl 3%iges Wasserstoffperoxid⁷ (H₂O₂)

ad 10 ml Aqua dest.

ca. 15 min vor Verwendung ansetzen und lichtgeschützt aufbewahren

- **Hämatoxylin I**¹¹
- **Alkoholreihe**
 - 1 x 70%iges Ethanol
 - 1 x 96%iges Ethanol⁵
 - 2 x Isopropanol⁵
 - 2 x Xylol⁵ zur Klärung

3.2.1.2.2 Agaroseapplikation in die Lunge

Für die immunhistologischen Untersuchungen mussten unfixierte Lungen verwendet werden, da die zur Verfügung stehenden Antikörper an fixierten und paraffineingebetteten Präparaten nicht funktionieren. Um das Kollabieren der Lungen bei der Entnahme zu verhindern und gleichzeitig das Anfertigen von Kryostat-Schnitten zu ermöglichen, musste eine neue Technik etabliert werden. Grundlage dieser Methode waren Arbeiten an Säugerylungen, die nach der Entnahme zur Wiederherstellung der Struktur mit Agarose gefüllt wurden (105). Dazu wurden verschiedene Agarose-Arten getestet. Die Wahl fiel auf die genannte ROTI[®]GAROSE (Agarose Low Melt), da sie erst bei 24-28 °C geliert. Diese Eigenschaft erlaubte den Einsatz von flüssiger Agarose bei Körpertemperatur. Zu diesem Zweck wurde eine 1,5%ige Agaroselösung hergestellt. Die pulverförmige Agarose wurde abgewogen und in PBS durch Erhitzen in der Mikrowelle in Lösung gebracht. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Agarose im Wärmeschrank bei 40°C gelagert. Die Vorbereitung des Tieres erfolgte rasch, um ein zu starkes Abfallen der Körpertemperatur bis zur Agaroseapplikation zu vermeiden. Durch Entfernen der Haut wurde die Trachea in der Pars cervicalis dargestellt. Ein Ligaturfaden wurde vorgelegt und proximal davon die Trachea so eröffnet, dass das Einführen einer stumpf geschliffenen Einmalkanüle oder einer Knopfkanüle möglich war. Die Kanüle und die Spritze wurden für die Eingabe der Agarose im Wärmeschrank vorgewärmt. Anschließend wurde die Agarose langsam aufgezogen, um eine Luftblasenbildung zu vermeiden. Bevor diese eingegeben werden konnte, musste durch Eröffnung der ventralen Bauchwand der Magen-Darm-Trakt entfernt werden und gleichzeitig die kaudale Luftsackgruppe eröffnet werden. Dies war nötig, um einen Druckausgleich bei der Agaroseapplikation zu gewährleisten und um ein schnelleres Abkühlen des Hühnerkörpers, und damit auch der Agarose, zu ermöglichen. Bei der gesamten Präparation sollte der Thorax nicht eröffnet werden, um ein Auslaufen der Agarose

aus den Luftsäcken zu vermeiden. Der Tierkörper wurde an den Ständern aufgehängt und die Kanüle in die Trachea eingeführt. Die Ligatur über der Kanüle wurde festgezogen und die Agarose wurde langsam appliziert. Die Eingabe konnte beendet werden, sobald der sichtbare Agarosespiegel das kaudale Lungenende erreicht hatte. Nach Entfernung der Kanüle wurde die Ligatur festgezogen und das Tier für eine Stunde in den Kühlraum (4°C) verbracht, wobei es hier, wie bei der Agaroseeingabe, an den Ständern aufgehängt wurde. Hierdurch konnte das Abkühlen des Tierkörpers und der Agarose beschleunigt werden.

3.2.1.2.3 Organentnahme und Einbettung

Der Tierkörper wurde von ventral eröffnet, die Lungen freigelegt und vorsichtig herausgelöst. Die Lunge wurde je nach Größe entlang der Sulci costales in mehrere ca. 1 cm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden in Einbettkassetten positioniert und mit dem Einbettungsmedium Tissue Tek® O. C. T. (Optimal Cutting Temperature) bedeckt. Anschließend wurden die Proben in, mittels flüssigen Stickstoffs auf -80 °C gekühltem, 2-Methylbutan eingefroren. Bis zum Abschluss der Probenentnahme wurden die gefrorenen Blöcke in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.1.2.4 Anfertigung von Schnitten

Die Anfertigung der 8-10 µm dicken Kryostatschnitte erfolgte mit dem Mikrotom-Kryostat HM 500 OM der Firma Microm®. Die Blöcke wurden so eingespannt, dass der Primärbronchus quer geschnitten werden konnte. Die Objektisch-Temperatur wurde auf -15 °C und die Boxtemperatur auf -12 °C eingestellt. Von jedem Tier wurde der Block mit der dritten Lungenscheibe von kranial angetrimmt, bis der gesamte Querschnitt der Lunge sichtbar war. Es folgte nun die Suche nach Sekundärbronchusabgängen durch die Anfertigung von Probeschnitten. Diese wurden mittels Hämatoxylin gefärbt, um eine bessere Beurteilung des Gewebes und somit eine bessere Orientierung zu ermöglichen. Es wurde nach Stellen gesucht, an denen ein Sekundärbronchusabgang einerseits und BALT andererseits zu erkennen waren. An den gewünschten Stellen wurden elf Serienschnitte angefertigt. Gelang es nicht BALT zu finden, so wurden Sekundärbronchenabgänge ohne BALT ausgesucht und ebenso elf Serienschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf sialinierte Objektträger (Super frost Plus®) aufgezogen und zum Trocknen 10 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend erfolgte eine Fixierung für zwei Minuten

in 100 %igem Aceton (4 °C). Die Schnitte wurden in Boxen verbracht und bis zur Verwendung luftdicht bei -20 °C aufbewahrt. Die maximale Dauer der Aufbewahrung belief sich auf zwei Wochen. Eine längerfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.1.2.5 Einfachfärbung

In allen durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wurden primäre Antikörper aus Überständen verwendet. In Vorversuchen wurden die verwendeten Antikörper austitriert. Als Positivkontrolle dienten Hühnermilzschnitte. Die Serienschnitte wurden in einer festen Reihenfolge mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt, um eine bessere Aussage über die Verteilung der einzelnen Zellarten im Gewebe zu erzielen. Die Reihenfolge ist dem Färbeprotokoll zu entnehmen (Protokoll 2).

Rehydrieren der Schnitte in PBS pH 7,2		15 min
Blockierlösung		20 min, RT
Primärantikörper in PBS verdünnt		über Nacht, 4°C
Reihenfolge der Antikörper auf den Serienschnitten:		
Anti-CD45	(1:1200)	
Anti-Bu1	(1:50)	
Anti-CD3	(1:20)	
Anti-CD4	(1:20)	
Anti-CD8	(1:20)	
Anti-TCR1	(1:100)	
Anti-TCR2	(1:100)	
Anti-8F2	(1:50)	
Anti-Kul1	(1:100)	
PBS	(Negativkontrolle)	
Waschen in PBS	3 x	5 min
Sekundärantikörper in PBS/1% BSA		1 h, RT
anti-Maus-Ig-Biotin	10 µg/ml	
Waschen in PBS	3 x	5 min
StreptABComplex/HRP		30 min
Waschen in PBS	3 x	5 min
DAB-Lösung		30 sec
Leitungswasser		10 min
Aqua dest.		kurz
Hämatoxylin		3 min
Leitungswasser		10 min
Aufsteigende Alkoholreihe		5 min
Alkohol 70 %		
Alkohol 96 %		
Isopropanol	2 x	
Xylol	2 x	
Eindecken		

3.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

3.2.2.3 Material

- **Safe-Lock Tubes 2,0 ml**¹⁸
- **Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch nach Karnovsky 1:1 verdünnt**
 - 2 g Paraformaldehydpulver in 25 ml Aqua bidest. lösen
 - 10 ml 25%iges Glutaraldehyd⁵
 - 25 mg CaCl₂
 - ad 100 ml 0,2 M Kakodylatpuffer
- **0,2 M Kakodylatpuffer pH 7,4**
 - 17,12 g Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat⁵
 - ad 500 ml Aqua dest.
 - pH 7,4 (0,2 N NaOH bzw. 0,2 N HCl)
 - im Kühlschrank bei 4 °C gelagert
- **Osmiumtetroxid-Kaliumferrocyanid-Lösung**
 - 2 % OsO₄ Stammlösung
 - 3 % Kaliumferrocyanid⁷
 - Gewünschte Menge im Mischverhältnis 1:1 herstellen
- **Alkoholreihe**
 - 50%iges Ethanol (unvergällt)⁷
 - 70%iges Ethanol (unvergällt)⁷
 - 90%iges Ethanol (unvergällt)⁷
 - 96%iges Ethanol (unvergällt)⁷
 - 100%iges Ethanol (unvergällt)⁷
- **Propylenoxid**⁵
- **Einbettmedium**
 - Epoxydharz Poly/Bed[®] 812 – BDMA Embedding Kit¹⁶
- **Uranylacetat**¹⁷
 - 7,7 g Uranylacetat
 - ad 100 ml Aqua bidest

- **Bleicitrat**

1,33 g Bleinitrat²⁰
 1,76 g Natriumcitrat
 + 30 ml Aqua bidest
 + 8 ml 1nNaOH
 ad 50 ml Aqua bidest

3.2.2.4 Fixierung und Organentnahme

Die Fixierung der Lungen für die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte mit dem Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch nach Karnovsky und wurde wie in Abschnitt 3.2.1.1.2 bereits beschrieben durchgeführt. Nach der Organentnahme (siehe 3.2.1.1.2) wurden die Proben für zwei weitere Stunden in Karnovsky-Fixierlösung gegeben. Die entnommenen Lungen wurden entlang des Primärbronchus eröffnet. An den gut sichtbaren Abgängen der Sekundärbronchen wurden ca. 1,5 x 1,5 x 5 mm große Proben entnommen. Diese wurden in 2,0 ml Tubes verbracht und mit 0,2 M Kakodylat-Puffer pH 7,4 mindestens 2 x 15 min gewaschen.

3.2.2.5 Einbettung in Kunstharz

Die Aufbereitung der Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie wurde wie folgt vorgenommen:

Fixation:	Lösung nach Karnovsky	4°C	insgesamt 3 h
Spülen:	Kakodylatpuffer	3 x	5 min
Kontrastierung:	Osmiumtetroxid-Kaliumferrocyanid		4 h
Spülen:	Kakodylatpuffer	3 x	5 min
Dehydrieren:	aufsteigende Alkoholreihe	2-3 x	15 min
	50 %, 70 %, 90 %, 100 %		
	Propylenoxid	2 x	15 min
Infiltration:	Propylenoxid-Epoxydharz (2:1)		1 h
	Propylenoxid-Epoxydharz (1:1)		über Nacht
	Propylenoxid-Epoxydharz (1:2)		12 h
	Epon (rein)		1 h

Die durchtränkten Proben wurden in Kautschukformen gesetzt und blasenfrei mit Epon umgossen. Die Polymerisation erfolgte bei 60 °C, 12 h.

3.2.2.6 Trimmen und Schneiden

Zunächst wurden die Blöcke mit einer Trimmvorrichtung angeschnitten. Danach wurden mit dem Ultramikrotom Ultracut E[®] der Firma Reichert-Jung Semi-dünnschnitte (1 µm) angefertigt, diese auf Objektträger aufgezogen und durch Auftropfen von Toluidinblau eingefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden die Schnitte auf der Wärmeplatte getrocknet und mit Eukitt[®] eingedeckt. Nun wurde der Block auf die für die Untersuchung interessanten Bereiche durch erneutes Trimmen reduziert. Es folgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten (60 nm), die auf Kupfernetzen positioniert und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert wurden (Protokoll 4). Die Betrachtung und Fotografie der Schnitte erfolgte mit dem Transmissionselektronenmikroskop vom Typ Zeiss EM902[®].

Uranylacetat 10 min
Waschen mit Aqua bidest.
Bleicitrat 1-2 min
Waschen mit Aqua bidest.

Protokoll 4: Kontrastierung der TEM Proben

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

3.2.3.7 Material

- **Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch nach Karnovsky 1:1 verdünnt (siehe Abschnitt 3.2.2.3)**
- **0,2 M Kakodylatpuffer pH 7,4 (s. 3.2.2.3)**
- **Acetonreihe**
 - 30%iges Aceton⁷
 - 50%iges Aceton⁷
 - 70%iges Aceton⁷
 - 90%iges Aceton⁷
 - 100%iges Aceton

- Raster-Probenteller¹⁷
- Leitsilber Leit-C^{®17}
- Goldtarget¹⁷

3.2.3.8 Fixierung und Organentnahme

Die Hühnerlungen wurden für die Rasterelektronenmikroskopie, wie in Abschnitt 3.2.2.4 bereits beschrieben, fixiert und die Lungen herausgenommen.

3.2.3.9 Durchführung

Die Lunge wurde entlang des Primärbronchus längs eröffnet. Die gut sichtbaren Abgänge der Bronchi mediodorsales wurden beim weiteren Präparieren stets geschont. Der Primärbronchus wurde entlang seiner Längsachse halbiert, so dass die Aufsicht auf die Bronchi mediodorsales möglich war (Abbildung 13).

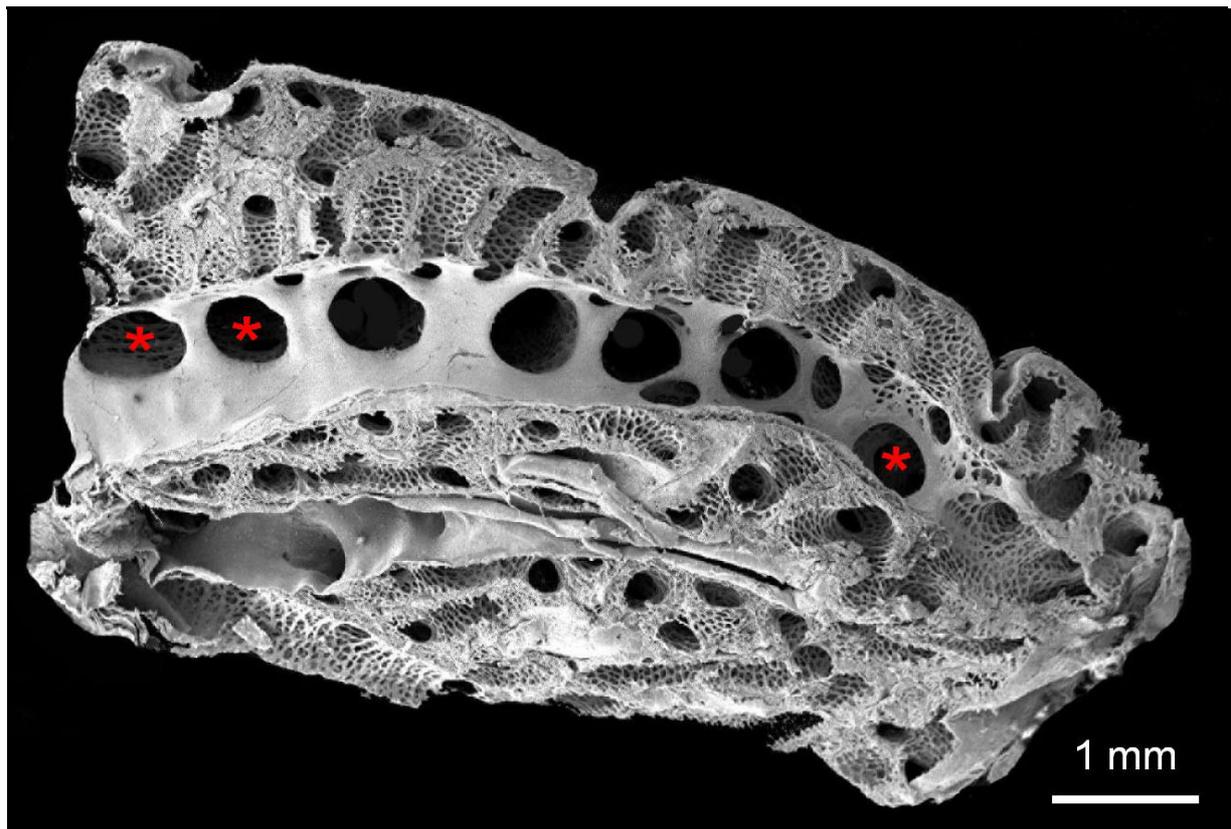


Abbildung 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Lunge eines 14 Tage alten Tieres.

Rechts im Bild ist das kaudale Ende der Lunge zu sehen. Die Sternchen (*) markieren den letzten und die beiden ersten sichtbaren Bronchi mediodorsales. Der Primärbronchus ist in seiner Längsachse über die Hälfte eröffnet.

Bei den älteren Tieren wurde die Lunge auf Grund ihrer Größe durch einen Transversalschnitt gekürzt. Anschließend wurden die Proben für zwei weitere Stunden in Karnovsky nachfixiert.

Die weitere Verarbeitung ist dem folgenden Protokoll zu entnehmen.

Spülen		
Kakodylatpuffer	3x	10 h
Dehydrieren über die aufsteigende Acetonreihe		
50%	2-3x	über Nacht
70%	2-3x	über Nacht
90%	2-3x	über Nacht
100%	2-3x	über Nacht

Protokoll 5: Verarbeitung der REM Proben nach der Fixierung

Die Proben wurden im Kritisch-Punkt-Apparat CPD 030 getrocknet und anschließend mit dem Sputtergerät SCD 004 gesputtert. Die fertigen Proben wurden mit dem Digital Scanning Microscope DSM950 von Zeiss analysiert und digital dokumentiert.

4 Ergebnisse

Alle Altersstufen wurden mit den Methoden der Lichtmikroskopie, Immunhistologie, Raster- und Elektronenmikroskopie untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im weiteren Verlauf altersabhängig besprochen, um einen Überblick über die Entwicklung der Hühnerlunge wiederzugeben.

Bei der Betrachtung der einzelnen Altersstufen ist eine altersabhängige Entwicklung des BALT bei den Tieren zu erkennen. Diese Entwicklung diente als Grundlage für die Einteilung in die vier Entwicklungsphasen (Tabelle 3), wobei an dieser Stelle betont werden soll, dass es sich hierbei um keine funktionelle, sondern um eine rein deskriptive Einteilung handelt, die der besseren Überschaubarkeit dienen soll.

Des Weiteren werden in jeder Entwicklungsphase der Primärbronchus, die Parabronchuswand und das interparabronchale Bindegewebe getrennt voneinander betrachtet. Im Bereich des interparabronchalen Gewebes ist es, für das Ansprechen der einzelnen Strukturen hilfreich, diese einer weiteren Unterteilung zu unterziehen. Aus diesem Grund wird zum einen das Bindegewebe zwischen zwei benachbarten Parabronchen als Septum bezeichnet (Abbildung 2), zum anderen der Bereich zwischen drei zusammentreffenden Parabronchen als Zwickel angesprochen (Abbildung 3). Auch in diesem Fall handelt es sich um keine funktionelle Trennung dieser Gewebe.

Entwicklungsphase	Untersuchte Altersstufen
Erste Entwicklungsphase	Tag 1, Tag 3 und 1. Woche
Zweite Entwicklungsphase	2., 3. und 4. Woche
Dritte Entwicklungsphase	6. und 8. Woche
Vierte Entwicklungsphase	12. Woche

Tabelle 3: Einteilung der untersuchten Altersstufen in Entwicklungsphasen.

4.1 Altersabhängige Entwicklung des lymphatischen Gewebes in der Hühnerlunge

4.1.1 Erste Entwicklungsphase (erster bis siebter Lebenstag)

Bei allen untersuchten Tieren überwiegen die Zellen der unspezifischen Immunabwehr deutlich über die der spezifischen Abwehr. Außerdem ist bei diesen Tieren kein mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe nachzuweisen. Innerhalb dieser Entwicklungsphase lassen sich so gut wie keine individuellen Unterschiede bei den untersuchten Tieren feststellen.

Primärbronchus

Im Rahmen der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der gesamte Primärbronchus von einem zilientragenden Epithel ausgekleidet ist. Lediglich um die Zugänge zu den Sekundärbronchen findet sich kein Flimmerepithel, sondern ein dünner Saum aus einem mikrovilliträgenden Epithel. Dabei ist der Mikrovillibesatz nicht kontinuierlich ausgebildet. Vielmehr finden sich immer wieder kleine zilientragende Inseln. Der Übergang des zilientragenden in den mikrovilliträgenden Bereich ist relativ scharf begrenzt (Abbildung 14 bis Abbildung 18).

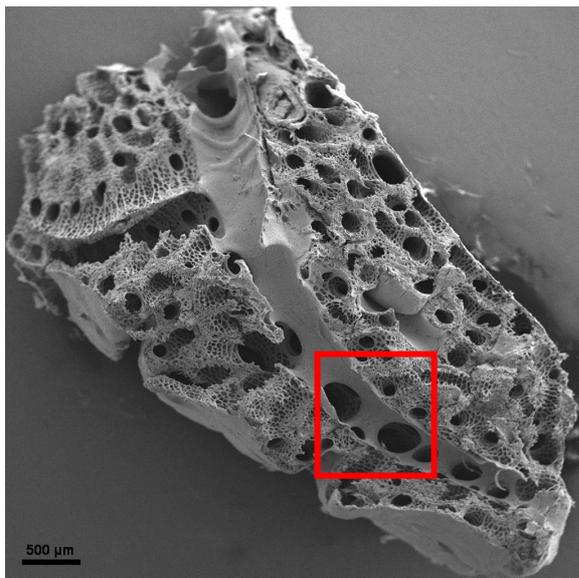


Abbildung 14: REM-Übersichtsaufnahme der Lunge eines Eintagsküchens.
Der Primärbronchus wurde entlang seiner Längsachse eröffnet.

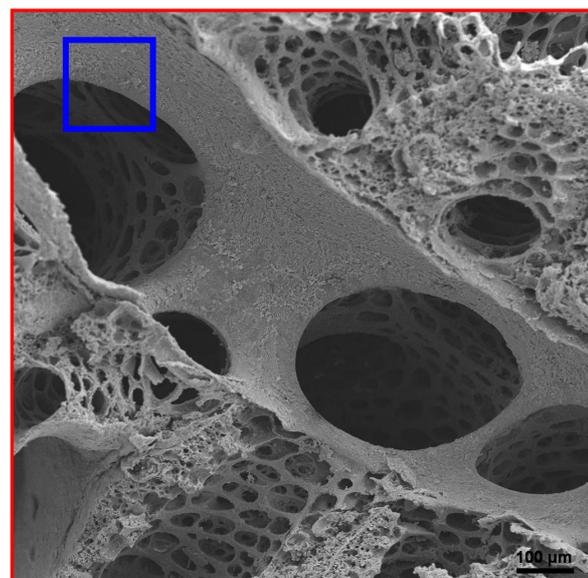


Abbildung 15: Vergrößerung des rot markierten Bereiches aus Abbildung 14.
Die Zugänge zu den Sekundärbronchen sind deutlich zu erkennen.

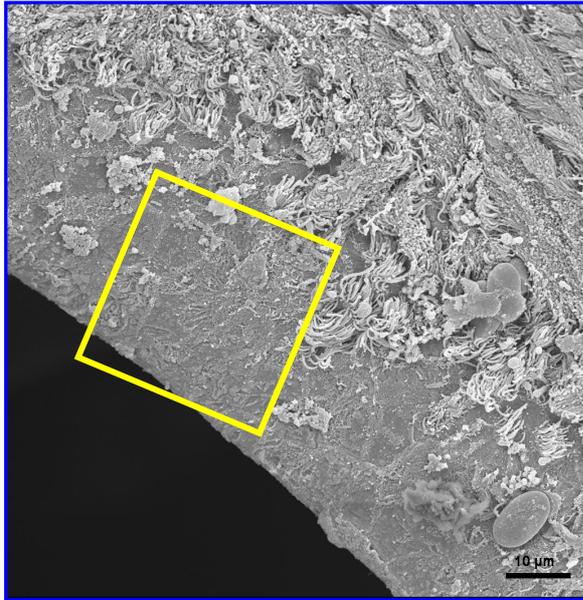


Abbildung 16: Vergrößerung des blau markierten Bereiches aus Abbildung 15.
Der Zugang zum Sekundärbronchus weist einen zilienfreien Bereich auf.

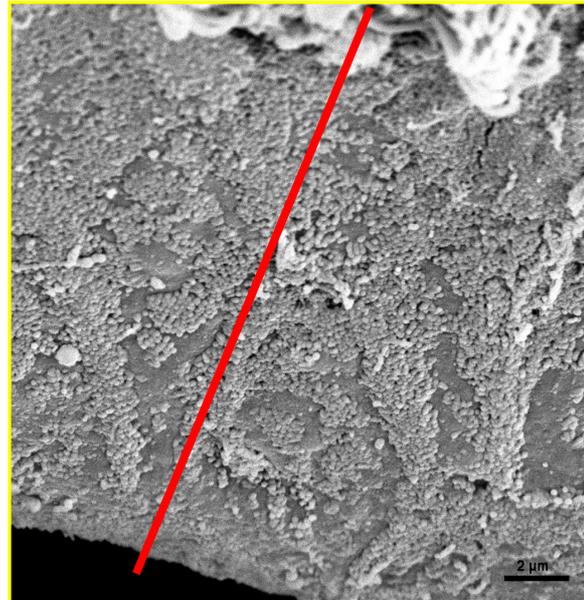


Abbildung 17: Stärkere Vergrößerung des gelb markierten, zilienfreien Bereiches aus Abbildung 16.
Die Zellen des zilienfreien Bereiches tragen Mikrovilli. Die rote Linie zeigt die Schnittebene für den folgenden Semidünnschnitt (Abbildung 18).

Bei der Betrachtung der Sekundärbronchuszugänge an Semidünnschnitten ist die Grenze von zilientragend zu zilienlos ebenfalls deutlich zu erkennen. Dabei fällt auf, dass die Becherzellen sich auf den zilientragenden Bereich beschränken und das Epithel deutlich an Höhe verliert, so dass das ursprünglich hochprismatische Epithel zu einem flachen Epithel geworden ist.

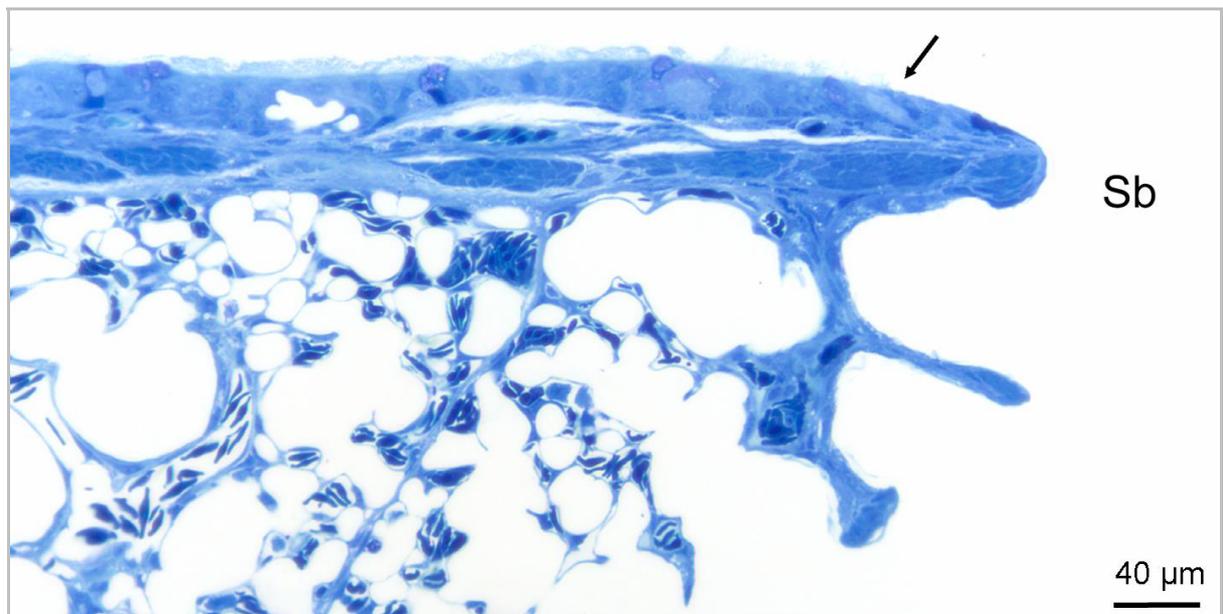


Abbildung 18: Semidünnschnitt des Primärbronchus eines Eintagsküekens.
Das Epithel des Primärbronchus weist kurz vor dem Abgang eines Sekundärbronchus (Sb) keine Zilien mehr auf. Der Pfeil kennzeichnet die Grenze von zilientragendem zu zilienlosem Epithel (Tuloidinblau nach Richardson).

In der Lamina propria liegt eine kleine Zahl $CD45^+$ Zellen diffus verteilt. Diese bestehen fast ausschließlich aus Zellen der unspezifischen Abwehr ($Kul1^+$). Die Zahl dieser $CD45^+$ Zellen nimmt von den jungen zu den älteren Tieren leicht zu (Abbildung 29 und Abbildung 30). Zellen der spezifischen Abwehr hingegen kommen deutlich seltener vor, wobei ihre Zahl analog zu den Zellen der unspezifischen Abwehr innerhalb der ersten Lebenswoche leicht ansteigt (Abbildung 33). Es handelt sich bei diesen Zellen primär um $CD3^+$ T-Zellen, die zum Großteil $CD4^+$ sind und den TCR2 Rezeptor tragen. Dagegen konnten $CD8^+$ T-Zellen nur sporadisch dargestellt werden. Der Nachweis von B-Zellen gelang erst bei sieben Tage alten Tieren (Abbildung 19 und Abbildung 20).

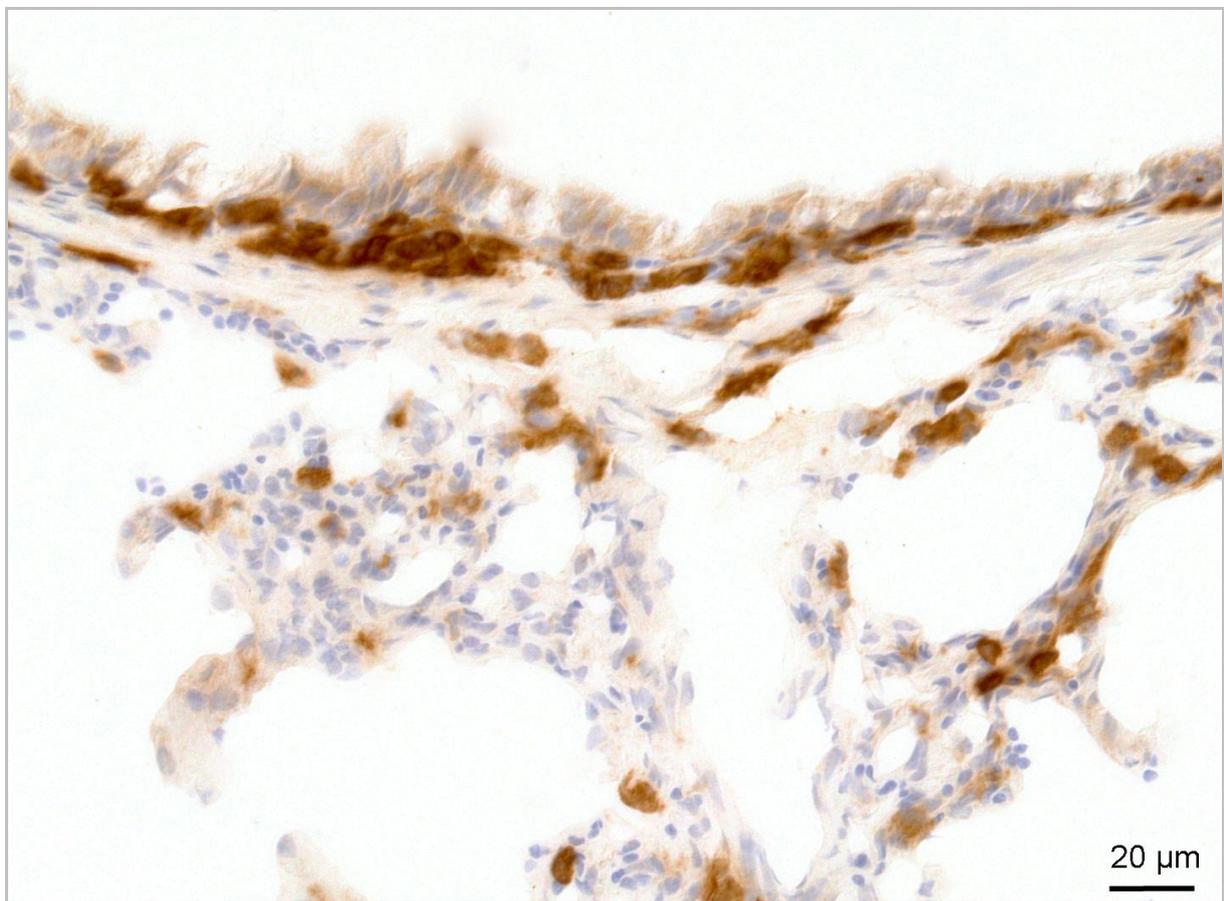


Abbildung 19: In der Lamina propria dieses sieben Tage alten Tieres sind deutliche Ansammlungen von $CD45^+$ Zellen zu erkennen.

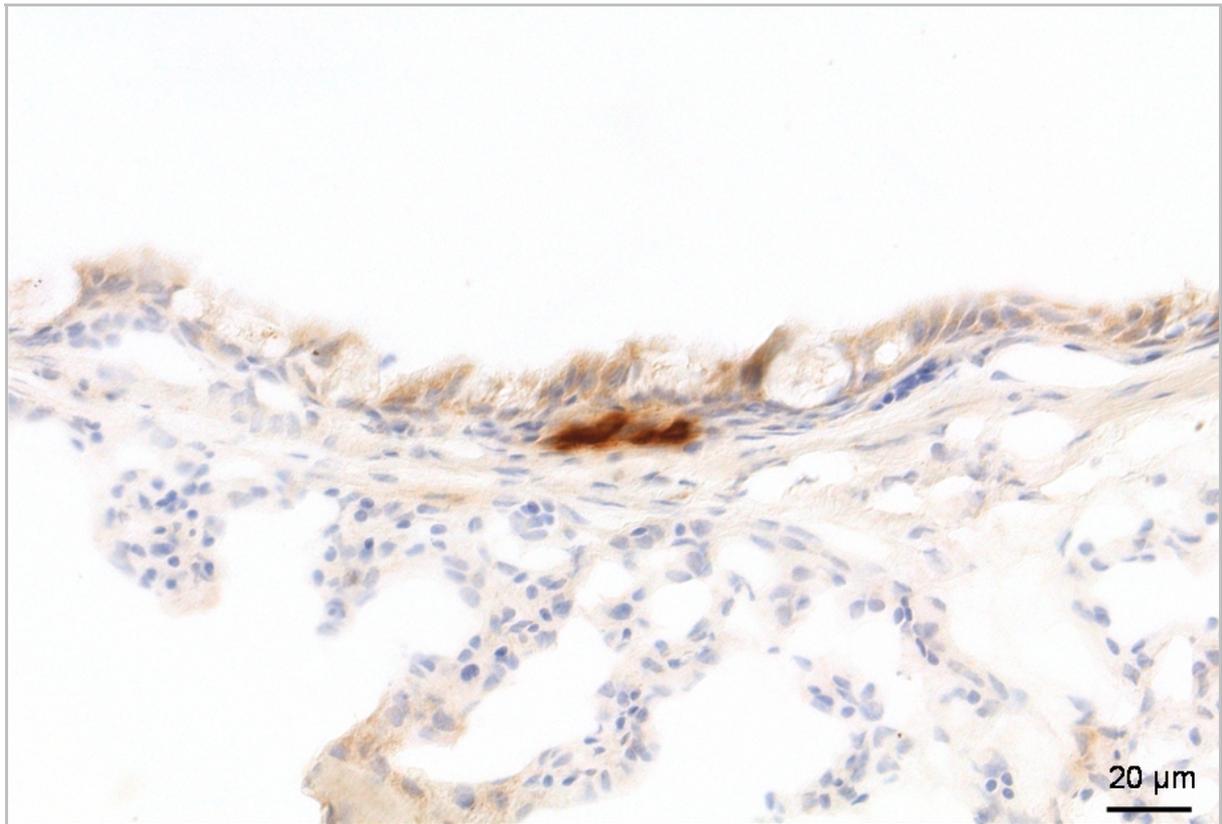


Abbildung 20: Im Primärbronchus desselben Tieres wie in Abbildung 19 werden erste B-Zellen gesehen.

Parabronchale Wand

Die Oberflächenstruktur der parabronchalen Wand, bestehend aus den Atrienwänden und den Firsten der interatrialen Septen, wurden mit dem REM untersucht. Beide Oberflächen zeigten eine Fältelung, die sich in der Höhe der Falten deutlich unterscheidet. Über den Firsten der Atrien sind die Falten flach und relativ breit. Die Seitenwände der Atrien hingegen sind mit dicht nebeneinander stehenden, hohen Falten ausgekleidet (Abbildung 21 bis Abbildung 24).

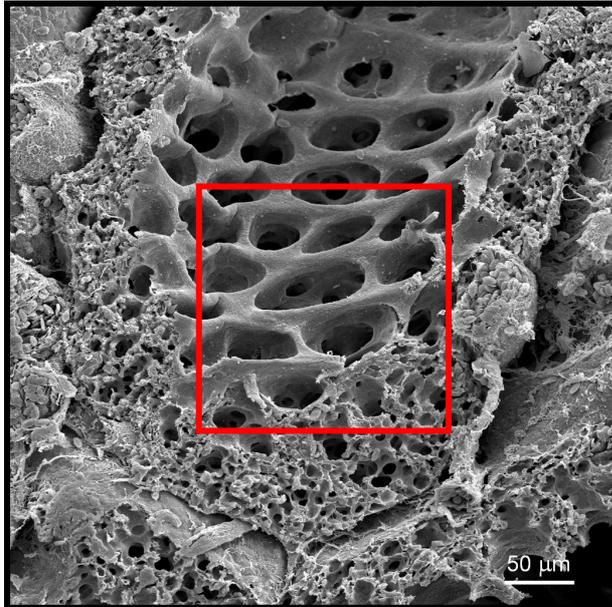


Abbildung 21: Zu sehen ist ein Ausschnitt eines teilweise längseröffneten Parabronchus von einem sieben Tage alten Tier.

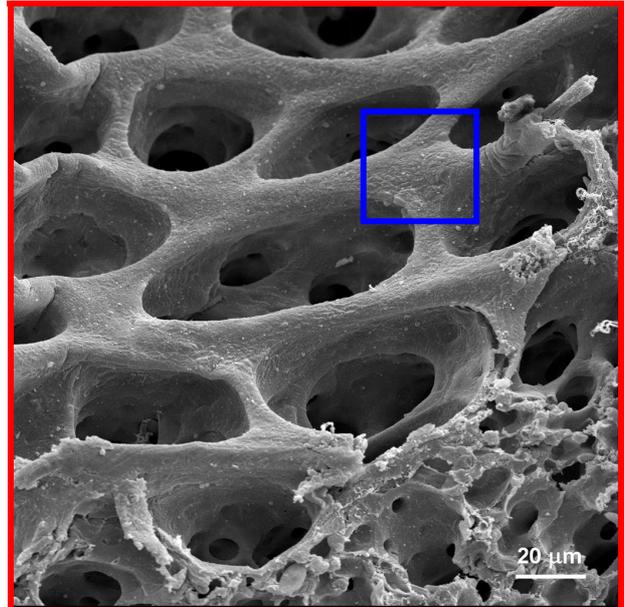


Abbildung 22 gibt den in Abbildung 21 rot markierten Bereich vergrößert wieder.

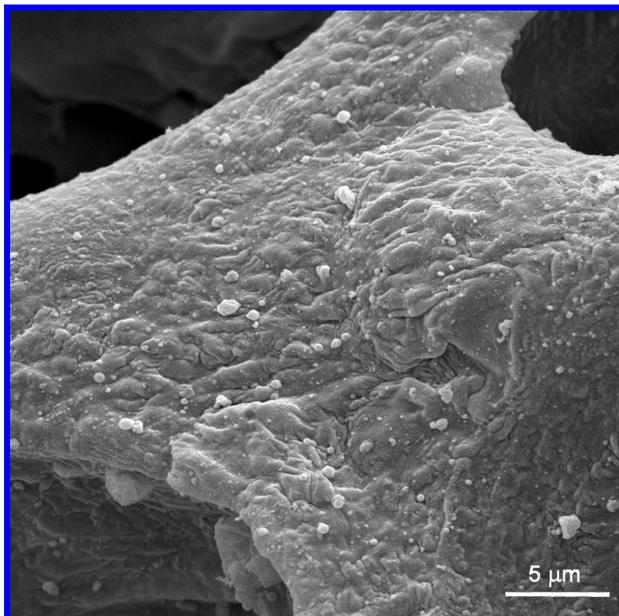


Abbildung 23 zeigt den in Abbildung 22 blau markierten Bereich stärker vergrößert.

Die lumenseitige Wand des Parabronchus zeigt auf seiner Oberfläche und in den Atrienzugängen eine deutliche Faltenbildung.

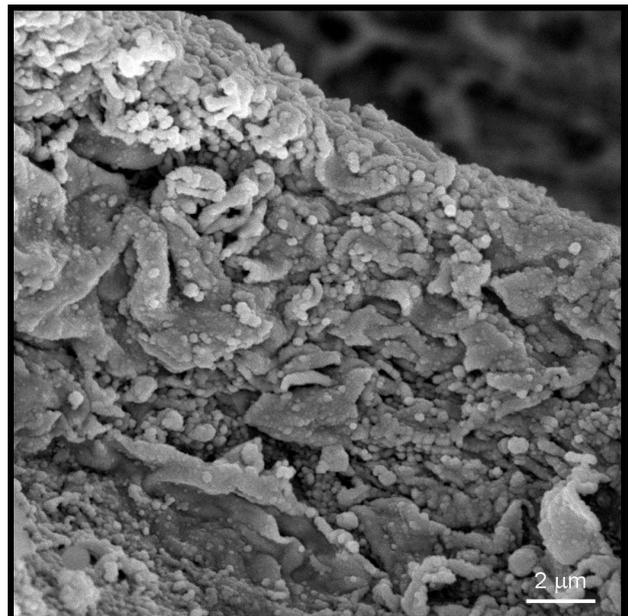


Abbildung 24 zeigt die Innenauskleidung eines Atriums bei einem drei Tage alten Tier.

Das Epithel trägt deutliche Falten zur Oberflächenvergrößerung.

In der immunhistologischen Untersuchung lassen sich die oben beschriebenen Epithelzellen nicht mit anti-CD45 Antikörpern anfärben. Hingegen konnten subepithelial in der Wand der Parabronchen zahlreiche CD45⁺ Zellen detektiert werden, die gleichmäßig sowohl über die Septen der Atria und Infundibula als auch über die Luftkapillaren verteilt sind (Abbildung 25). Mit zunehmendem Alter erfährt

ihre Zahl einen deutlichen Anstieg, wobei sie zum Teil in kleinen Ansammlungen zusammen liegen (Abbildung 29 und Abbildung 30). Den größten Teil der CD45⁺ Zellen nehmen in allen Altersstufen die Zellen der unspezifischen Abwehr (Kul1⁺) ein, gefolgt von den deutlich seltener vorkommenden T-Zellen und nur vereinzelt B-Zellen. Dabei zeigen die Kul1⁺ Zellen (Tabelle 2) zunächst ein gleichmäßiges Verteilungsmuster über die Parabronchenwand. Die Lymphozyten hingegen sind vermehrt an der Basis der Infundibula und im Bereich der Luftkapillaren anzutreffen (Abbildung 26 und Abbildung 27). Mit zunehmendem Alter der Tiere steigt die Zahl der Lymphozyten leicht an, jedoch verändert sich deren Lokalisation kaum (Abbildung 31 und Abbildung 32). Anders sieht das für die Kul1⁺ Zellen aus, deren Zahl sich innerhalb der ersten Lebenswoche fast verdoppelt, wobei diese Zunahme zur Hauptsache die interatrialen Septen betrifft. Ab dem dritten Lebenstag sind diese Kul1⁺ Zellen sowohl in den Septen der Atrien als auch im Bereich der Luftkapillaren zu kleinen Gruppen zusammengelagert.

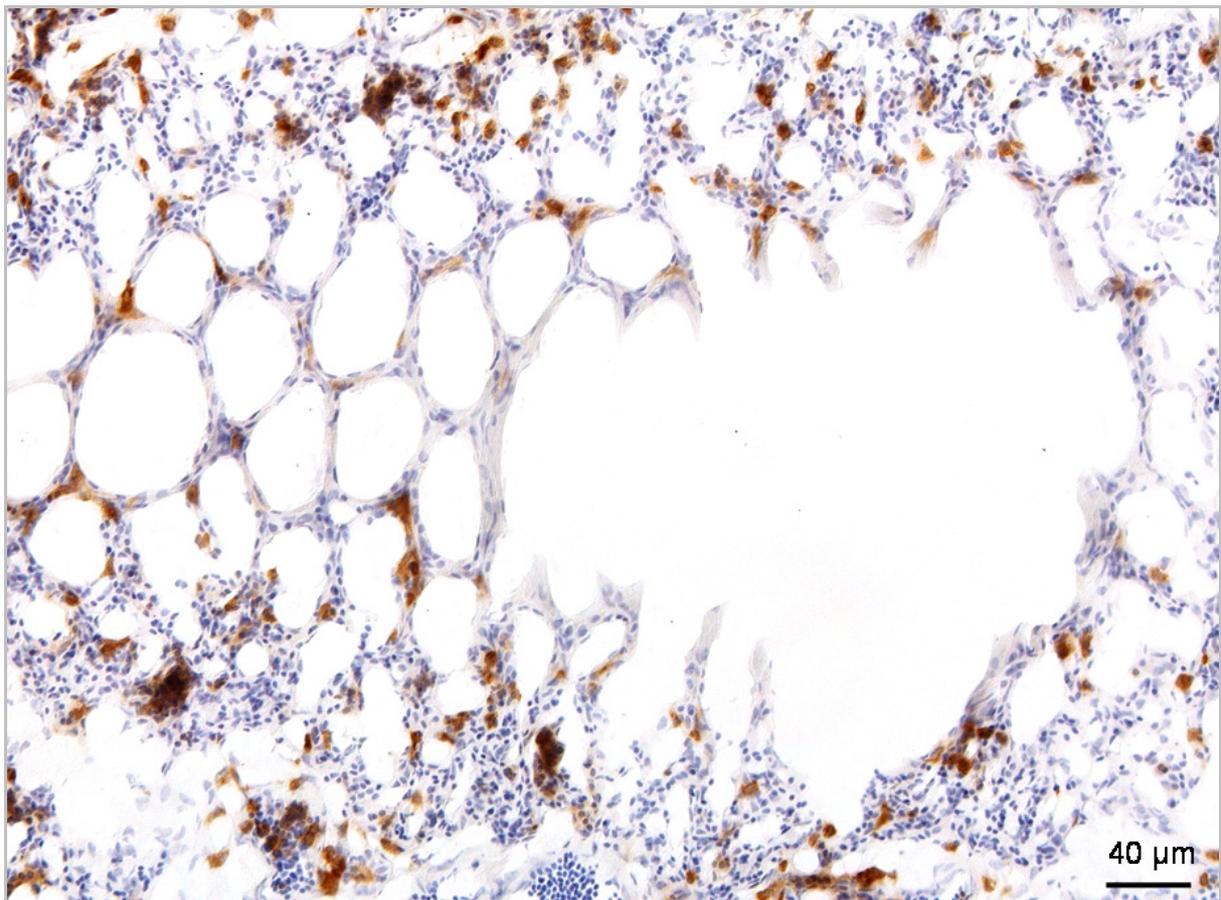


Abbildung 25: CD45 Färbung im Parenchym eines Eintagsküchens.

Die nachgewiesenen T-Zellen dieser Tiere sind fast ausschließlich $CD4^+$ und tragen überwiegend den TCR2 Rezeptor. Unter den T-Zellen sind kaum $CD8^+$ Zellen zu finden. Jedoch ist in dieser Altersphase auffällig, dass die Summe der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen bei weitem nicht die Zahl der $CD3^+$ T-Zellen erreicht. Die wenigen $AV20^+$ Zellen zeigen innerhalb der interparabronchalen Wand keine bevorzugte Lokalisation.

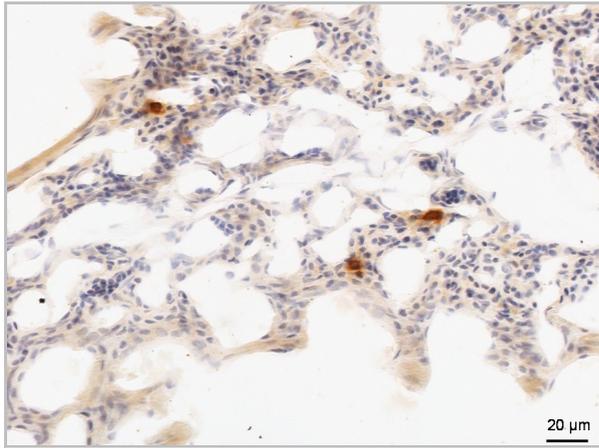


Abbildung 26: AV20 positive Zellen am Querschnitt eines Parabronchus (Eintagsküken).

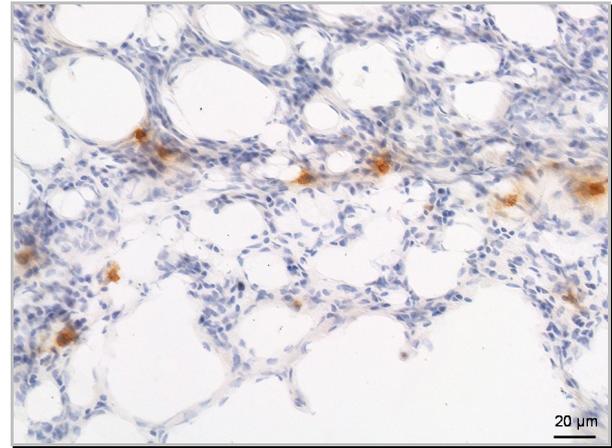


Abbildung 27: T-Zellverteilung im Parenchym eines Eintagsküchens.

Interparabronchale Septen und Zwickel

Im bindegewebigen Septum zwischen den einzelnen Parabronchen (Abbildung 2) lassen sich $CD45^+$ Zellen nachweisen, deren Häufigkeit mit dem Alter zunimmt und bei den älteren Tieren dieser Entwicklungsphase auch in kleinen Gruppen anzutreffen sind. Diese Leukozyten bestehen altersabhängig aus verschiedenen Zellen und weisen in ihrer Lokalisation deutliche Unterschiede auf. Für die Eintagsküken kann gesagt werden, dass es sich fast ausschließlich um Zellen der unspezifischen Immunabwehr handelt, die gleichmäßig über das gesamte interparabronchale Bindegewebe verteilt sind. Ein anderes Bild zeigt sich bei den sieben Tage alten Tieren. Die Zunahme der $CD45^+$ Zellen betrifft überwiegend die interparabronchalen Zwickel (Abbildung 3), in denen eine Konzentrierung und Aggregation dieser Zellen festzustellen ist. Diese Aggregate bestehen überwiegend aus $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 28) und nur einer geringen Zahl von $Kul1^+$ Zellen. $CD8^+$ T-Zellen kommen ebenfalls nur vereinzelt vor. Auch im Bereich der interparabronchalen Septen fällt auf, dass die Zahl der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen weit unter der Zahl der $CD3^+$ T-Zellen liegt. Im restlichen interparabronchalen

Bindegewebe dominieren dagegen weiterhin, auch bei den Tieren dieser Altersstufe, die Zellen der unspezifischen Abwehr das Bild. B-Zellen ließen sich im interparabronchalen Septum nur sehr selten nachweisen.

Bei allen Tieren dieser Entwicklungsphase können an den Blutgefäßen, die in den Zwickeln verlaufen, Leukozyten in den Wänden beobachtet werden. Diese Infiltrate bestehen zunächst ausschließlich aus $Kul1^+$ Zellen, zu denen mit zunehmendem Alter wenige Lymphozyten hinzukommen. Dabei handelt es sich vor allem um T-Zellen.

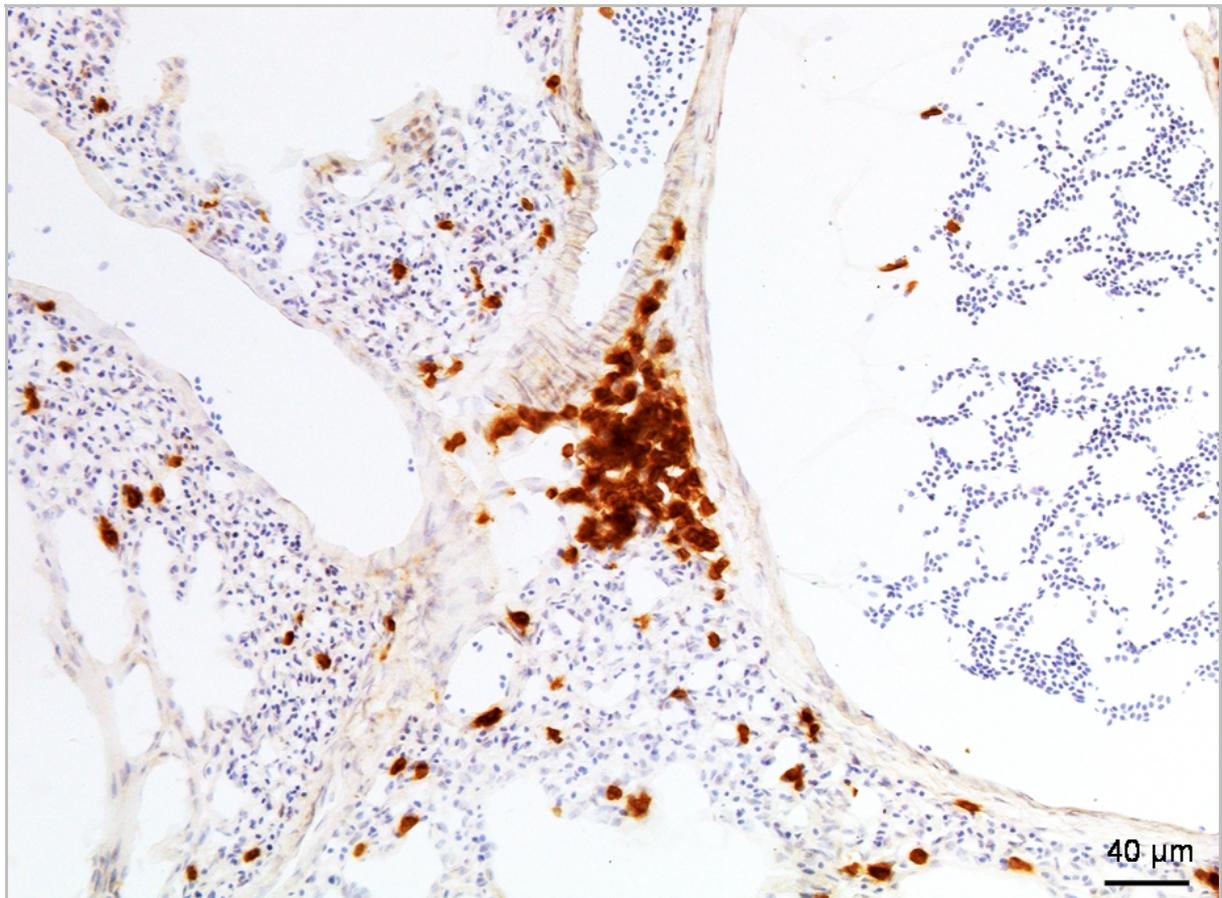


Abbildung 28: Perivaskuläre T-Zellansammlung bei einem sieben Tage alten Tier im Bereich eines Zwickels.



Abbildung 29: CD45 Färbung bei einem Eintagsküken.
Über die gesamte Lunge ist eine große Zahl von CD45⁺ Zellen diffus verteilt.

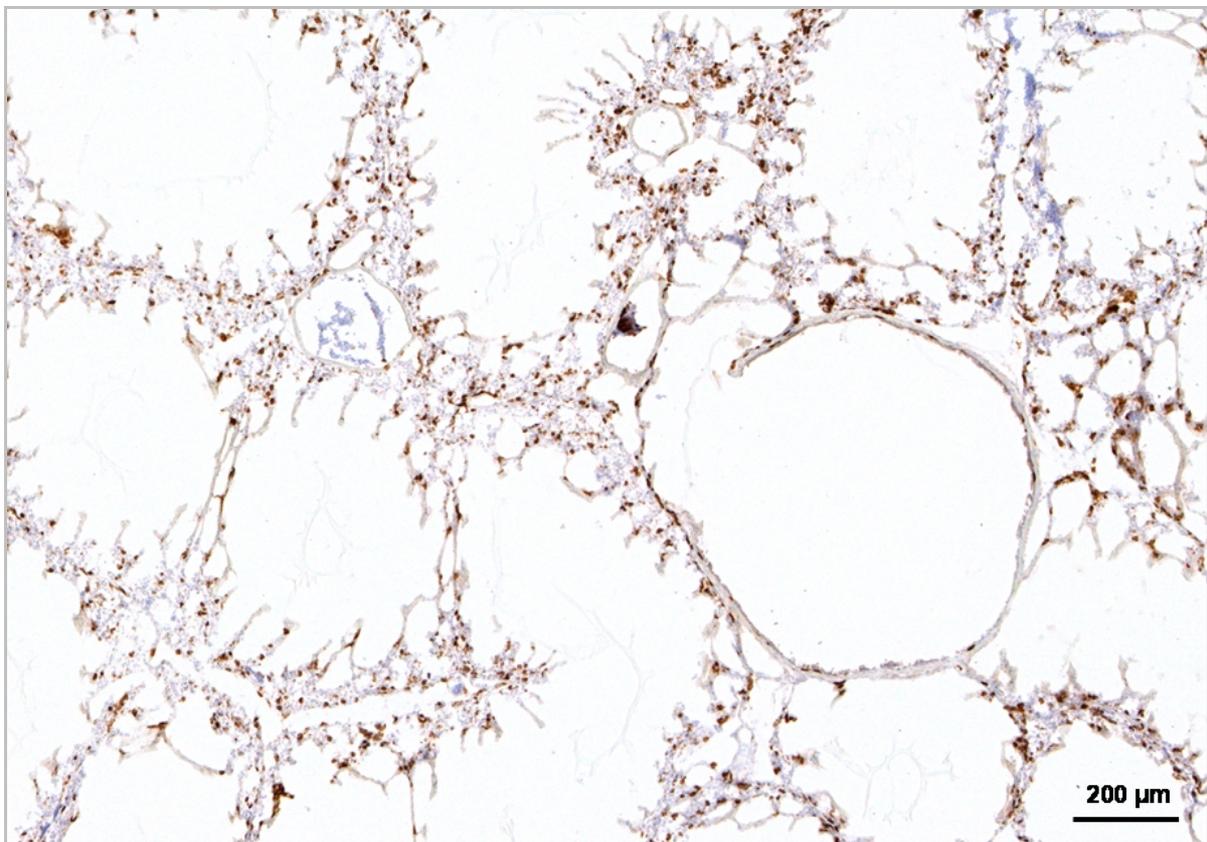


Abbildung 30: CD45 Färbung bei einem drei Tage alten Tier.
Im Vergleich zur Lunge des Eintagsküken aus Abbildung 29 hat die Zahl der CD45⁺ Zellen deutlich zugenommen.

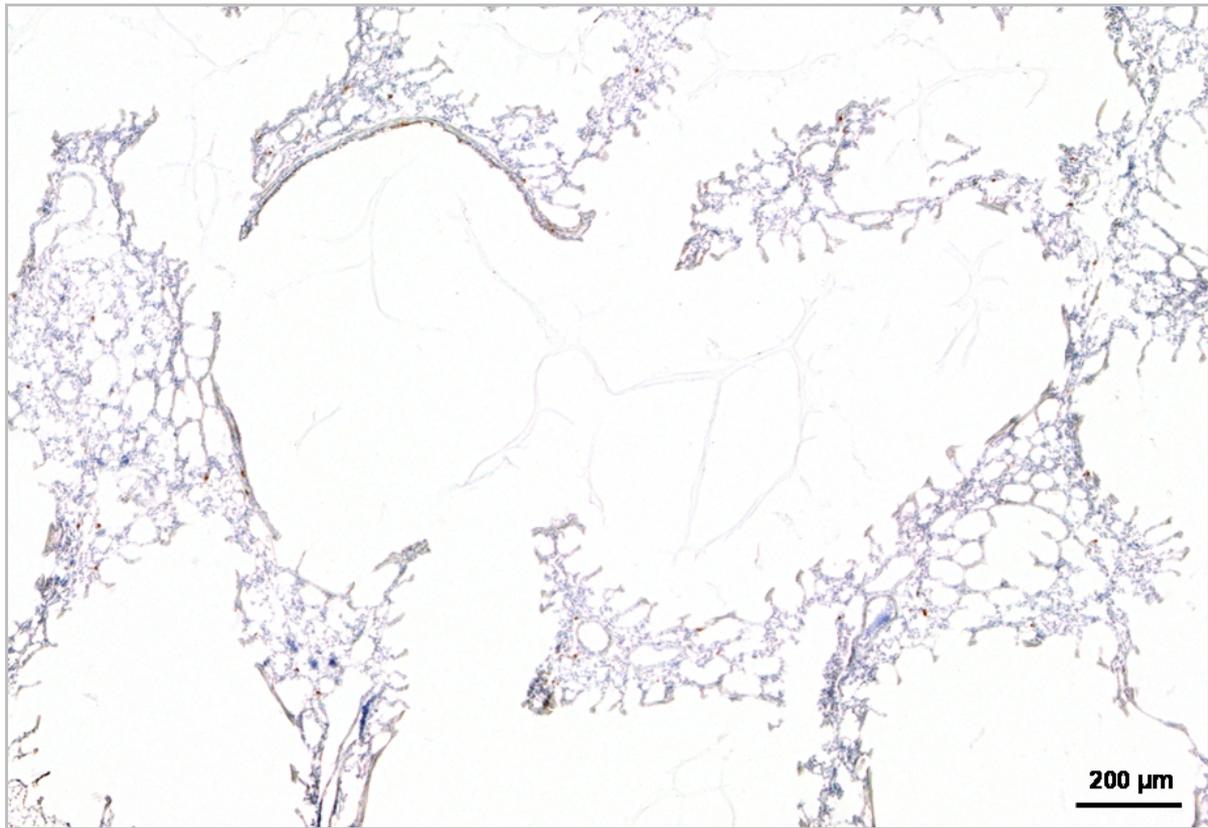


Abbildung 31: Überblick vom Querschnitt eines Primärbronchus und von Parabronchen anhand einer CD3 Färbung beim Eintagsküken.

Zu diesem Zeitpunkt sind T-Zellen in der Lunge nur selten anzutreffen.

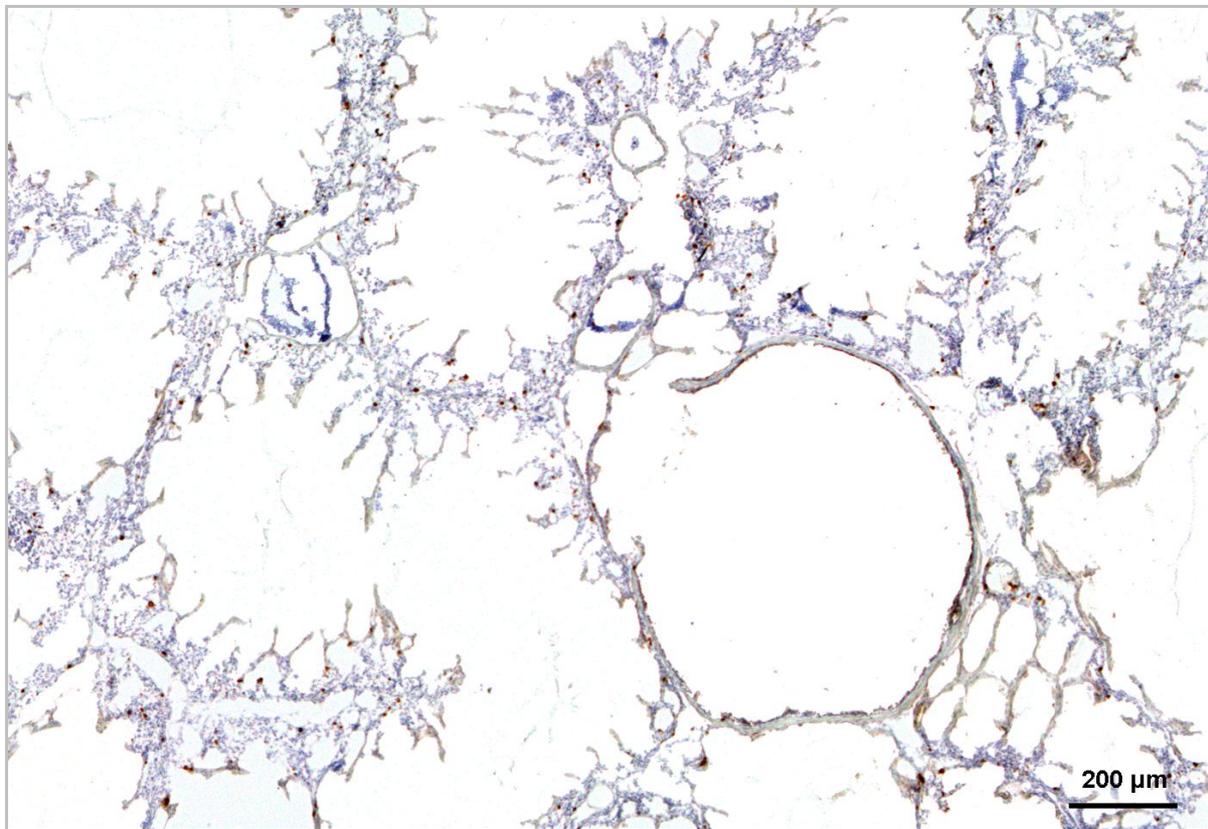


Abbildung 32: Überblick über die Verteilung von CD3⁺ T-Zellen bei einem 3 Tage alten Tier.
Die Zahl der T-Zellen zeigt im Vergleich zum Eintagsküken (Abbildung 31) einen leichten Anstieg.

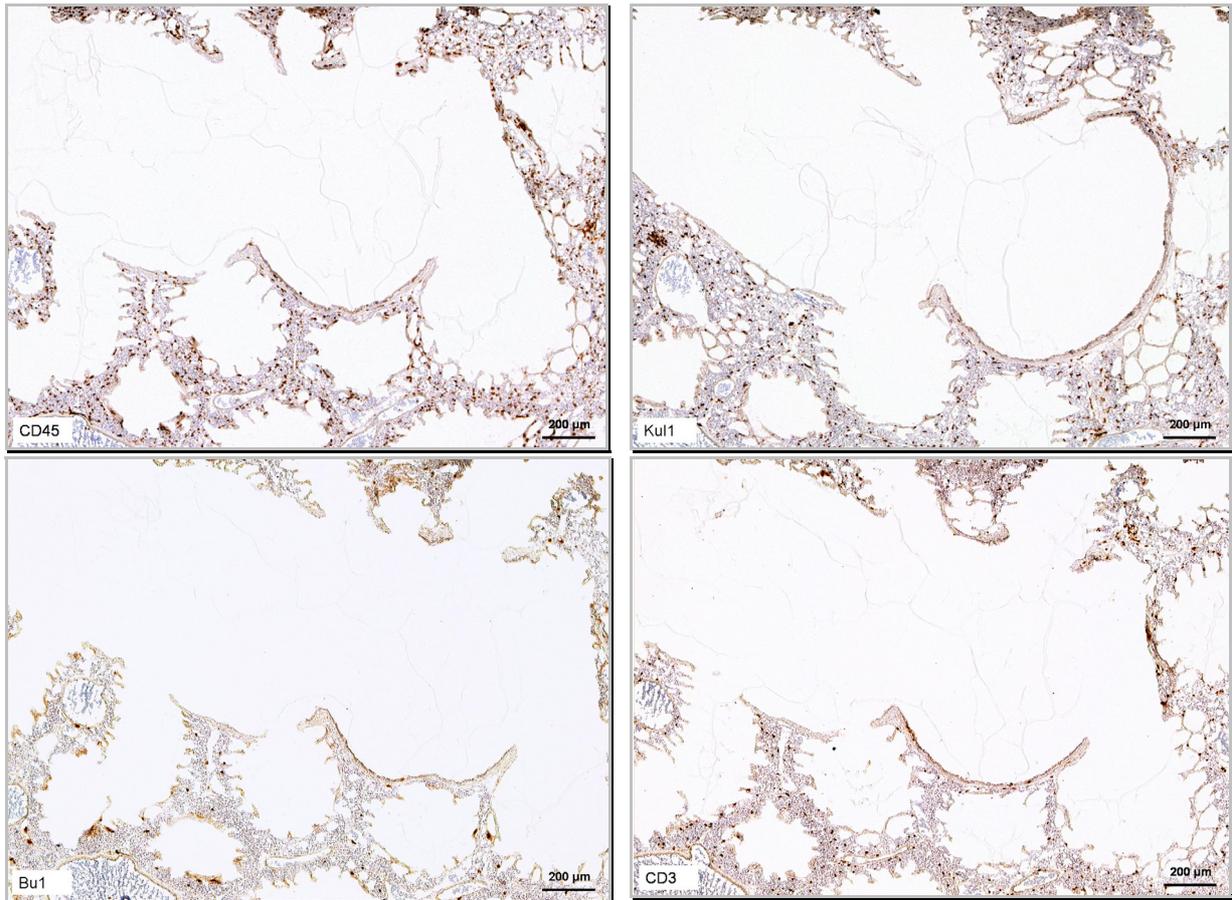


Abbildung 33: Querschnitt des Primärbronchus eines sieben Tage alten Tieres.

4.1.2 Zweite Entwicklungsphase (zweite bis fünfte Lebenswoche)

Innerhalb dieser Phase erfährt die Zahl der Leukozyten und insbesondere der Lymphozyten in der Wand des Primärbronchus eine starke Zunahme. Eine Separierung in T- und B-Zell-Bereiche lässt sich allerdings nicht erkennen. Im Vorkommen der T-Zell-Subpopulation verändert sich das Bild insofern, als dass die Zahl der CD8⁺ T-Zellen einen Anstieg erfährt und sich der Zahl der CD4⁺ T-Zellen angleicht. Die Verteilung auf die T-Zell-Rezeptoren bleibt unverändert zugunsten des TCR2-Rezeptors. Mit der dritten Lebenswoche lassen sich zunehmend Unterschiede in der individuellen Entwicklung des lymphatischen Systems in der Lunge feststellen.

Primärbronchus

Rasterelektronenmikroskopisch lässt sich bei einzelnen Tieren dieser Entwicklungsphase am Übergangsbereich des Primär- zu einigen Sekundärbronchen eine leichte Erhabenheit beobachten (Abbildung 35 und Abbildung 36). Dabei zeigt der Primärbronchus den bereits in der Entwicklungsphase zuvor beschriebenen

zilienlosen Abschnitt um die Zugänge zu den Sekundärbronchen. Nur bei einem der drei Wochen alten Tiere konnten Sekundärbronchenzugänge gefunden werden, deren Randbereich diskontinuierlich bis an seine Kante mit kleinen Feldern von Zilien überzogen war (Abbildung 37). Bei genauerer Betrachtung dieser Regionen fällt auf, dass die zilienlose Bereiche Mikrovilli unterschiedlicher Höhe tragen, wodurch ein schachbrettartiges Muster entsteht (Abbildung 38).

Mit Hilfe der immunhistologischen Untersuchungsmethode lässt sich im Primärbronchus der zwei und drei Wochen alten Tiere eine leichte Zunahme der CD45⁺ Zellen zeigen, die unregelmäßig in der Lamina propria zu finden sind. Den weitaus größten Teil dieser Zellen bilden weiterhin die Kul1⁺ Zellen, zu denen sich vereinzelt B- und T-Zellen hinzugesellen. Ein etwas anderes Bild ist bei einem der drei Wochen alten Tiere zu sehen, das sehr deutliche Leukozyteninfiltrate aufweist, die nun wie ein dünner Teppich über die gesamte Lamina propria des Primärbronchusquerschnitts verteilt sind. Diese bestehen in ihrer Mehrzahl aus T-Zellen, die die Zellen der unspezifischen Abwehr deutlich in den Hintergrund gedrängt haben (Abbildung 44). Die Lymphozytenpopulation setzt sich jedoch unabhängig vom Ausmaß der Primärbronchusinfiltration überwiegend aus T-Zellen zusammen, die vor allem CD4⁺ sind und den $\alpha/\nu\beta 1$ TCR tragen. Auffällig ist bei allen Tieren dieser Entwicklungsphase, dass die Zahl der B-Zellen deutlich zugenommen hat.

Unter den vier Wochen alten Tieren sind ebenfalls individuelle Unterschiede betreffend der Größe der Leukozyteninfiltrate zu sehen. Trotzdem kann für alle drei Tiere zusammenfassend gesagt werden, dass die Zahl der AV20⁺ B-Zellen im Primärbronchus deutlich zugenommen hat, so dass sie sich der Menge an T-Zellen langsam annähert. Auch die CD8⁺ T-Zellen haben einen Anstieg erfahren, so dass sie nun zu etwa gleichen Zahlen wie die CD4⁺ T-Zellen vorkommen. Die meisten dieser T-Zellen sind TCR2⁺ und tragen nur vereinzelt den TCR1 Rezeptor. Im Epithel des Primärbronchus sind keine TCR1⁺ Zellen zu beobachten. Bei der Betrachtung der T-Zell-Subpopulationen lässt sich ein diffuses Verteilungsmuster erkennen.

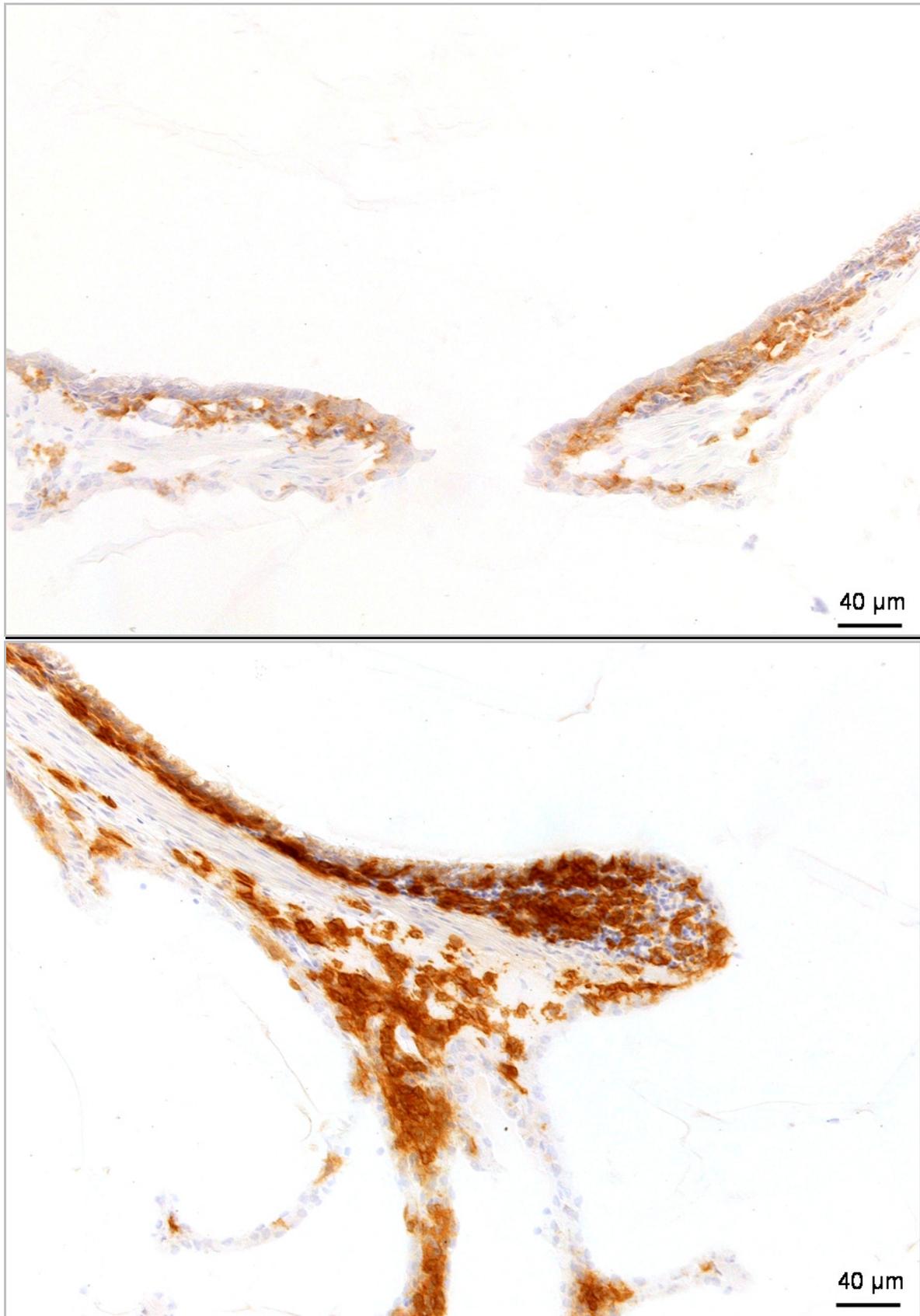


Abbildung 34: CD45 Färbung im Primärbronchus von drei Wochen alten Hühnern.
Die Tiere zeigen im Vergleich eine sehr unterschiedliche Menge an CD45⁺ Zellen.

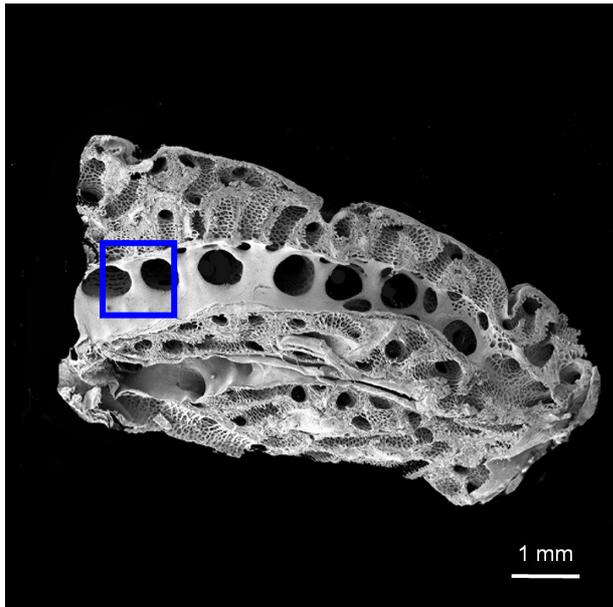


Abbildung 35: Übersichtsaufnahme von der Lunge eines zwei Wochen alten Tieres. Der Primärbronchus ist längseröffnet und ermöglicht eine freie Sicht auf die Sekundärbronchenabgänge.

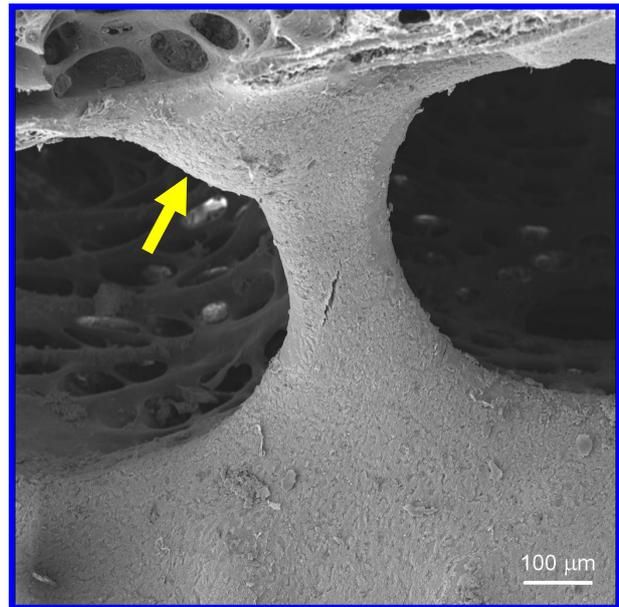


Abbildung 36: Vergrößerung des blau markierten Bereiches aus Abbildung 35. An der Zutrittsöffnung zum Sekundärbronchus ist eine leichte Vorwölbung zu erkennen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um BALT.

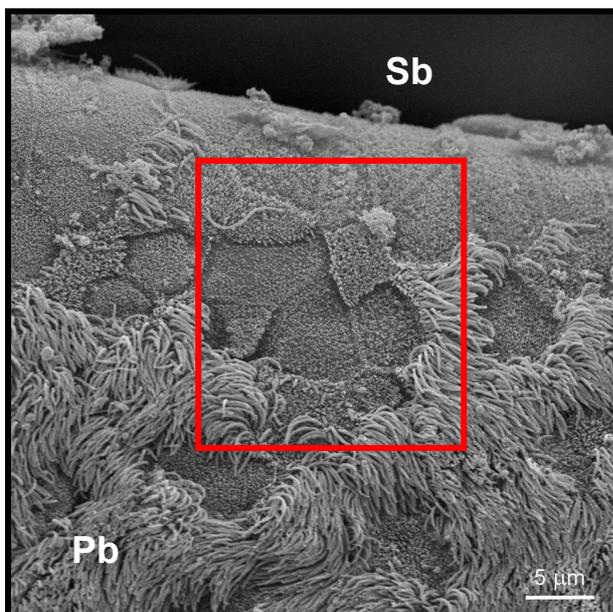


Abbildung 37 zeigt den Übergang Pb zu Sb eines drei Wochen alten Tieres. Die Kante trägt teilweise bis an ihren Umschlagspunkt Zilien. Im zilienfreien Bereich finden sich Zellen, die unterschiedlich hohe Mikrovilli besitzen und so zu einem schachbrettartigen Muster führen. Primärbronchus (Pb), Sekundärbronchus (Sb).

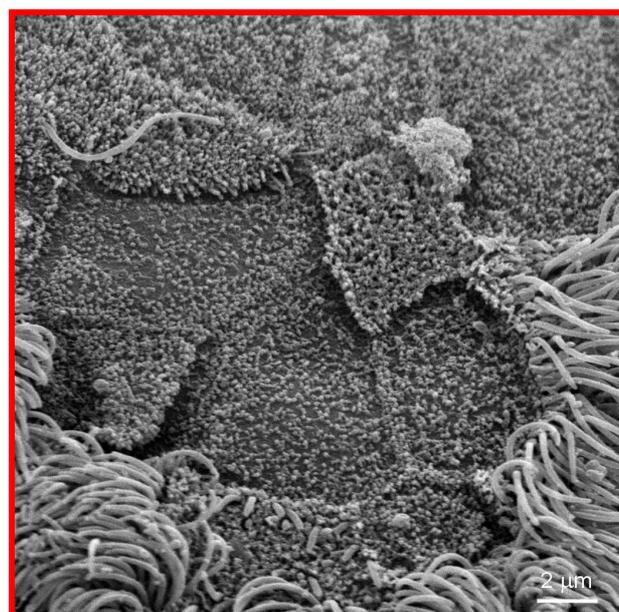


Abbildung 38 gibt den in Abbildung 37 rot markierten Bereich vergrößert wieder. Es sind Epithelzellen zu erkennen, deren Mikrovilli eine unterschiedliche Höhe aufweisen.

Parabronchale Wand

Wie die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung ergab, zeigte das Oberflächenrelief der Atrienwände, wie in der ersten Entwicklungsphase (1. bis 7. Lebenstag) beschrieben, eine starke Fältelung (Abbildung 39 und Abbildung 40). Im Abschnitt der parabronchalen Wand hat die Häufigkeit kleiner Leukozytenansammlungen zugenommen (Abbildung 41). Sie sind in allen Bereichen der Parabronchuswand anzutreffen und bestehen, bei Zunahme der Lymphozytenzahl, in ihrer Hauptsache aus $Kul1^+$ Zellen. Lediglich bei einem Tier konnte zwischen den Luftkapillaren eine deutliche Ansammlung von T-Zellen beobachtet werden. In der Lymphozytenpopulation dominieren weiterhin die T-Zellen und zeigen in ihrer Verteilung auf die Subpopulationen folgendes Bild: bei den zwei und drei Wochen alten Tieren handelt es sich meist um $CD4^+$ Zellen, hingegen besitzen die vier Wochen alten Tiere gleich viele $CD4^+$ wie $CD8^+$ T-Zellen. Die B-Zellen sind in dieser Entwicklungsphase regelmäßig, wenn auch in kleiner Zahl nachweisbar und sind jetzt auch an den Atrienzugängen lokalisiert. Bei den vier Wochen alten Tieren sind in der parabronchalen Wand individuelle Unterschiede in der Leukozytenzahl festzustellen (Abbildung 43), wobei die grundsätzliche Verteilung auf Zellen der spezifischen und unspezifischen Abwehr nicht individuell verschieden ist und den Verhältnissen bei den drei Wochen alten Tieren entspricht.

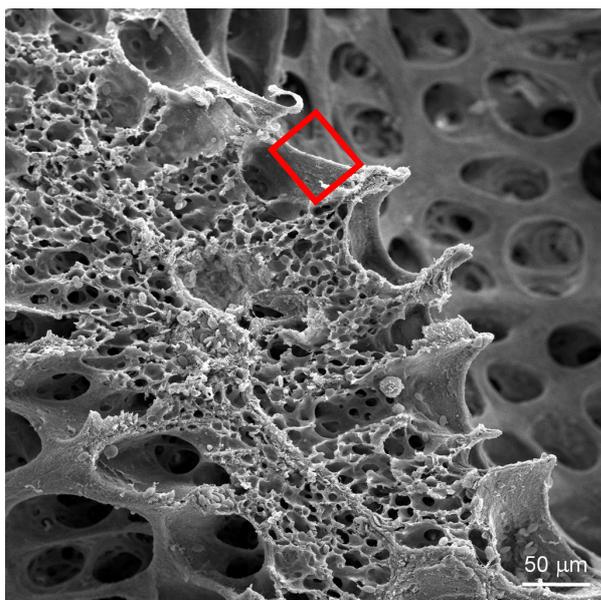


Abbildung 39: Längsschnitt durch die Parabronchuswand eines drei Wochen alten Tieres.

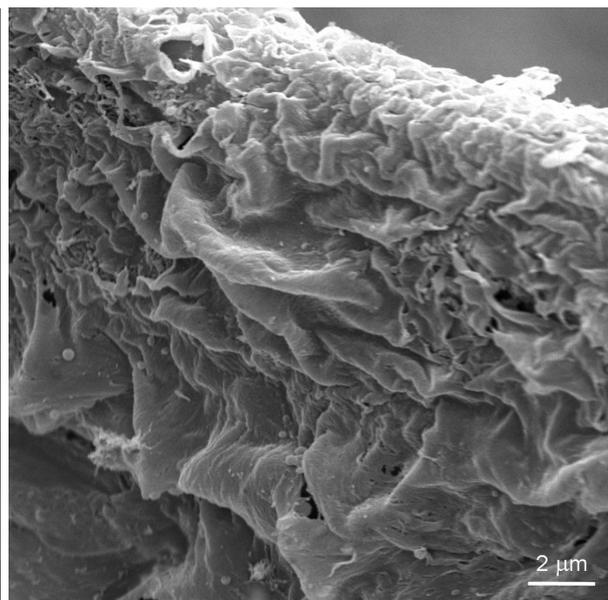


Abbildung 40 zeigt die Vergrößerung des rot markierten Bereiches aus Abbildung 39. Die Innenwand des Atriums trägt deutliche Falten.

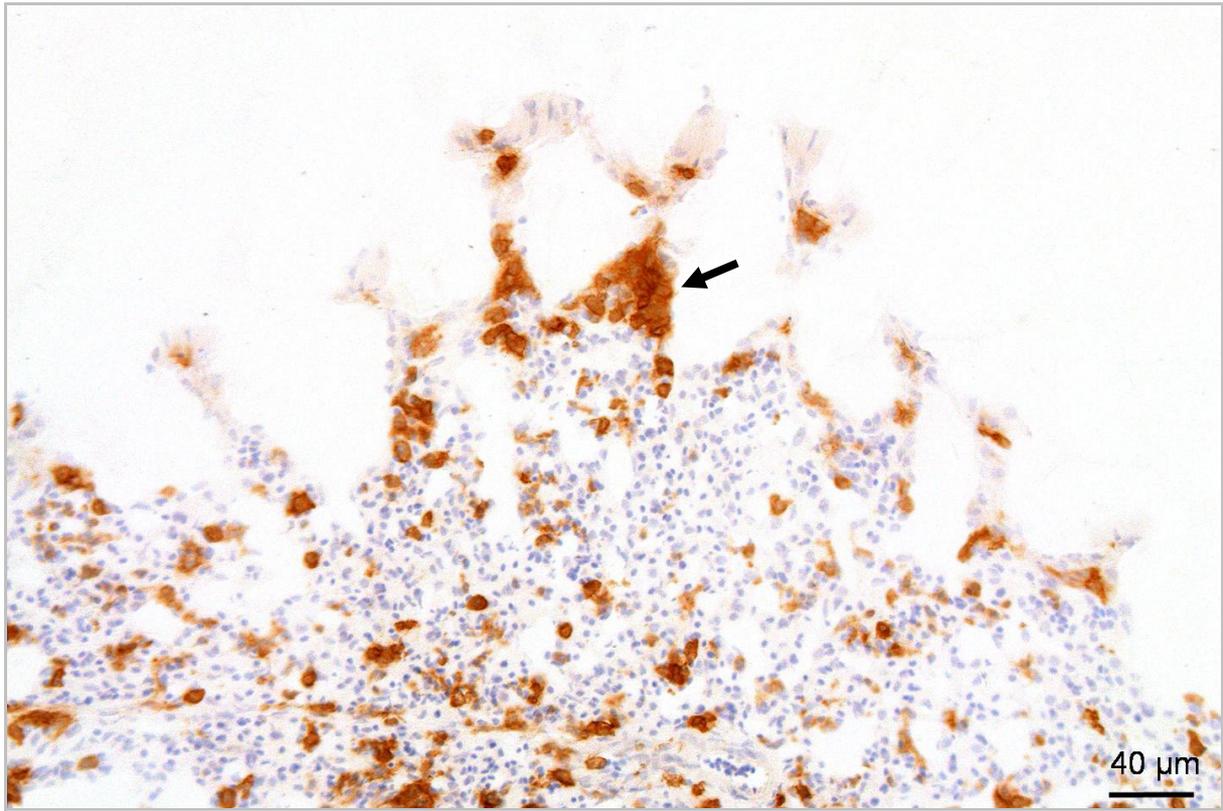


Abbildung 41: CD45 Färbung im Parenchym eines drei Wochen alten Tieres.

Es sind sowohl einzelne Zellen als auch eine kleine Ansammlung von Leukozyten zu erkennen (Pfeil).

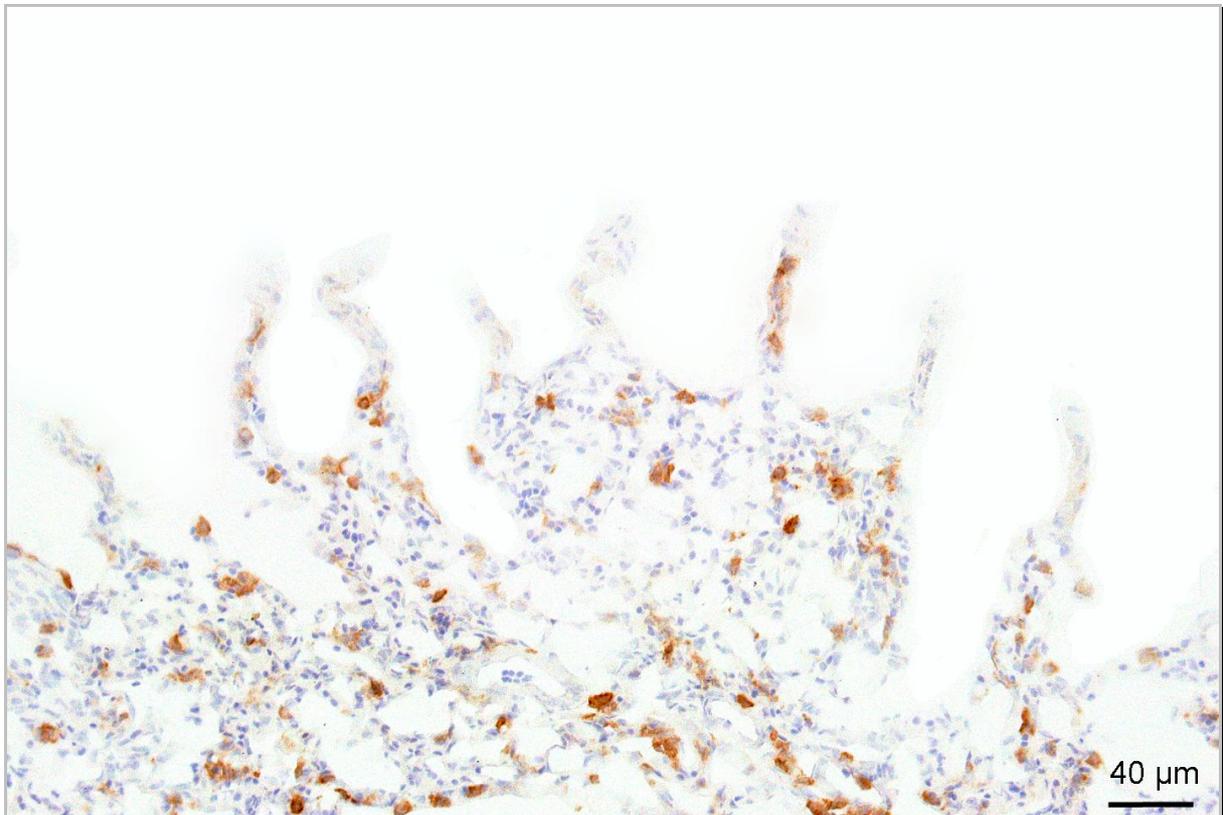


Abbildung 42: CD45 Färbung im Parenchym eines drei Wochen alten Tieres.

Im Parenchym des hier dargestellten Tieres ist eine deutlich geringere Zahl an CD45⁺ Zellen zu beobachten als dies beim gleichaltrigen Tier aus Abbildung 41 der Fall ist.

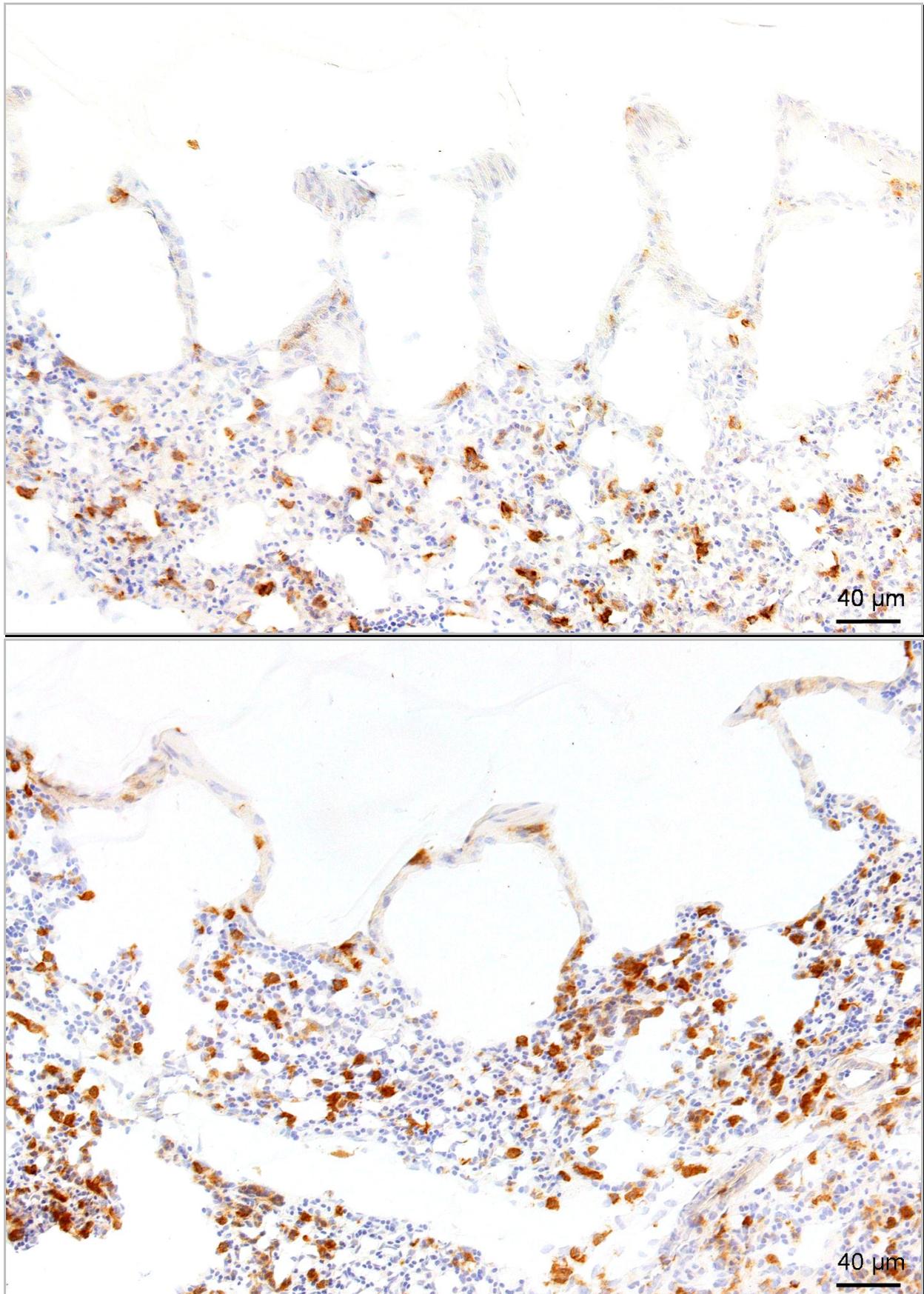


Abbildung 43: Verteilungsmuster der CD45⁺ Zellen (Leukozyten) im Parenchym von zwei vier Wochen alten Tieren.

Das Tier im unteren Bild weist in der Parabronchalwand eine größere Zahl an Leukozyten auf als dies für das Tier im oberen Bild der Fall ist.

Interparabronchale Septen und Zwickel

Die Zahl der CD45⁺ Zellen im interparabronchalen Bindegewebe hat in dieser Entwicklungsphase eine weitere Zunahme erfahren. Wie bereits im Abschnitt zuvor erwähnt, weisen die Tiere einer Altersstufe jeweils deutliche individuelle Unterschiede betreffend der vorkommenden Leukozytenzahl auf (vergleiche Abbildung 41 und Abbildung 42). Grundsätzlich lässt sich in dieser Entwicklungsphase eine deutlich stärkere Infiltration der Zwickel durch CD45⁺ Zellen erkennen, als das bisher der Fall war. Bei einem der neun untersuchten Tiere haben die Infiltrate in den Zwickeln zahlenmäßig so stark zugenommen, dass fast in jedem Zwickel größere Ansammlungen zu sehen sind. In den Infiltraten der Zwickel dominieren nun die Zellen der unspezifischen Abwehr das Bild, dennoch haben die T-Zellen, im Vergleich zur vorangegangenen Entwicklungsphase, deutlich zugenommen. Nur die B-Zellen kommen weiterhin vereinzelt vor. In den Zwickeln des stark infiltrierten drei Wochen alten Tieres sind die T-Zellen so stark vertreten, dass sie die Zahl der Kul1⁺ Zellen fast übersteigen.

Die interparabronchalen Septen zeigen deutlich weniger CD45⁺ Zellen, als es in den Zwickeln der Fall ist. Es finden sich nur vereinzelt Leukozyten, die bei allen Tieren vor allem aus Kul1⁺ Zellen bestehen, gefolgt von den T-Zellen und den nur selten vorkommenden B-Zellen.

Unabhängig von der Häufigkeit der T-Zellen verteilen sich diese bei allen untersuchten Tieren gleichmäßig auf die CD4⁺ und die CD8⁺ Subpopulationen, wobei diese vor allem den TCR2 Rezeptor tragen.

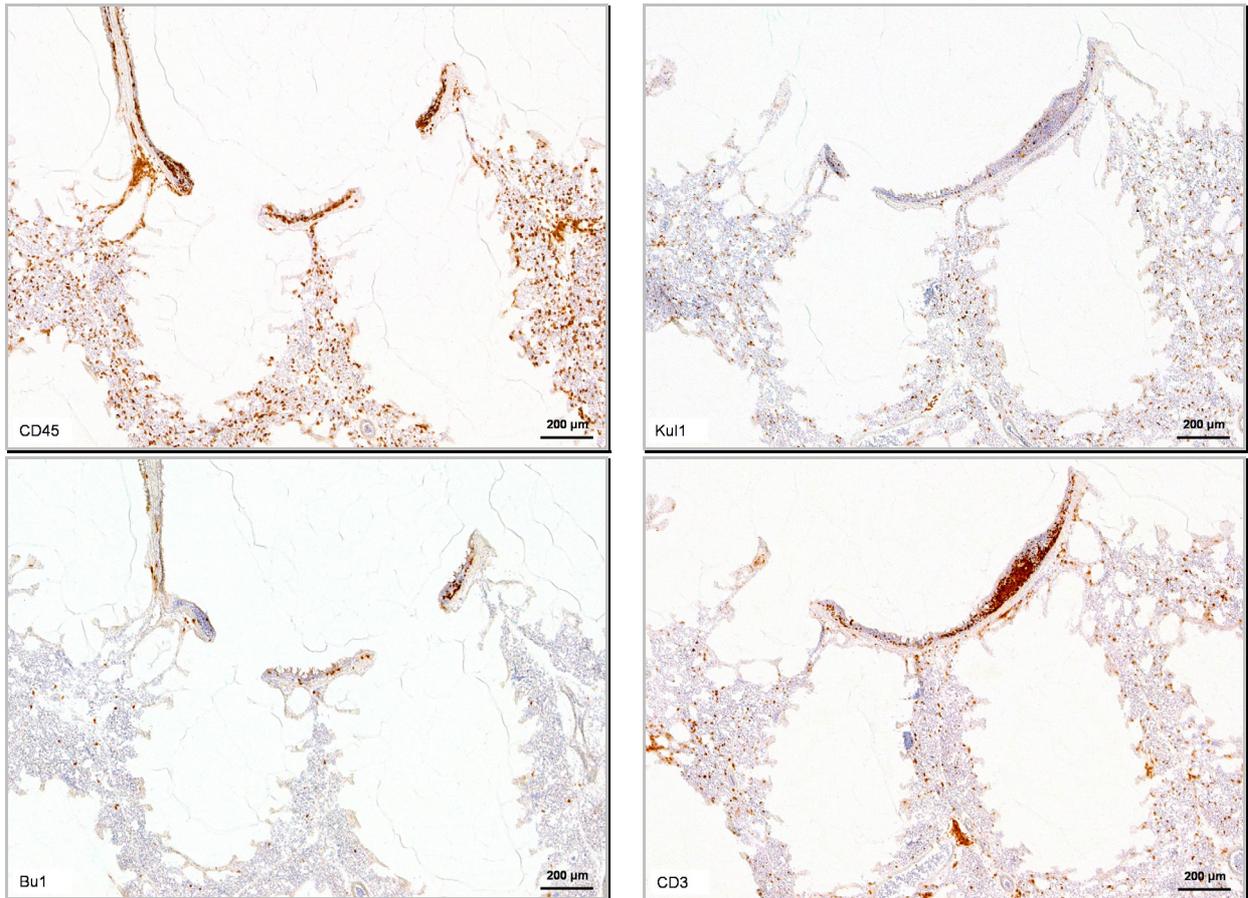


Abbildung 44: Immunhistologische Lungschnitte aus dem Bereich des Primärbronchus eines drei Wochen alten Huhnes, welches eine besonders starke Infiltration durch Leukozyten aufweist.

4.1.3 Dritte Entwicklungsphase (sechste bis achte Lebenswoche)

Erstmals findet eine Organisation der Lymphozyten zu einem Lymphfollikel statt. Die parabronchale Wand weist eine geringe Zunahme an Leukozytenaggregaten auf. Vor allem die Zwickel haben an Zahl und Größe zugenommen.

Primärbronchus

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung dieser Altersphase zeigt die gleichen Merkmale, wie bereits für die Altersphasen zuvor. Der Primärbronchus besitzt an den Abgängen zu den Sekundärbronchen einen zilienlosen Abschnitt. An den Sekundärbronchusabgängen sind vereinzelt kleine Erhabenheiten zu erkennen, die in das Primärbronchuslumen ragen.

Im Primärbronchus dieser Tiere ist eine sehr deutliche Zunahme der CD45⁺ Infiltrate zu verzeichnen (Abbildung 45 links). Diese setzen sich überwiegend aus Lymphozyten zusammen, wobei die Zahl der B-Zellen einen sehr starken Anstieg

erfahren hat und nun der Menge an T-Zellen in etwa entspricht. Die Lymphozytenpopulation beginnt sich erstmals zu Lymphfollikeln zu organisieren. In dieser Entwicklungsphase befinden sich die B-Zellen allerdings ausschließlich in der Peripherie des Lymphfollikels, gemeinsam mit einzeln eingestreuten Kul1^+ Zellen, wohingegen die T-Zellen über die gesamte Region verteilt sind. Dadurch liegen im Zentrum des Lymphfollikels fast ausschließlich T-Zellen.

Erstmals ist auch in der Lamina propria eines Sekundärbronchus eine kleine Ansammlung zu sehen, die zu gleichen Teilen aus diffus verteilten T- und B-Zellen besteht. Die T-Zellen verteilen sich gleichmäßig auf CD4^+ und CD8^+ (Abbildung 45 rechts). Hingegen sind Zellen der unspezifischen Abwehr nur in geringem Maße vertreten.

Die T-Zell Subpopulationen im Lymphfollikel des Primärbronchus verteilen sich bei den sechs Wochen alten Tieren fast gleichmäßig auf CD4^+ und CD8^+ T-Zellen, wohingegen ihre Verteilung bei den älteren Tieren dieser Entwicklungsphase sich zu den CD4^+ T-Zellen hin verschiebt. Die CD8^+ T-Zellen kommen vor allem in der Peripherie des Lymphfollikels vor, wohingegen die CD4^+ T-Zellen sich eher im Zentrum des Lymphfollikels aufhalten (Abbildung 47). Dabei lassen sich die T-Zellen in ihrer Hauptsache den α/β_1 T-Zellen und nur vereinzelt den γ/δ T-Zellen zuordnen (Abbildung 47). Diese γ/δ T-Zellen sind meist in der Peripherie des BALT lokalisiert. Zusätzlich treten im Follikel-assoziierten Epithel vereinzelt γ/δ T-Zellen auf.

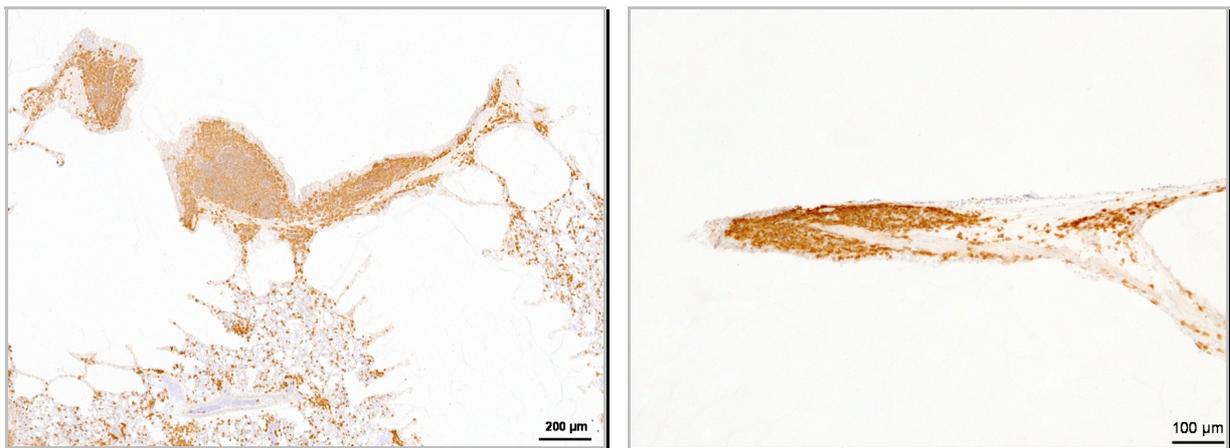


Abbildung 45: Primär- und Sekundärbronchus eines sechs Wochen alten Tieres.

Das linke Bild zeigt die starke Infiltration des Primärbronchus mit CD45^+ Zellen. Rechts im Bild ist ein Sekundärbronchus desselben Tieres zu sehen. Auch hier lassen sich Leukozytenansammlungen finden.

Parabronchus Wand

In der rasterelektronischen Betrachtung der parabronchalen Wand zeigten die Atrienwände auch in dieser Altersstufe eine deutliche Fältelung, wie sie in den Altersphasen zuvor (Abbildung 40) bereits beschrieben wurde.

In der immunhistologischen Untersuchung weist die Wand der Parabronchen in den Atria, den Infundibula und den Luftkapillaren zum einen gleichmäßig verteilt $CD45^+$ Zellen auf. Zum anderen kommen in diesen Altersstufen kleine Leukozytenansammlungen in der Parabronchialwand vor (Abbildung 46 rechts), die mit zunehmendem Alter an Größe und Häufigkeit zunehmen. Diese Zellaggregate bestehen im Wesentlichen aus T-Zellen, die sich zu gleichen Teilen auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen verteilen. Überwiegend tragen diese den $\alpha:\beta$ -Rezeptor. Nur selten kommen einzelne B-Zellen darin vor. Die Verteilung der Zellen, ausschließlich der Leukozytenaggregate, zeigt eine annähernd gleiche Zahl von $CD3^+$ T-Zellen und $Kul1^+$ Zellen, die gleichmäßig über die parabronchale Wand verteilt sind. Auch für diese T-Zellen gilt, dass die $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen zu etwa gleichen Teilen vorkommen und die meisten von ihnen den $\alpha/v\beta_1$ T-Zell-Rezeptor tragen. B-Zellen sind auch in diesen Bereichen eher sporadisch zu beobachten.

Interparabronchale Septen und Zwickel

In den bindegewebigen Zwickeln zwischen den Parabronchen dominieren die immer größer werdenden Leukozytenaggregate das Bild. Die darin enthaltenen Lymphozyten bestehen fast in ihrer Gesamtheit aus T-Zellen, die sich gleichmäßig auf die $CD4^+$ und $CD8^+$ Subpopulationen verteilen. Dabei exprimiert die Mehrheit von ihnen den $\alpha:\beta$ -Rezeptor. Zusätzlich sind in dieser Entwicklungsphase in den Zwickeln zunehmend auch kleine Gruppen von B-Zellen zu beobachten. Dagegen treten in den Zwickeln $Kul1^+$ Zellen nur sporadisch auf.

Über die gesamten bindegewebigen Septen zwischen den Parabronchen treten gleichmäßig verteilt $CD45^+$ Zellen auf, wobei ihre Dichte deutlich über der der umliegenden parabronchalen Wand liegt. Diese bestehen hauptsächlich aus $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, während B-Zellen und $Kul1^+$ Zellen selten vorkommen. Wie im Zwickel waren die T-Zellen vorwiegend vom $\alpha:\beta$ -Rezeptortyp.

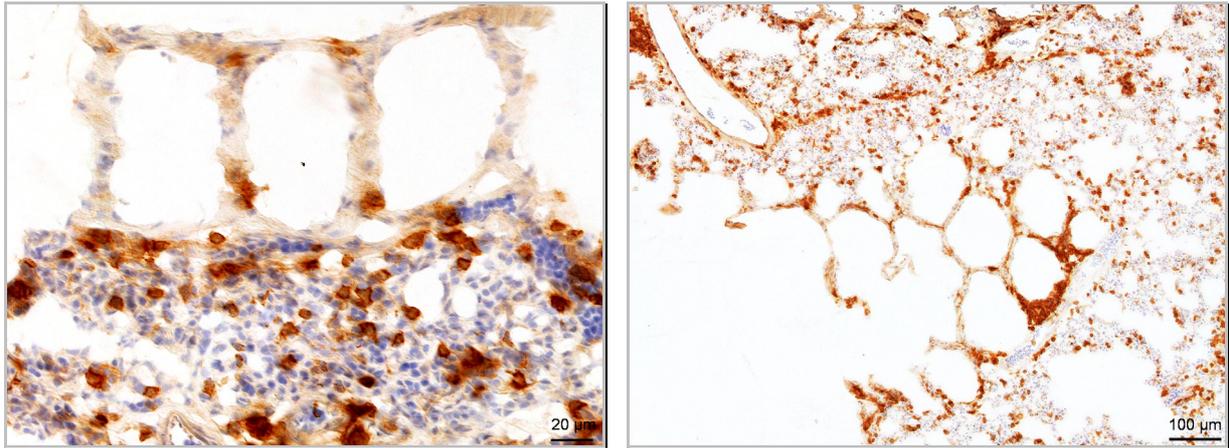


Abbildung 46: CD45 Färbungen im Parenchym von sechs Wochen alten Tieren.

Im linken Bild ist die gleichmäßige Verteilung der CD45⁺ Zellen über den Parabronchus zu sehen. Das rechte Bild stammt vom selben Tier und zeigt kleine Ansammlungen von Leukozyten in den Atrienwänden eines Parabronchus.

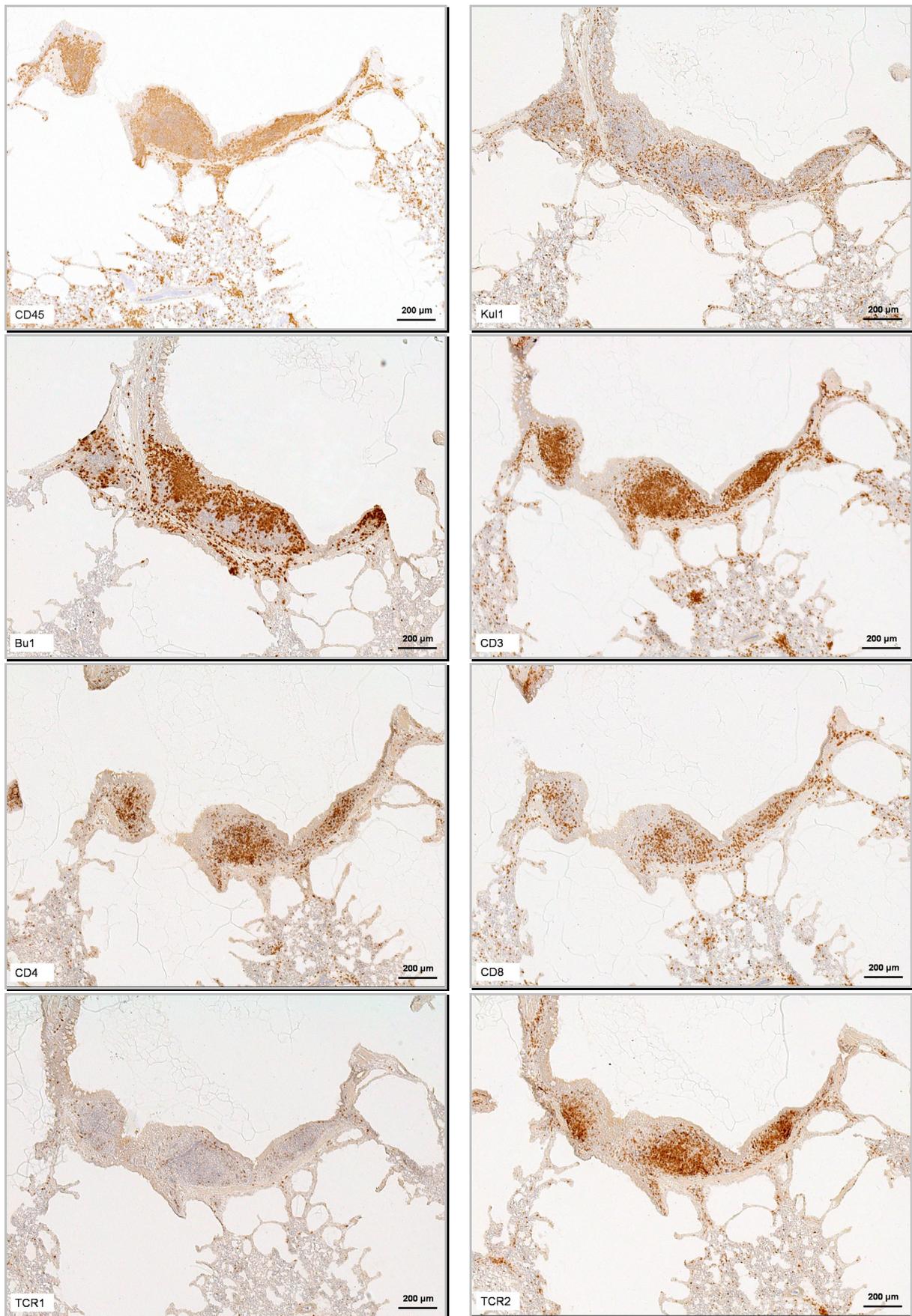


Abbildung 47: Immunhistologische Bilder eines sechs Wochen alten Tieres.
Verteilung der T-, B- und myeloiden Zellen an Serienschritten des BALT-Knotens dargestellt.

4.1.4 Vierte Entwicklungsphase (dreizehnte Lebenswoche)

In dieser Altersphase findet eine weitere Organisation in den Lymphfollikeln des Primärbronchus statt, ebenso beginnen auch die Leukozytenansammlungen in den Zwickeln sich zu organisieren. Die Leukozyteninfiltrate in der parabronchalen Wand haben an Häufigkeit zugenommen.

Primärbronchus

Im Rahmen der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung konnten die bereits für die Altersphasen zuvor beschriebenen Merkmale erneut nachgewiesen werden. Die Zugänge des Primärbronchus in die Sekundärbronchen weisen einen zilienlosen Bereich auf, der, wie bereits zuvor beschrieben, Mikrovilli unterschiedlicher Höhe trägt, wodurch ein schachbrettartiges Muster entsteht (Abbildung 49). Gleichzeitig lassen sich an wenigen Stellen des Primärbronchus leichte Erhabenheiten darstellen, die sich vor allem in der Nähe der Sekundärbronchusabgänge befinden (Abbildung 48).

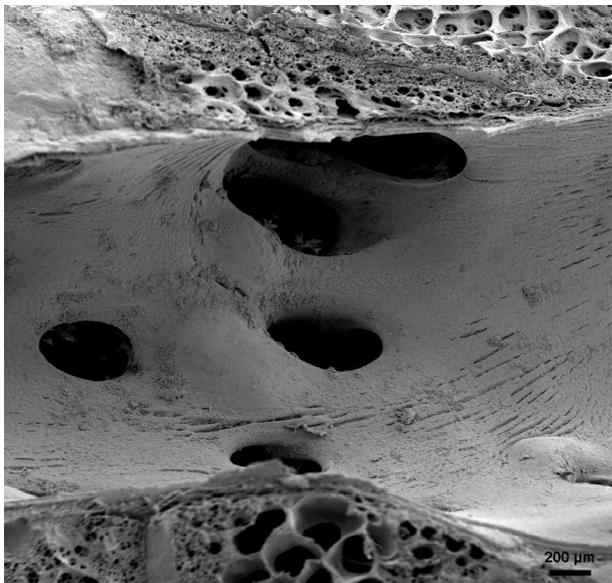


Abbildung 48: Ausschnitt des Primärbronchus. An den Sekundärbronchusabgängen sind Strukturen zu erkennen, die deutlich in das Lumen hineinragen.

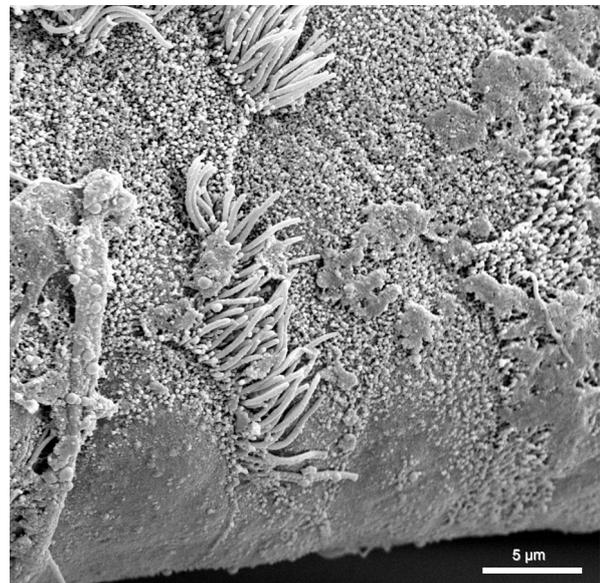


Abbildung 49: Übergang vom Primär- in den Sekundärbronchus stark vergrößert. Die Kante am Übergang vom Primär- zum Sekundärbronchus weist zilientragende und zilienfreie Bereiche.

Die älteste immunhistologisch untersuchte Altersstufe war die der dreizehn Wochen alten Tiere. Bei diesen Tieren ist eine Umkehr der T- und B-Zellareale im Vergleich zum vorherigen Entwicklungsstadium zu beobachten. Der Lymphfollikel ist nunmehr

ein reines B-Zellareal, das scharf vom perifollikulären Bereich abgegrenzt ist (Abbildung 64). Umgeben wird der Follikel von T-Zellen, zwischen denen sich allerdings auch zahlreiche B-Zellen finden. Die T-Zellen bestehen hauptsächlich aus der Subpopulation der CD4⁺ T-Helferzellen. In ihrer Mehrzahl tragen diese T-Zellen den α/β_1 T-Zell-Rezeptor und sind häufig in kleinen Nestern um die Sekundärfollikel lokalisiert. Die zahlenmäßig unterlegenen CD8⁺ T-Zellen hingegen kommen vermehrt in den, dem Follikel-assoziierten Epithel (FAE) zugewandten T-Zellbereichen vor (Abbildung 64). Einzelne CD8⁺ T-Zellen sind auch im FAE, als intraepitheliale Lymphozyten zu sehen. Die Zellen der unspezifischen Abwehr (Kul1⁺) sind weiter in den Hintergrund getreten und kommen nur in einer sehr geringen Zahl vor. Dabei liegen sie insbesondere unmittelbar perifollikulär, aber auch in geringerer Dichte diffus verteilt in den T-Zellbereichen. Im Follikel kommen sie so gut wie gar nicht vor. Wie bereits in der Entwicklungsphase zuvor beschrieben, sind auch bei diesen Tieren kleine Lymphozytenaggregate in den Sekundärbronchen zu beobachten. Diese Lymphozytenansammlungen bestehen weiterhin aus T- und B-Zellen, wobei keine Organisation zu einem Lymphfollikel zu beobachten ist. In geringer Zahl sind sogar Kul1⁺ Zellen zu finden, wobei diese gleichmäßig über die Lymphozytenansammlung verteilt sind.

Parabronchus Wand

Auch in dieser Altersphase weisen die Atrienwände in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung ein Bild auf, das dem, in den Altersphasen zuvor beschriebenen, weitestgehend entspricht. Das Oberflächenrelief der Atrienwände zeigt eine deutliche Fältelung (Abbildung 50 und Abbildung 51). Jedoch konnte an einem der untersuchten Atrien ein etwas anderes Bild dargestellt werden. Hier konnten nicht nur Falten beobachtet werden, sondern lange „Fäden“ bzw. zarte fadenförmige Fortsätze, die diesen Falten teilweise aufsitzen (Abbildung 52 und Abbildung 53).

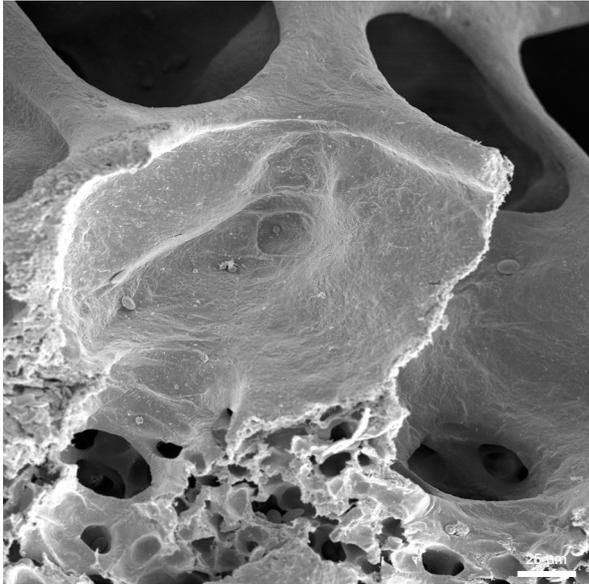


Abbildung 50: REM-Bild von einem angeschnittenen Atrium mit Infundibulum und Luftkapillaren.

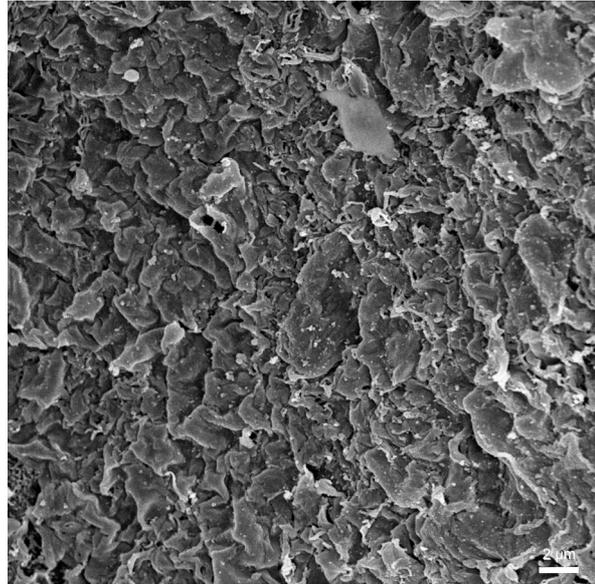


Abbildung 51: Starke Vergrößerung der Atriumoberfläche aus Abbildung 50.
Die Atriumoberfläche zeigt eine deutliche Faltenbildung.

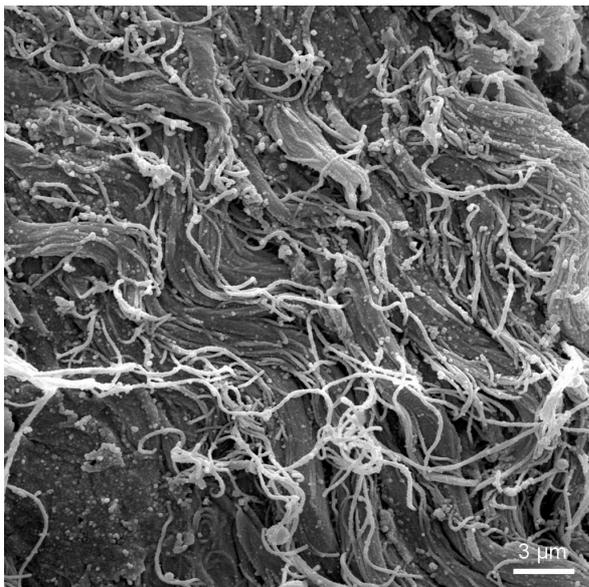


Abbildung 52: Stärkere Vergrößerung einer benachbarten Atrienwand.
Die Wand dieses Atriums besitzt außer den Falten auch noch fadenförmige Fortsätze.

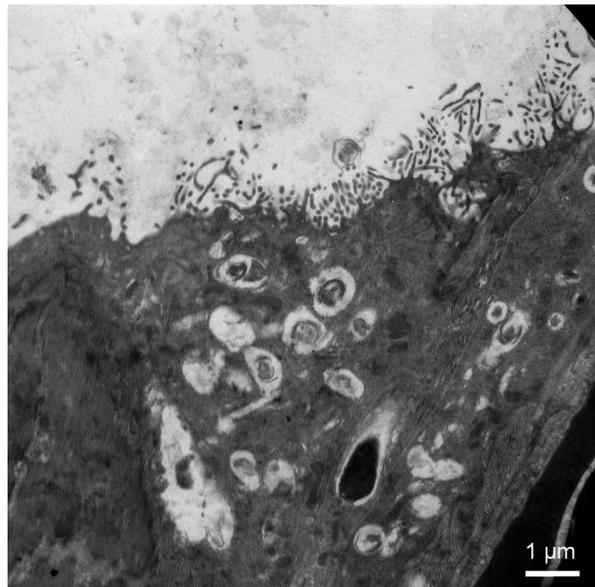


Abbildung 53: Schnitt durch die Atrienwand (TEM-Bild).
Das Atrienepithel zeigt eine deutliche Fältelung seiner Oberfläche.

Die Zahl der Leukozyten hat im Parabronchus deutlich zugenommen. Dabei zeigen die interatrialen Septen eine hohe Dichte gleichmäßig verteilter Leukozyten. Des Weiteren befinden sich auch in tiefer gelegenen Abschnitten der parabronchalen Wand (Infundibulum und Luftkapillaren) deutlich mehr CD45⁺ Zellen, als das bisher der Fall war. Zusätzlich treten vermehrt Leukozytenansammlungen in der Parabronchuswand auf, die vor allem an den Firsten und der Basis der Atrienwände, aber auch im Bereich der Luftkapillaren lokalisiert sind. Die genannten Aggregate

bestehen hauptsächlich aus T-Zellen (Abbildung 54), jedoch kommen etwas seltener auch Aggregate vor, die aus einer großen Anzahl von B-Zellen bestehen (Abbildung 55). Die Verteilung der T-Zellen auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ist bei den drei untersuchten Tieren etwas unterschiedlich. So zeigt eines der untersuchten Hühner eine ungefähr gleich große Zahl an T-Helferzellen und cytotoxischen T-Zellen (Abbildung 56 und Abbildung 57), bei den beiden anderen Tiere hingegen sind die $CD8^+$ Zellen deutlich in der Überzahl. Trotzdem trifft für alle drei Tiere zu, dass die Zahl der $\alpha/\nu\beta_1$ über die Zahl der γ/δ T-Zellen überwiegt. Die Population der diffus verteilten $CD45^+$ Zellen setzt sich in der Mehrzahl aus $CD3^+$ Zellen zusammen, gefolgt von den Zellen der unspezifischen Abwehr und den B-Zellen. Die T-Zellpopulation entspricht in ihrer Zusammensetzung den Verhältnissen in den oben beschriebenen Aggregaten.

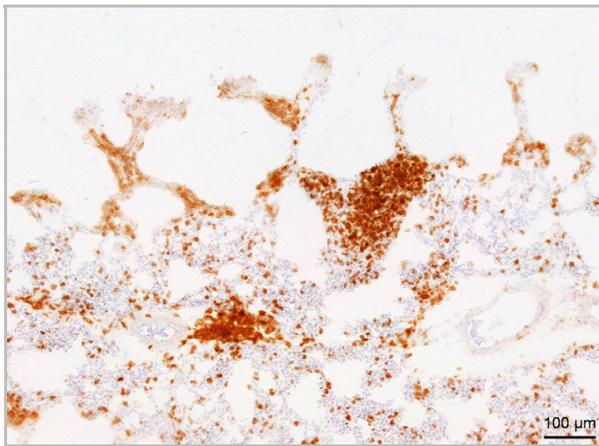


Abbildung 54: T-Zellansammlungen in der Parabronchalwand eines zwölf Wochen alten Tieres (anti-CD3-Färbung).

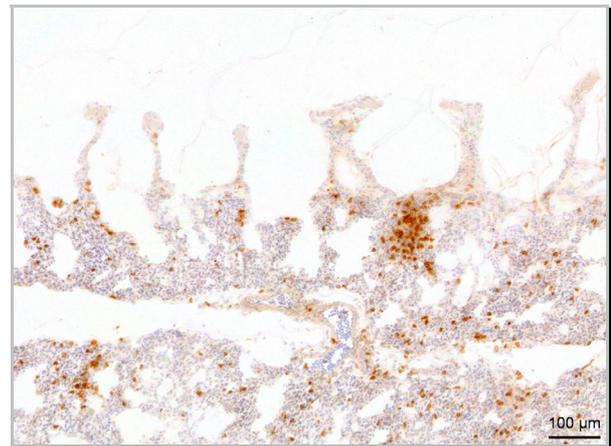


Abbildung 55: Verteilung der B-Zellen in derselben Parabronchalwand, wie in Abbildung 54 gezeigt.

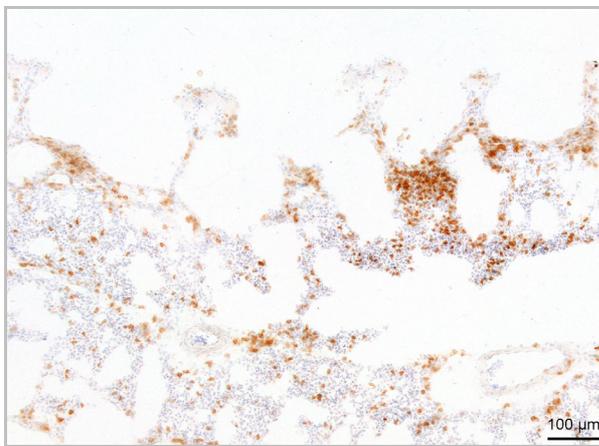


Abbildung 56: Die T-Zellansammlungen aus der Abbildung 54 bestehen zu einem wesentlichen Teil aus cytotoxischen T-Zellen.

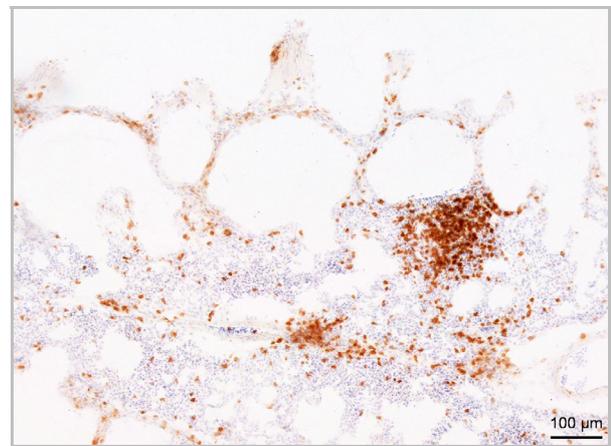


Abbildung 57: Bei den T-Zellansammlungen in der Parabronchalwand handelt es sich in der Mehrzahl um $TCR2^+$ Zellen.

Interparabronchale Septen und Zwickel

Die Leukozytenansammlungen in den Zwickeln haben in dieser Altersphase eine weitere Zunahme erfahren. Vor allem die Zahl der darin vorkommenden B-Zellen hat einen sehr starken Anstieg erfahren, so dass sie in ihrer Zusammensetzung nun zu etwa gleichen Teilen aus T- und B-Zellen bestehen. Diese Lymphozyten sind in der Regel diffus über die Leukozytenansammlungen verteilt. Eine kleine Zahl der Zwickel jedoch lässt eine Separierung erkennen. Hierbei können die T-Zellen in der Peripherie dieser Leukozytenansammlungen angefärbt werden und dessen Zentrum bleibt weitestgehend T-Zell frei (Abbildung 58 bis Abbildung 61). In allen Fällen bestehen die T-Zellen zu etwa gleichen Teilen aus CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Dabei überwiegen die TCR2⁺ T-Zellen, obwohl die Zahl der TCR1⁺ Zellen sich deutlich erhöht hat. Die B-Zellen hingegen sind immer über die gesamte Leukozytenansammlung der Zwickel verteilt, kommen aber im Zentrum gehäuft vor (Abbildung 62). Die Zellen der unspezifischen Abwehr sind in ihrer Zahl den Zellen der spezifischen Abwehr deutlich unterlegen und kommen vermehrt in der Peripherie der Leukozytenansammlungen vor (Abbildung 63).

Über die gesamten bindegewebigen Septen zwischen den Parabronchen treten weiterhin gleichmäßig verteilt CD45⁺ Zellen auf. Diese bestehen hauptsächlich aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, während B-Zellen und Ku1 Zellen seltener vorkommen. Wie im Zwickel waren die T-Zellen vorwiegend vom α : β -Rezeptortyp.

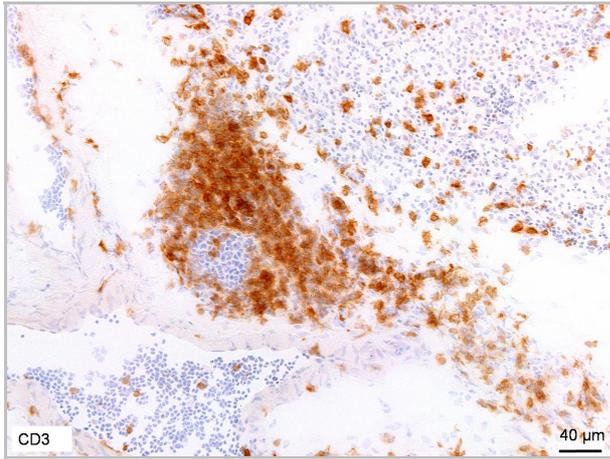


Abbildung 58: Die T-Zellenansammlung innerhalb des Zwickels zeigt eine deutliche Aussparung in dessen Zentrum.

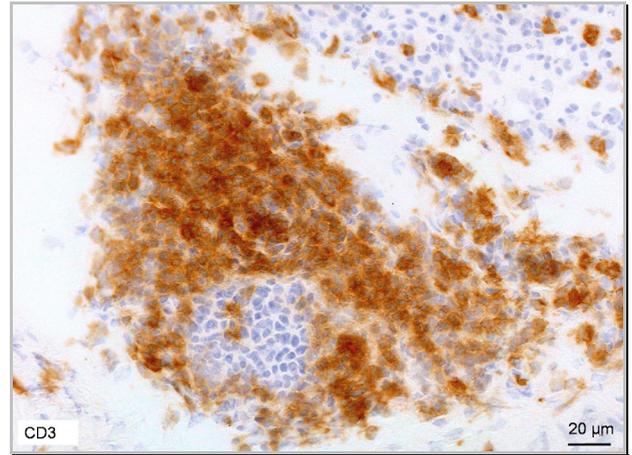


Abbildung 59: Zwickel aus Abbildung 58 stärker vergrößert.

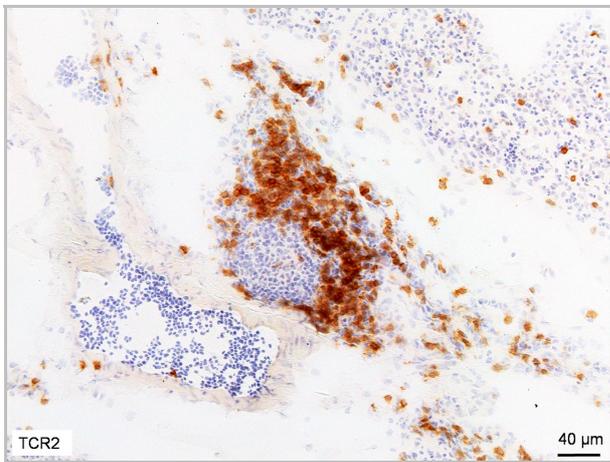


Abbildung 60: Die in der Peripherie des Zwickels gelegenen T-Zellen tragen vorwiegend den α/β_1 TCR.

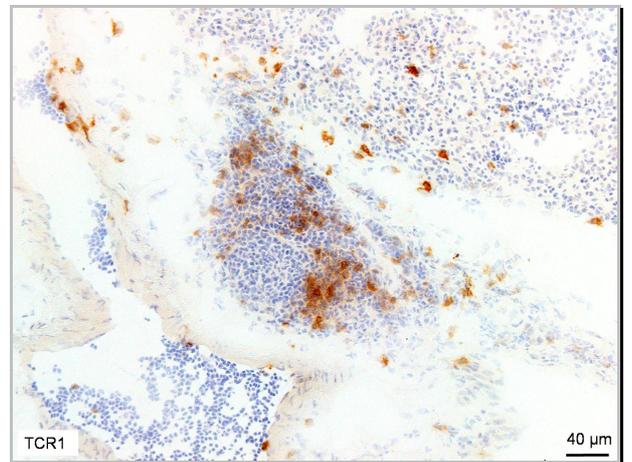


Abbildung 61: Ein deutlich geringerer Teil der T-Zellen in den Zwickeln sind TCR1⁺ (Vergleiche Abbildung 60).

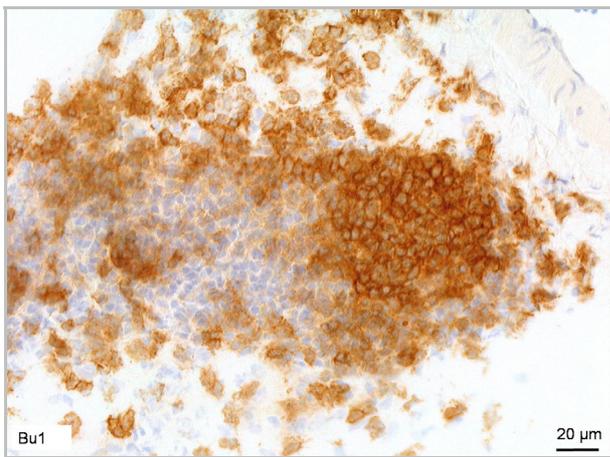


Abbildung 62: Die B-Zellen liegen über die gesamten Zwickelinfiltrate verteilt.

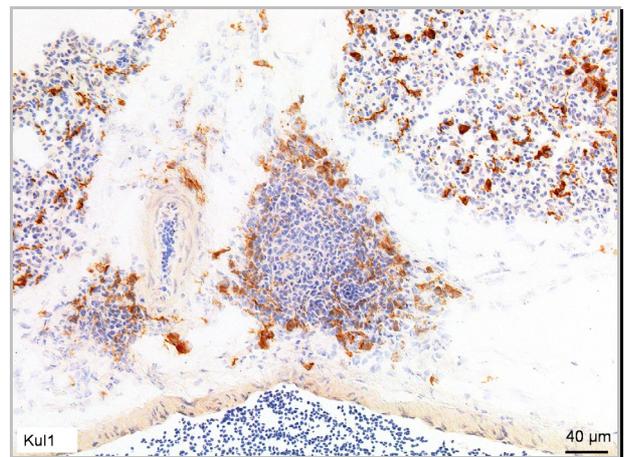


Abbildung 63: Die Zellen der unspezifischen Abwehr sind vermehrt in der Peripherie der Zwickelinfiltrate wiederzufinden.

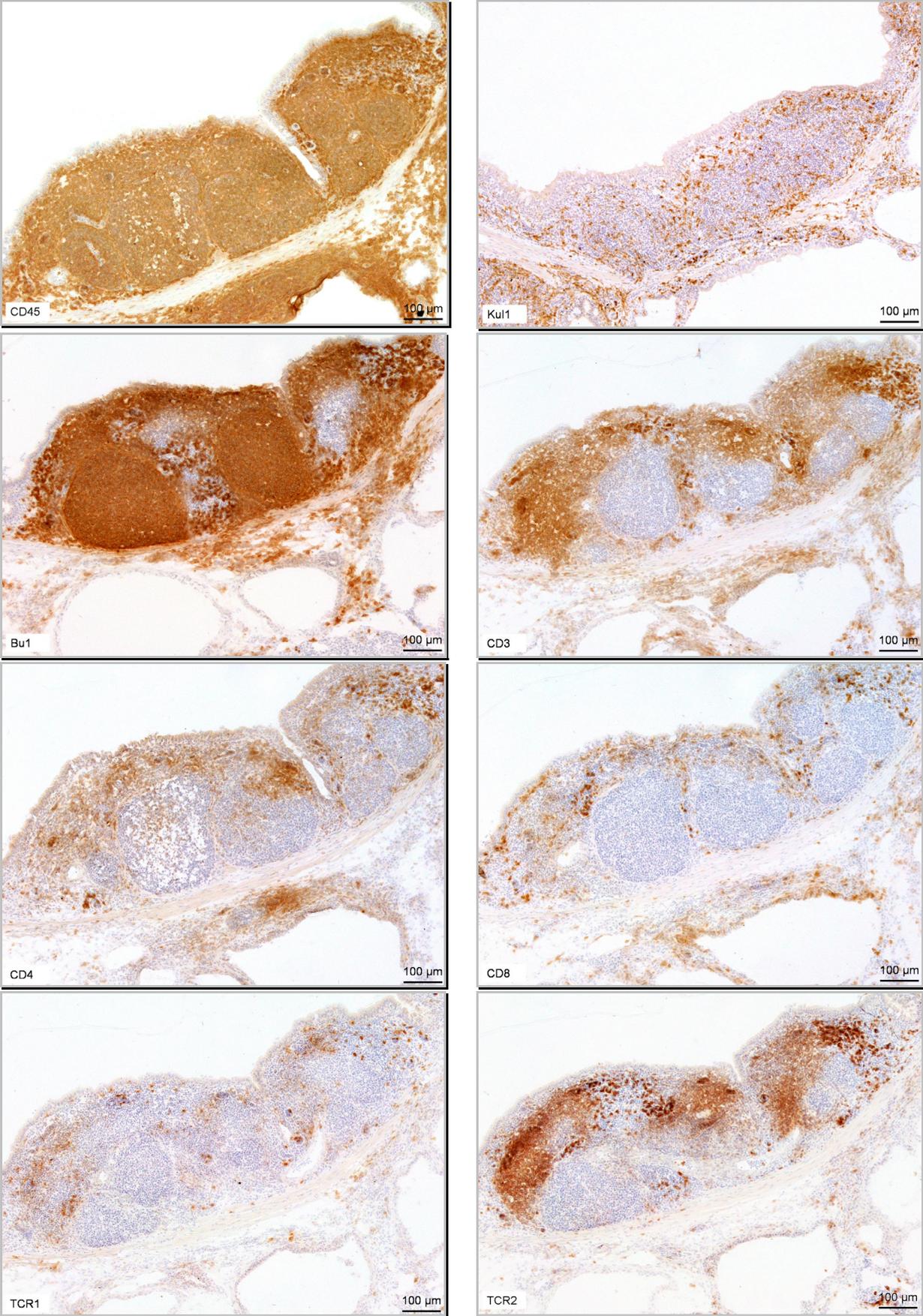


Abbildung 64: Immunhistologie am Primärbronchus eines zwölf Wochen alten Tieres.
Erstmals ist voll ausgebildetes BALT zu sehen, das eine Trennung in T- und B-Zellareale aufweist.

Altersgruppe	Leukos	B-Zellen	T-Zellen	T-Zellpopulation				Myeloide Zellen
				T-Helferzellen	Zyto-toxische T-Zellen	γ/δ T-Zellen	$\alpha/\nu\beta_1$ T-Zellen	
Altersgruppe	CD45	Bu1	CD3	CD4	CD8	TCR1	TCR2	Kul1
1 d bis 1 w	-+	--/-	-+	-+	-	-	-+	-+
2 w bis 4 w	+	-+ / +	+	-+	- / -+	-	-+	-+
6 w bis 8 w	++	++	++	+	+	-+	+	-+
13 w	+++	+++	++	++	+	-+	++	-

Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Zelltypen in der BALT Region.

Altersgruppe	Leukos	B-Zellen	T-Zellen	T-Zellpopulation				Myeloide Zellen
				T-Helferzellen	Zyto-toxische T-Zellen	γ/δ T-Zellen	$\alpha/\nu\beta_1$ T-Zellen	
Altersgruppe	CD45	Bu1	CD3	CD4	CD8	TCR1	TCR2	Kul1
1 d bis 1 w	+	-	-+	-+	-	-	-+	+
2 w bis 4 w	++	-	+	-+	-+	-	-+	++
6 w bis 8 w	+++	-	++	+ / +++	(+) / ++	-	+	++
13 w	++++	-+ bis +	+++	1T ++	++	+	+ / +++	+++
				2T +	++			

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Zelltypen in der Wand der Parabronchen.

Altersgruppe	Leukos	B-Zellen	T-Zellen	T-Zellpopulation				Myeloide Zellen
				T-Helferzellen	Zyto-toxische T-Zellen	γ/δ T-Zellen	$\alpha/\nu\beta_1$ T-Zellen	
Altersgruppe	CD45	Bu1	CD3	CD4	CD8	TCR1	TCR2	Kul1
1 d bis 1 w	-+	--	-+	-+	-	-	-	-+
2 w bis 4 w	+	-	-+	-+	-	-	-+	-+
6 w bis 8 w	++	+	++	+	++	-+	++	+
13 w	+++	+ / ++	++	+ / ++	+ / ++	+	++	+

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Zelltypen in den Zwickeln.

Legende:

w Wochen bzw. Tage

d Tage

T Tier

-- keine Zellen vorhanden

- Zellen sind sporadisch vorhanden

-+ Zellen kommen vereinzelt vor

+ bis ++++ Zellen nehmen an Häufigkeit zu

5 Diskussion

In den vergangenen zwanzig Jahren wurde von verschiedenen Gruppen das BALT des Huhnes untersucht und eine altersabhängige Entwicklung nachgewiesen (64, 93, 94). Im Rahmen der bisherigen immunhistologischen Arbeiten wurde jedoch nur der Primärbronchus berücksichtigt, und das restliche Lungenparenchym von fast allen Arbeitsgruppen außer Acht gelassen. Lediglich *Jeurissen et al.* (94) starteten einen Versuch, dieses Gewebe zu beschreiben. Jedoch gelang dies nur teilweise, da die Untersuchungen an unfixierten und somit kollabierten Lungen erfolgten. Somit war der Strukturhalt des Lungengewebes nicht mehr gegeben und die Trennung der einzelnen Abschnitte der Parabronchen (Atrium, Infundibulum und Luftkapillaren) nicht mehr möglich. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass hierbei nur die direkt den Primärbronchus umliegenden Parabronchen untersucht wurden, da sie auf Grund ihrer Nähe zum Primärbronchus den besten Strukturhalt aufwiesen. Erst im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch die Entwicklung der Agarose-Ausgusstechnik für das Huhn eine Methode etabliert werden, die es ermöglichte, die gesamte unfixierte Lunge zu untersuchen, ohne dabei ihr Kollabieren in Kauf nehmen zu müssen. Diese Methode eröffnete die Möglichkeit mit Antikörpern zu arbeiten, die ausschließlich an unfixiertem Gewebe funktionieren. Durch diese Arbeit konnten neue Erkenntnisse für das Immunsystem der Lunge gewonnen werden, die in Zukunft genutzt werden können, um dem Verständnis über die Funktion des Immunsystems der Lunge näherzukommen.

5.1 Methoden

Die Beurteilung der angefertigten immunhistologischen Schnitte erfolgte unter Anwendung klassischer histologischer Verfahren, da im Focus dieser Arbeit die Analyse der Struktur und der altersabhängigen Entwicklung des Lungenabwehrsystems stand. Die Quantifizierung der Zellen des Immunsystems in der Lunge wurde nicht angestrebt, da hierfür alternative Verfahren, wie die Durchflusszytometrie in Zukunft etabliert und genutzt werden sollen.

5.1.1 Applikationstechnik der Agarose

Die Agarose-Ausgusstechnik erforderte ein schnelles Arbeiten, da sonst der Tierkörper nach der Tötung zu stark auskühlte und die Agarose durch das langsame

Applizieren bereits zu gelieren begann. Dies hätte eine unvollständige Füllung der Lunge zur Folge und das teilweise Kollabieren des Gewebes bei der Entnahme wäre vorprogrammiert. In Vorversuchen zeigte sich allerdings, dass ein zu rasches Eingeben der Agarose nach dem Tode ebenfalls Probleme mit sich brachte. Es kam in diesen Fällen zu einer starken Kontraktion der glatten Muskulatur, wobei hiervon der Primärbronchus besonders stark betroffen war. Die Kontraktion erschwerte die anschließende Beurteilung und Auswertung der immunhistologischen Färbung und zeigte im Strukturerhalt ein nicht zufriedenstellendes Bild des Lungengewebes. Aus diesem Grunde war es vor allem bei den deutlich größeren, älteren Tieren wichtig, etwa eine halbe Stunde nach der Tötung, bei den kleineren, jüngeren Tieren entsprechend rascher mit der Agarose-Applikation zu beginnen.

Ein weiterer wichtiger Punkt war das Einhalten der Agarose-Konzentration, da sowohl eine stärkere Verdünnung als auch eine höhere Konzentration Probleme mit sich brachte. Im ersten Fall kam es zu einer unzureichenden Gelierung, im zweiten zur Herstellung einer zu dickflüssigen Lösung. In beiden Fällen war das Ergebnis des Strukturerhaltes nicht akzeptabel. Ersteres führte zum Kollabieren der Lunge, da bei der Anfertigung von Lungenscheiben für die Kryoeinbettung die Agarose beim Schneiden aus der Lunge herausfloss. Die Erhöhung der Konzentration hingegen führte zu einer unzureichenden Füllung der feinen luftgefüllten Räume des Parabronchus, was zur Folge hatte, dass das Lungengewebe beim Schneiden keinen Widerhalt fand und zerfiel.

5.1.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Bei der Anfertigung der Kryostatschnitte stellte vor allem das Auffinden der BALT Regionen und dies ganz besonders bei den jungen Tieren ein Problem dar, da ihr unausgereiftes BALT nur aus kleinen Ansammlungen von Leukozyten bestand. Um dennoch ein repräsentatives Bild des Schnittes im BALT zu gewährleisten, wurde nicht jeder beliebige Sekundärbronchusabgang für die Immunhistologie verwendet, sondern durch eine Hämatoxylin-Färbung nach entsprechenden Stellen gesucht. Diese Vorgehensweise sollte gewährleisten, dass in der anschließenden Immunhistologie auch wirklich das BALT beurteilt werden konnte. Trotz Anfertigung einer großen Zahl von Serienschnitten der linken und rechten Lunge konnten beim Eintagsküken an keinem der Sekundärbronchen nennenswerte Leukozyteninfiltrate gefunden werden.

Ein weiteres Problem bestand in dem besonderen Anspruch der Serienschrittherstellung. Bei den Tieren der zweiten Altersphase war die Größe des unausgereiften BALT so klein, dass in diesen Bereichen nur eine Auswahl der zur Verfügung stehenden Antikörper für die Charakterisierung dieser Leukozytenaggregation verwendet werden konnte.

5.1.3 Beurteilung der Agarose in der Immunhistologie

In Vorversuchen wurde Agarose von verschiedenen Herstellern getestet. Dabei wurde vor allem der Strukturhalt der Lungen in der Histologie beurteilt. Gleichzeitig stellte das neutrale Verhalten der Agarose in der Immunhistologie ein unabdingbares Merkmal dar. Auch das Verhalten der Agarose bei der Kryostatschnittherstellung war von großer Wichtigkeit. Einige der getesteten Agarose-Produkte wurden in Vorversuchen bereits ausgeschlossen, da sie bei niedrigen Temperaturen (ca. -15 °C) keine vernünftige Schnittherstellung zuließen. Die in dieser Arbeit verwendete ROTI®GAROSE (Agarose Low Melt) gab sowohl ein neutrales Verhalten als auch einen sehr guten Erhalt der Lungenstruktur wider. Die Atrien und Infundibula waren annähernd mit denen von Paraffinschnitten an fixierten Lungen vergleichbar und sogar die feinen Luftkapillaren waren nur in geringem Maße kollabiert. Insgesamt konnte die Qualität der Schnitte als sehr gut beurteilt werden. Somit war diese Technik der Agarose-Applikation für die Anwendung in der Immunhistologie sehr gut geeignet.

5.2 Ergebnisdiskussion

Wie bereits im Kapitel Ergebnisse wird auch in diesem Abschnitt der Primärbronchus getrennt vom restlichen Lungengewebe (im Weiteren als Parenchym bezeichnet) betrachtet. Diese Separierung erfolgt aus rein didaktischen Gründen, erscheint aber hinsichtlich ihrer Funktion bei der Immunabwehr als nicht sinnvoll.

5.2.1 Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, wie bereits von Fagerland und Jeurissen für das BALT beschrieben (64, 94), gezeigt werden, dass das Lungen-assoziierte Immunsystem mit zunehmendem Alter eine Entwicklung erfährt. Beim Eintagsküken sind im Primärbronchus nur vereinzelt Zellen der unspezifischen Abwehr anzutreffen, wobei das Epithel des Primärbronchus im REM an den Übergängen des

Primärbronchus in die Sekundärbronchen, den für das BALT typischen Stellen, regelmäßig zilienlose Bereiche aufweist. Die Darstellung von M-Zellen, wie sie für das MALT des Säugers typisch sind, gelang mit dieser Untersuchungsmethode jedoch nicht. Gleichzeitig konnten mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie Zellen an den Übergängen des Primär- zu den Sekundärbronchen gefunden werden, die eine gewisse Ähnlichkeit zu den M-Zellen des Säugers aufwiesen. Sie stehen durch leichte Einbuchtungen auf ihrer basalen Seite in enger Nachbarschaft zu Zellen, die auf Grund ihres Erscheinungsbildes Lymphozyten und Makrophagen sein könnten und tragen im Vergleich zu ihrer Umgebung keine Zilien, sondern nur kurze Mikrovilli. Trotz der Ähnlichkeit zu M-Zellen des Säugers kann an dieser Stelle nicht sicher gesagt werden, ob es sich hierbei um M-Zellen handelt. Hierzu sind weitere Untersuchungen hinsichtlich der Phagozytosefähigkeit dieser Zellen notwendig.

Der immer wieder anzutreffende zilienlose Bereich an den Übergängen zu den Sekundärbronchen lässt die Vermutung aufkommen, dass diesen Regionen in der Entwicklung des BALT eine besondere Rolle zukommt. Dabei lassen sich zwei Hypothesen aufstellen. Die erste basiert auf der Vermutung, dass es sich hierbei um einen physiologischen Zustand dieser Regionen handelt, da er bereits beim Eintagsküken beobachtet werden kann. Es ist denkbar, dass durch die vorherrschenden strömungsdynamischen Verhältnisse an diesen Übergängen die Zilien besonders mechanisch belastet werden und sich dadurch in einem ständigen Erneuerungsprozess befinden. Diese Hypothese wird von den REM-Bildern bestärkt, in denen durch die unterschiedlich hohen Zilien ein schachbrettartiges Muster entsteht. Die immer wiederkehrende Beschädigung des Epithels würde somit einen Funktionsverlust darstellen, wodurch einerseits der Abtransport von Antigenen, andererseits aber auch die Integrität des Epithels aufgehoben wäre. Dadurch wäre den Antigenen der Weg in das Wirtsgewebe geebnet. Diese Annahme könnte erklären, warum sich BALT später an genau diesen Stellen entwickelt.

Die alternative Hypothese basiert auf der Annahme, dass es sich bei den oben erwähnten Zellen wirklich um M-Zellen des Huhnes handelt. Dadurch wäre ebenfalls die Lage des BALT in diesen Bereichen erklärbar, da die M-Zellen die mit der Luft eingeatmeten Antigene mittels Transzytose zu den darunter gelegenen APCs transportieren könnten. Die Existenz von M-Zellen in der Lunge des Huhnes bleibt aber weiterhin ungeklärt und muss im Rahmen zukünftiger Untersuchungen geprüft werden. Eine Aufklärung hierzu kann beispielsweise die intratracheale in vivo

Applikation von fluoreszenzmarkierten Latexbeads erbringen, deren Aufnahme durch existierende M-Zellen gezeigt werden könnte. Die Tatsache, dass der zilienlose Randbereich mit dem abgeflachten Epithel und den fehlenden Becherzellen vor den ersten Lymphozyten gesehen wurde, spricht gegen die Vermutung von Fagerland und Arp (95), dass dieser Zustand ein Ergebnis der Lymphozyteneinwanderung darstellt. Ob der Zustand der Zilienlosigkeit physiologisch ist oder durch eingewanderte Zellen und ihre Botenstoffe induziert wurde, könnten Untersuchungen an in ovo Lungen vor dem Zeitpunkt der „im Ei Atmung“ beantworten. Diese Lungen würden den naiven Zustand des Organes wiedergeben und könnten somit Antworten auf die genannten Fragen geben. Unabhängig davon, welche der beiden Hypothesen sich als richtig erweist, scheint die Lage des BALT vorbestimmt zu sein, wie bereits für das BALT der Maus gezeigt wurde (82). Ob allerdings die Entstehung des Hühner BALT antigenunabhängig stattfindet, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht sicher beantworten.

Mit zunehmendem Alter stieg die Zahl der Leukozyten im BALT an, wobei den größten Teil die $Kul1^+$ Makrophagen und DCs darstellt. Der Anteil an Lymphozyten nahm jedoch langsam aber stetig zu. Dabei waren T-Zellen zeitlich vor den B-Zellen zu sehen, was mit den Ergebnissen von Jeurissen (92) übereinstimmt. Das Erscheinen der T-Zellen als erste Lymphozyten im Primärbronchus könnte darin begründet liegen, dass diese Zellen noch während der Embryonalentwicklung den Thymus verlassen ($TCR1^+$ T-Zellen am Embryonaltag (E) 15 und $TCR2^+$ T-Zellen am E19) (106), wohingegen die B-Zellen erst um den Zeitpunkt des Schlupfes aus der Bursa die Peripherie besiedeln und somit mit einer zeitlichen Verzögerung nach den T-Zellen die Lunge erreichen. Ob auch im Primärbronchus eine Abweichung in der Summe der $CD3^+$ Zellen zu der Summe der $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen besteht, wie sie für das Parenchym beschrieben wurde, lässt sich auf Grund der hier angewandten Methode nicht beurteilen. Hierzu wäre es für die Zukunft sinnvoll, Doppelfärbungen für die T-Zell Subpopulationen durchzuführen um diese Zellen einem genauen Phänotyp zuordnen zu können.

Erst in der zweiten Entwicklungsphase (zweite bis vierte Lebenswoche) steigt die Zahl der Lymphozyten an, liegt aber immer noch weit hinter der der $Kul1^+$ myeloiden Zellen, so dass auch in diesem Alter die unspezifische Abwehr dominiert. Dennoch weist die steigende Einwanderung der Lymphozyten in den Primärbronchus auf ein Signal hin, das diese Zellen dazu veranlasst, einzuwandern. Dieses Signal könnte

einerseits durch den Antigenkontakt erfolgt sein, der mit Hilfe von möglicherweise existierenden M-Zellen vermittelt wurde. Ebenfalls denkbar wäre, dass das zilienlose Epithel, auf Grund der dünneren Barriere, das Eindringen von Fremdmaterial erleichtert. Andererseits wäre es aber auch möglich, dass für die primäre Lymphozyteninfiltration keinerlei Antigenkontakt nötig ist, wie dies für die Peyerschen Platten vom Säuger nachgewiesen ist (107).

In seiner weiteren Entwicklung zeigt das BALT der dritten Entwicklungsphase (sechste bis achte Lebenswoche) eine Separierung in T- und B-Zellbereiche. Diese Separierung stellt ein deutliches Zeichen für die Ausreifung des Hühner BALT dar. Vom NALT der Maus ist bekannt, dass es sich ebenfalls postnatal entwickelt und seinen ausgereiften Zustand erst mit fünf bis acht Wochen nach der Geburt erreicht (108). Auch das NALT der Ratte entwickelt sich postnatal. Die Tatsache, dass sowohl die Entwicklung von NALT als auch die des BALT erst postnatal stattfindet, deutet auf einen Stimulus hin, der nach der Geburt stattfindet, bei dem es sich um eingeatmete Umweltantigene handeln könnte (68). Die Kenntnis, dass die Entwicklung der Peyerschen Platten bei der Maus bereits vor der Geburt stattfindet, zeigt, dass Antigenkontakt zur Entwicklung von MALT nicht zwingend notwendig ist (107). Gleichzeitig konnten NALT Formationen auch bei Mäusen beobachtet werden, die unter keimfreien Bedingungen geboren wurden und aufgewachsen sind. *Hiroshi Kiyono und Stoshi Fukuyama* (68) vermuten für das NALT der Maus, dass die Initiation der NALT Genese genetisch auf den Zeitpunkt nach der Geburt festgelegt ist und der anschließende Reifungsprozess durch Umweltantigene kontrolliert wird. Ähnliches kann auch für das BALT des Huhnes vermutet werden.

Während der altersabhängigen Entwicklung des BALT erreicht die B-Zellzahl der sechs Wochen alten Hühner den stärksten Anstieg im Vergleich zur Altersstufe zuvor, wobei sie aber noch keine germinalen Zentren bilden, sondern nur in der Peripherie des Lymphfollikels zu finden sind. Diese Lymphozytenseparation, bei der die T-Zellen im Zentrum und die B-Zellen in der Peripherie des Follikels zu finden sind, wurde bereits von Jeurissen (92) beobachtet.

Seine volle Ausdifferenzierung erreichte das BALT bei den von uns untersuchten Tieren erst im Alter von zwölf Wochen. Zu diesem Zeitpunkt stellte sich folgendes Bild dar: Die Menge der Lymphozyten hatte einen enormen Anstieg erfahren. Die Lymphozytenansammlungen nehmen annähernd die Hälfte des Primärbronchusquerschnittes ein und weisen mehrere Follikel auf. Dabei wurden

diese Follikel von einem flacher werdenden, teilweise zilienlosen und von Becherzellen freiem Epithel bedeckt. Gleichzeitig konnten in den Semidünnschnitten HEV ähnliche Strukturen beobachtet werden, die in den T-Zellbereichen lokalisiert waren und ein wichtiges Charakteristikum für das MALT darstellen. Ob es sich hierbei wirklich um HEV handelt, ist nicht sicher. Um diese Frage zu beantworten, sind zukünftig immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern für periphere Lymphknoten-Adhesine (PNAd) geplant.

Obwohl das BALT in der immunhistologischen Untersuchung deutlich in das Lumen des Primärbronchus hineinragte, ist es in der REM Untersuchung nicht gelungen, BALT Protrusionen entsprechenden Aussehens darzustellen. Es konnten hierbei lediglich kleine, leicht erhabene, ins Lumen ragende Vorwölbungen dargestellt werden, die nur bei einer geringen Tierzahl und bei weitem nicht in der Anzahl und Dominanz vorkamen, wie sie von Fagerland für die Pute (95) und das Huhn (64) beschrieben wurden. Ein weiterer wesentlicher Punkt, in dem unsere Ergebnisse deutlich von den Angaben der Literatur abweichen, stellt das Alter, in dem reifes BALT zu finden war, dar. Dabei konnten sowohl Jeurissen et al. (94) als auch Fagerland et al. (64) bereits mit zwei Wochen germinale Zentren sehen.

Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen könnte zum einen in den unterschiedlichen Haltungsbedingungen, zum anderen in der individuellen Reaktionslage der Tiere zu sehen sein. Bereits Fagerland und Arp konnten durch Untersuchungen des BALT an konventionell (Bodenhaltung) und in luftgefilterten Räumen gehaltenen Tieren zeigen, dass die Aufnahme von Antigenen durch die eingeatmete Luft die Entwicklung des BALT beschleunigt (64, 93). Zusätzlich zeigt die vorliegende Arbeit, dass selbst Tiere gleichen Alters unter identischen Haltungsbedingungen deutliche Unterschiede in den Untersuchungsergebnissen aufweisen, wie dies beispielsweise für den Ausprägungsgrad der Lymphozyteninfiltrate im Primärbronchus zu sehen war. Inwieweit rasseabhängige Unterschiede diesbezüglich existieren, wurde bisher noch nicht untersucht. Aus den genannten Gründen erscheint es sinnvoll, dass sich die verschiedenen Arbeitsgruppen, die sich mit der Vogellunge beschäftigen, in ihren Untersuchungen um eine Standardisierung der Haltungsbedingungen bemühen. Hierzu erscheint es sinnvoll, einige der variablen Faktoren, wie zum Beispiel Staubbelastung, Schadgaskonzentration und Gesamtkeimzahl zu bestimmen. Mit diesen Daten wären die Arbeitsgruppen in der Lage, ihre Daten mit denen anderer

Gruppen zu vergleichen. Gleichzeitig ergibt sich dadurch die Möglichkeit, eine Aussage über die Auswirkungen der Haltungsbedingungen auf die Entwicklung des Lungenabwehrsystems abzuleiten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Daten aus der Literatur zeigen, dass die Entwicklung des BALT beim Huhn in seinem Grundprinzip immer gleich abläuft, jedoch der Zeitpunkt seiner vollständigen Differenzierung variieren kann.

5.2.2 Ergebnisse des Lungenparenchyms

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, existieren zur Verteilung und Organisation von Immunzellen im Parenchym der Lunge nur sehr wenige Daten. Dies beruht mitunter auf der Tatsache, dass den Untersuchern die Möglichkeit gefehlt hat, das Parenchym in unfixiertem Zustand unter Strukturerhalt zu analysieren. Gleichzeitig führten die wenigen Untersuchungen des Parenchyms zu dem Bild, dass zwar Ansammlungen von Zellen zu beobachten sind, diese aber zu keinem Zeitpunkt eine Organisation in T- und B-Zellbereiche aufweisen. Diese Ergebnisse wiederum führten dazu, dass die Teilnahme des Lungenparenchyms in der Immunabwehr der Lunge unterschätzt wurde. Deshalb erscheint es geboten, ein Organ systematisch zu untersuchen, über dessen Abwehr bisher nur wenig bekannt ist. Das bedeutet eben auch, dass es in seiner Gesamtheit betrachtet werden muss, da die Lunge nicht nur bezüglich ihrer Aufgabe als Gasaustauschendes Gewebe, sondern auch in Bezug auf ihre Beteiligung an der Immunabwehr als Einheit zu verstehen ist.

Auf Grund der erstmalig exakten Untersuchung der Parabronchen und des interparabronchalen Bindegewebes, können im Rahmen der vorliegenden Arbeit ganz neue Ergebnisse und Erkenntnisse vorgestellt werden.

Wie bereits für den Primärbronchus des Eintagskükens dargestellt, bestand die Leukozytenpopulation auch in den Parabronchen aus Zellen der unspezifischen Abwehr. Diese kamen zahlreich vor, wurden aber stets nur als solitäre Zellen und nie in Ansammlungen angetroffen. Diese Situation änderte sich jedoch mit zunehmendem Alter der Tiere rapide: Bereits eine Woche später konnte ein enormer Anstieg dieser Zellen verzeichnet werden, wobei sich ihre Zahl beinahe verdoppelte. Gleichzeitig konnten sie nun in Gruppen beobachtet werden und kamen besonders häufig in den Atriensepten vor. Dies spricht für eine antigenabhängige Einwanderung der $Ku1^+$ Zellen, die vor allem durch den Anstieg in den Atriensepten unterstrichen wird, da die Atrien eine Art Schleuse für die Luft darstellen, durch die sie in tiefer

gelegene gasaustauschende Bereiche vordringt und somit einen Bereich hohen Antigenkontakts darstellt. Diese Annahme wurde ebenfalls durch die REM Bilder bestätigt, in denen deutlich gezeigt werden konnte, dass das Atrienepithel eine große und faltige Oberfläche besitzt. Es liegt nahe, dass der Atrienauskleidung eine besondere Funktion in der Reinigung der Einatemluft zukommt. Auch die Tatsache, dass das Atriemeepithel durch einen monoklonalen Antikörper, der dendritische Zellen erkennt, angefärbt wurde (92), ließ Jeurissen vermuten, dass es sich hierbei um Zellen handelt, welche die Funktion der Alveolarmakrophagen des Säugers übernehmen. Der in dieser Arbeit angewandte Antikörper (Kul1) färbte sehr spezifisch Zellen der unspezifischen Abwehr an, konnte aber zu keinem untersuchten Zeitpunkt Zellen im Atriemeepithel erkennen. Hingegen wurden Kul1⁺ Zellen subepithelial beobachtet. Zum gleichen Ergebnis, dass Makrophagen in ihrer Lage subepithelial zu sehen sind, kamen auch Lorz und Lopez (42) im Rahmen von Untersuchungen an Taubenlungen. Dennoch stellt das Atriemeepithel mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit phagozytosefähige Zellen dar. Dieses Epithel zeigte in der lektinhistochemischen Färbung mit WGA (Wheat germ agglutinin) eine intensive Färbung. Von diesen auf der Zelloberfläche nachgewiesenen N-Acetylglukosaminen wird vermutet, dass sie eine wichtige Rolle bei der mikrobiellen Adhäsion spielen (109). Durch ihr großflächiges Vorkommen seien sie in der Lage, die Luft sehr ergiebig von Fremdstoffen zu reinigen. Dies muss jedoch in weiteren Studien genauer untersucht und bewiesen werden.

Die in der parabronchalen Wand der ersten Entwicklungsphase selten vorkommenden Lymphozyten konnten größtenteils als T-Zellen angesprochen werden, die fast ausschließlich CD4⁺ und TCR2⁺ waren. Dabei fiel jedoch auf, dass sowohl die Summe der TCR1⁺ und TCR2⁺ T-Zellen als auch die der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen weit unter der Zahl der CD3⁺ T-Zellen lag. Ähnliches wurde bereits von Fagerland et al. (93) beim Eintagsküken beobachtet, wobei sie die Vermutung äußerten, dass es sich hierbei um unreife T-Zellen handeln könnte. Diese Erklärung erscheint eher unwahrscheinlich, da bekannt ist, dass T-Zellen erst nach ihrer Reifung den Thymus verlassen (106). Es könnte sich vielmehr um natürliche Killerzellen handeln, von denen bekannt ist, dass sie beim Huhn intrazytoplasmatisch CD3⁺ und auf ihrer Oberfläche CD8⁺, CD4⁻, TCR1⁻ und TCR2⁻ sind. Diese Zellen werden auf Grund des Fehlens von T-Zell-Rezeptoren (TCR) auch als TCR0 Zellen bezeichnet und repräsentieren eine Thymus-unabhängige Zelllinie, wie die natürliche

Killerzellen (NK) im Säuger (110). Derzeit steht kein in der Lunge funktionierender NK-Zell-Marker zur Verfügung, somit kann der Nachweis, dass es sich hierbei um NK-Zellen handelt, erst in zukünftigen Arbeiten erbracht werden.

In der zweiten Entwicklungsphase zeichnete sich eine Zunahme der Leukozyteninfiltrate in der parabronchalen Wand ab, die zunächst noch mehrheitlich aus Zellen der unspezifischen Abwehr bestehen. Erst in der dritten Entwicklungsphase veränderte sich ihre Zusammensetzung, so dass sie im Wesentlichen aus T-Zellen bestanden. Somit ist zu diesem Zeitpunkt erstmals eine Dominanz der spezifischen über die Zellen der unspezifischen Immunabwehr in der Hühnerlunge zu sehen, was für die vollständige Ausreifung des Lungenabwehrsystems spricht. Gleichzeitig hatte die Zahl der einzeln im Gewebe vorkommenden T-Zellen zugenommen. Dieses Bild stellt wahrscheinlich die Folge der alltäglich stattfindenden Antigenaufnahme dar. Die zunehmende Präsenz der spezifischen Abwehr spricht für eine bessere Adaptation des Immunsystems gegenüber bekannten Antigenen, die vor allem auch durch die deutlich angestiegene Zahl der CD8⁺ T-Zellen wiedergegeben wird.

Im Alter von einer Woche waren im Primärbronchus, den Parabronchen und dem interparabronchalen Bindegewebe nur wenige T-Zellen zu finden. Lediglich die Zwickel wiesen eine deutlich größere Zahl an T-Zellen auf. Diese Lymphozytenansammlungen nahmen mit dem Alter an Größe und Häufigkeit zu. Dabei handelt es sich um T-Zellen, die entweder durch Makrophagen angelockt wurden oder aber antigenunabhängig an ihren vorbestimmten Ort eingewandert sind und eine wichtige Rolle bei der Organisation der Zwickel einnehmen. Für den Säuger wurden Zellen beschrieben, denen bei der Entwicklung von sekundär lymphatischem Gewebe, wie den Lymphknoten und dem MALT, eine essenzielle Rolle zukommt (68). Diese Zellen sind beim Säuger unter der Bezeichnung „inducer cell“ bekannt und zeigen den folgenden Phänotyp CD3⁻CD4⁺CD45⁺. Mäusen, denen durch Deletion eines Genes (*Id2*-Gen) diese Zellen vollkommen fehlen, bildeten kein sekundär lymphatisches Gewebe aus (108). Inwieweit ähnliche Zellen beim Huhn vorkommen und wie diese Zellen aussehen, ist bisher nicht bekannt. Dennoch ist die Existenz einer ähnlichen Zellpopulation sehr wahrscheinlich, da ein übergeordnetes Signal für die Entstehung von lymphatischem Gewebe existieren muss. Dieses muss antigenunabhängig erfolgen, da nur so erklärt werden kann, warum speziell im Bereich der Zwickel und nicht in den Atrienwänden T- und B-Zellen organisiert

vorkommen. Dabei stehen gerade die Zwickel in keinem direkten Kontakt zu den eingeatmeten Antigenen, wie es beispielsweise für die Atrien zutrifft.

In der zweiten Entwicklungsphase zeigten sich auch in den Zwickeln deutliche individuelle Unterschiede, obwohl es sich hierbei um Tiere handelte, die unter denselben Bedingungen gehalten wurden. Ob die Ursache dieser Unterschiede in der schnelleren Reifung des Lungenabwehrsystems mancher Tiere zu sehen ist oder ob dieser Zustand durch einen vermehrten Antigenkontakt hervorgerufen wurde, lässt sich an dieser Stelle nicht beantworten. Im ersten Falle wäre zu klären, welche Ausgangssituation sich auf die Gesundheit des Tieres positiver auswirkt. Es wäre vorstellbar, dass Tiere, deren Lungen im frühen Alter bereits starke Infiltrate in den Zwickeln aufweisen, besser vor Erkrankungen geschützt sind. Andererseits könnte dies aber auch eine überschießende Reaktion auf Antigene darstellen und somit ein pathologisches Bild widerspiegeln, das sich auf die Gesundheit des Tieres negativ auswirkt. Es kann an dieser Stelle nur vermutet werden, dass Antigene zwar für die Ausbildung von Zwickelinfiltraten grundsätzlich nicht nötig sind, ihre Entwicklung aber deutlich beschleunigen. Dennoch bleibt all dies eine Vermutung, die in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden muss.

In der nächsten Entwicklungsphase wiesen die Zwickelinfiltrate kaum noch Zellen der unspezifischen Abwehr auf, dafür aber kleine Gruppen von B-Zellen. Die Zahl dieser B-Zellen zeigte in der vierten Entwicklungsphase einen enormen Anstieg, so dass sie die Zahl der T-Zellen erreichten. Erstmals konnten bei den zwölf Wochen alten Tieren Zwickelinfiltrate gefunden werden, die eine Separierung der Lymphozyten in T- und B-Zellareale aufwiesen.

5.2.3 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann für die Lunge gesagt werden, dass sowohl im Primärbronchus als auch im interparabronchalen Bindegewebe eine sehr ähnliche Entwicklung stattfindet: Beide Regionen weisen zunächst Zellen der unspezifischen Abwehr auf, denen die T-Zellen folgen und mit zunehmendem Alter die Zahl der Kul1⁺ Zellen übersteigen. Erst mit einer deutlichen zeitlichen Verzögerung folgen die B-Zellen, die einen raschen Anstieg erfahren und zur Bildung von Follikeln führen. Die Lunge junger Tiere zeigt sehr gleichmäßig verteilte Kul1⁺ Zellen, die mit dem zunehmenden Antigenkontakt im Alter ansteigen. Obwohl Antigenkontakt in der ganzen Lunge möglich ist, bildet sich speziell im Primärbronchus und in den Zwickeln

des interparabronchalen Bindegewebes lymphatisches Gewebe aus. Daraus kann der Rückschluß gezogen werden, dass die Anwesenheit von Antigenen allein nicht ausreicht, um Lymphozyten zum Einwandern und zur anschließenden Organisation zu stimulieren. Vielmehr bildet sich lymphatisches Gewebe an wahrscheinlich genetisch vorbestimmten Stellen aus, denen keine gasaustauschende Funktion zukommt, um auf diese Weise die Beeinträchtigung des Gasaustausches zu vermeiden.

Die altersabhängige Reifung des Immunsystems der Lunge zeigt sehr deutlich, dass in der gesamten Lunge jüngerer Tiere zunächst lediglich die Mechanismen der unspezifischen Abwehr funktionsfähig sind. An dieser Stelle ist die Frage berechtigt, wie junge Tiere mit in der Lunge aufgenommenen Antigenen umgehen. Vom Säuger ist bekannt, dass antigenbeladene APCs in die regionalen Lymphknoten abwandern und dort Antigene präsentieren. Doch auf Grund der Tatsache, dass das Huhn keine Lymphknoten besitzt, wäre es denkbar, dass die Milz die Aufgabe der Lymphknoten übernimmt, bis lymphatisches Gewebe in der Lunge selbst und in den Zwickeln ausgebildet ist. Dieses lymphatische Gewebe wäre dann in der Lage, die dem Huhn fehlenden regionalen Lymphknoten der Lunge zu ersetzen. Das BALT kann auf Grund seiner Lage dieser Aufgabe sicherlich nicht alleine nachkommen. Die strategisch günstige Lage ermöglicht es dem BALT, auch auf solche Antigene schnell zu reagieren, die auf Grund der Reinigungsfunktion von Becherzellen und des Flimmerepithels zunächst einmal eliminiert werden. Die Lymphozyteninfiltrate in den Zwickeln sind durch ihr häufiges Vorkommen und ihre Lokalisation für die APCs der Parabronchuswand sehr gut zu erreichen. Es wäre denkbar, dass dieses Gewebe gemeinsam mit dem BALT Funktionen der fehlenden Lymphknoten übernimmt und somit einen Ort der Antigenpräsentation darstellt. Dadurch könnten das BALT gemeinsam mit den Lymphozyteninfiltraten der Zwickel der induzierenden Seite zugeordnet werden, in der die Antigenpräsentation stattfindet. Der Primärbronchus ausschließlich der BALT Regionen sowie die Parabronchenwand können dagegen der Effektor Seite zugeordnet werden (Abbildung 9).

Obwohl bei allen Altersstufen, betreffend der BALT Entwicklung, charakteristische Merkmale beobachtet werden konnten, ließen sich einige Tiere finden, die im Parenchym wesentlich weiter entwickelt waren als andere Tiere ihrer Altersstufe. Diese Individualität kann auf Grund des bisherigen Kenntnisstandes nicht sicher erklärt werden. Hierzu fehlen Untersuchungen, ob und inwieweit die Entwicklung des

Immunsystems der Lunge von Antigenen abhängt. Diesbezüglich erscheint es sinnvoll, Tiere unter sehr deutlich abweichenden Haltungsbedingungen zu untersuchen. Gleichzeitig muss für das Huhn gezeigt werden, ob und wo die Entwicklung von lymphatischem Gewebe unter keimfreien Bedingungen stattfindet.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob Tiere mit deutlich stärkeren Infiltraten durch diese auch besser vor Pathogenen geschützt sind und somit eine bessere Abwehrlage besitzen. Denkbar ist es auch, dass es sich hierbei um einen krankhaften Zustand handelt, der durch chronische subklinische Lungenkrankungen ausgelöst wird und in diesem Rahmen auch als Indikator für die Gesundheit der Hühner verwendet werden könnte.

5.2.4 Klärungsbedarf

Es bleibt für die Zukunft noch zu klären, ob die BALT-Entstehung an den Abgängen des Primär- zum Sekundärbronchus antigenunabhängig erfolgt, wie es anhand von subkutanen Lungentransplantationen für die Maus gezeigt wurde (82). Die Untersuchung eines subkutan transplantierten embryonalen Primärbronchus könnte helfen, diese Frage zu beantworten.

Für den Säuger wurden Zellen beschrieben, denen für die Entwicklung von sekundär lymphatischem Gewebe, wie den Lymphknoten und dem MALT, eine essenzielle Rolle zukommt (68). Mäusen, denen durch Deletion eines Genes diese Zellen vollkommen fehlen, bildeten kein sekundär lymphatisches Gewebe aus (108). Ob ein entsprechender Zelltyp beim Huhn existiert und ähnliche Aufgaben übernimmt, muss in Zukunft untersucht werden.

Eine für die Infektionsmedizin und die Vakzinologie wichtige Frage stellt sich in der Verteilung der professionell antigenpräsentierenden Zellen. Ihre Morphologie, ihr hämatopoetischer Ursprung, ihre generelle Verteilung und ihre Assoziation mit Lymphozyten sind bisher unbekannte Charakteristika. Aufbauend auf den mit dieser Arbeit vorgelegten Detailkenntnissen von der Struktur des Lungenabwehrsystems und mit der Etablierung einer geeigneten Technik zur immunhistologischen Untersuchung der gesamten Lunge, ist es nun möglich, Untersuchungen durchzuführen, die diese Fragen beantworten.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung der Struktur des Immunsystems in der Hühnerlunge und dessen Entwicklung in den ersten drei Lebensmonaten. Hierzu wurden die Organe von Hühnern der Linie M11 (Leghorn) im Alter von einem, drei und sieben Tagen sowie zwei, drei, vier, sechs, acht und dreizehn Wochen immunhistologisch, raster- (REM) und transmissionselektronenmikroskopisch (TEM) untersucht. Für die immunhistologische Untersuchung wurde die Methode der Agarose-Ausgußtechnik für das Huhn etabliert. Dadurch war es erstmals möglich, die gesamte Lunge, hinsichtlich des Verteilungsmusters immunkompetenter Zellen, unter Strukturerhalt zu beurteilen.

In der Hühnerlunge konnte eine altersabhängige Entwicklung des Immunsystems nachgewiesen werden. Dabei zeigten die einzelnen Abschnitte der Lunge, bestehend aus dem Primärbronchus mit dem Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebe (BALT), den Parabronchen und dem interparabronchalen Bindegewebe altersabhängig ein unterschiedliches Bild hinsichtlich der Verteilung und des Vorkommens immunkompetenter Zellen. Vier Entwicklungsphasen konnten unterschieden werden. Die zweite Entwicklungsphase umfasste die Tiere der zweiten, dritten und vierten Lebenswoche, gefolgt von der dritten Entwicklungsphase (sechste und achte Lebenswoche). Die ältesten Tiere (dreizehn Wochen) wurden der vierten Entwicklungsphase zugeordnet.

In der ersten Entwicklungsphase dominierten die Zellen der unspezifischen Abwehr deutlich über die der spezifischen Abwehr. Nur vereinzelt wurden T-Zellen beobachtet. Noch seltener waren B-Zellen nachweisbar. Auch in der darauf folgenden Entwicklungsphase dominierten die $Kul1^+$ myeloiden Zellen das Bild, obwohl die Zahl der Lymphozyten anstieg, wobei deutlich mehr T- als B-Zellen vorkamen. Besonders häufig waren T-Zellen im interparabronchalen Bindegewebe zu beobachten, wo sie kleine Zellaggregate bildeten. Bei den vier Wochen alten Tieren waren erstmals Lymphozytenaggregate im Primärbronchus zu beobachten. In der dritten Entwicklungsphase dominierten erstmals die Lymphozyten über die Zellen der unspezifischen Abwehr. Besonders auffallend war die beginnende Organisation der Lymphozytenaggregate im Primärbronchus, wobei die T-Zellen im Zentrum und die B-Zellen in der Peripherie lagen. Die Parabronchuswand zeigte immer häufiger kleine Zellaggregate, die auch im interparabronchalen Bindegewebe sowohl an

Häufigkeit als auch an Größe zunahmten und hauptsächlich aus T-Zellen bestanden. In der vierten Entwicklungsphase besitzt der Primärbronchus im Zentrum der Lymphozytenaggregate mehrere scharf abgegrenzte B-Zellfollikel und auch die Lymphozytenansammlungen im interparabronchalen Bindegewebe zeigten eine ähnliche Separierung in T- und B-Zellareale.

In den REM-Untersuchungen aller vier Entwicklungsphasen konnten an den Übergängen des Primärbronchus in die Sekundärbronchen regelmäßig zilienlose Bereiche beobachtet werden. Die TEM Untersuchung konnte in diesem Bereich Zellen darstellen, die durch basale Einbuchtungen in engem Kontakt zu Lymphozyten oder Makrophagen standen. Es besteht somit eine strukturelle Ähnlichkeit zu M-Zellen im MALT der Säugetiere.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Immunabwehr der Lunge in der ersten Lebenswoche nahezu ausschließlich von Komponenten der unspezifischen Immunabwehr besteht. Diese wird mit zunehmendem Alter durch Zellen der spezifischen Abwehr ergänzt. Dennoch erreicht das Immunsystem der Lunge der hier untersuchten Tiere seinen voll ausgereiften Zustand erst im Alter von dreizehn Wochen.

7 Summary

The structure and development of the lung immune system in the chicken

Comparatively little is known about the structure and development of the lung associated immune system in the chicken, despite its important role in the defence numerous infectious diseases. In this study lung samples were obtained from line M11 leghorn chickens on days 1, 3 and 7 after hatch and of 2, 3, 4, 6, 8 and 13 weeks old birds for immunohistological, scanning as well as transmission electron microscopy (TEM). Monoclonal antibodies reactive with T-cells (CD3, CD4, CD8), B-cells (BU-1), myeloid cells (KUL1) or all leucocytes (CD45) were used in this study. To maintain the structural integrity of cyropreserved tissue samples for immunohistological studies lung tissue was perfused with low melting agarose by application through the trachea.

An age depended development of the lung immune system was observed and found to show different developmental characteristics in the bronchus associated lymphoid tissue (BALT) and the immune system of the parachoncial tissue and the interparabronchial connective tissue. Roughly, three developmental stages could be discriminated.

During the first week after hatch cells of the innate immune system dominated the picture while T-cells and B-cells were rarely found. Similarly, myeloid cells were much more abounded than lymphocytes in the second stage (2.-4. week). However, an increase of lymphocytes was found with T-cells in excess of B-cells. T-cells were found most frequently in the interparabronchial connective tissue where they formed small aggregates. In wall of the primary bronchus organized lymphoid aggregates were first observed in the 4th week after hatch. In 6-8 weeks old birds (stage 3) distinct B- and T-cell areas began to develop in these lymphoid aggregates with T-cells occupying the central area and B-cells located at the periphery. Increasing frequencies and sizes of T-cell aggregates were also seen in the wall of the parabronchus and the interparabronchial connective tissue at this stage of development.

Finally, in birds older than 12 weeks the BALT structures showed a clear separation into B-cell follicles surrounded by a T-cell area formed by CD4⁺ lymphocytes.

Similarly, distinct B-cell follicles with adjacent T-cell regions were observed in the interparabronchial connective tissue.

Scanning electron microscopy revealed that the epithelium covering the BALT regions at the openings of the secondary bronchi was largely unciliated at all developmental stages. By TEM a unique cell type was found intercalated into this epithelium which was in close contact with lymphocytes and macrophages located in cellular pockets. These structure properties are similar to M-cells in the mammalian mucosa-associated lymphoid tissue (MALT).

In conclusion, the lung associated immune system in the chicken is largely made up of cells of the innate immune system during the first week after hatch. Subsequently, cells of the adaptive immune system start to appear and to form organized lymphoid structures in the primary bronchus and to disseminate in the remaining lung tissue. Mature morphology of these structures is seen in birds 12 weeks and older.

8 Literaturverzeichnis

1. Duncker HR. The lung air sac system of birds. A contribution to the functional anatomy of the respiratory apparatus. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 1971;45(6):7-171.
2. Duncker HR. Lung structure of birds and their air bags. *Verh Anat Ges* 1967;62:597-8.
3. Duncker HR. Vertebrate lungs: structure, topography and mechanics. A comparative perspective of the progressive integration of respiratory system, locomotor apparatus and ontogenetic development. *Respir Physiol Neurobiol* 2004;144:111-124.
4. Duncker HR. Bronchial tree of the bird lung. *Verh Anat Ges* 1967;62:287-92.
5. Duncker HR. The avian lung--palaeo- and neopulmo. *Verh Anat Ges* 1970;64:491-5.
6. Salt GW, Zeuthen E. The respiratory system. In: Marshall AJ, editor. *Biology and comparative physiology of birds*: Academic Press, New York London 1960; 1960. p. 363-409.
7. Hazelhoff EH. Structure and function of the lung of birds. *Poult Sci* 1951;30:3-10.
8. Duncker HR. Structural types of parabronchi of avian lungs. *Verh Anat Ges* 1969;63:297-301.
9. Abdalla MA, Maina JN, King AS, King DZ, Henry J. Morphometrics of the avian lung. 1. The domestic fowl (*Gallus gallus* variant domesticus). *Respir Physiol* 1982;47(3):267-78.
10. Gehr P, Mwangi DK, Ammann A, Maloiy GM, Taylor CR, Weibel ER. Design of the mammalian respiratory system. V. Scaling morphometric pulmonary diffusing capacity to body mass: wild and domestic mammals. *Respir Physiol* 1981;44(1):61-86.
11. Duncker HR. Die funktionelle Anatomie des Lungen-Luftsack-Systems der Vögel - mit besonderer Berücksichtigung der Greifvögel. *Der praktische Tierarzt* 1979;3:209-226.
12. Liebich H-G, König HE, Navarro M, Mülling C. Atmungsapparat. In: König HE, Liebich H-G, editors. *Anatomie und Propädeutik des Geflügels*: Schattauer Verlag, Stuttgart New York; 2001. p. 105-118.
13. Vos HJ. Über die Wege der Atemluft in der Entenlunge. *Zeitschrift vergleichenden Physiologie* 1934;21:552-578.
14. Dotterweich H. Versuche über den Weg der Atemluft in der Vogellunge. *Zeitschrift vergleichenden Physiologie* 1930;11:271-284.
15. Dotterweich H. Ein weiterer Beitrag zur Atmungsphysiologie der Vögel. *Zeitschrift vergleichenden Physiologie* 1933;18:803-809.
16. Brandes G. Atmung der Vögel. *Vergleichenden Deutsch. Zoologie Gesellschaft* 1924;28:57-59.

17. Bethe A. Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie. Berlin: Springer-Verlag; 1925.
18. King AS, Payne DC. Does the air circulate in the avian lung? *Anatomical Record* 1960;136:223.
19. Scheid P, Slama H, Piiper J. Mechanisms of unidirectional flow in parabronchi of avian lungs: measurements in duck lung preparations. *Respir Physiol* 1972;14(1):83-95.
20. Jones JH, Effmann EL, Schmidt-Nielsen K. Control of air flow in bird lungs: radiographic studies. *Respir Physiol* 1981;45(2):121-31.
21. Dotterweich H. Die Atmung der Vögel. *Zeitschrift vergleichenden Physiologie* 1936;23:744-770.
22. Banzett RB, Butler JP, Nations CS, Barnas GM, Lehr JL, Jones JH. Inspiratory aerodynamic valving in goose lungs depends on gas density and velocity. *Respir Physiol* 1987;70(3):287-300.
23. Banzett RB, Nations CS, Wang N, Fredberg JJ, Butler JP. Pressure profiles show features essential to aerodynamic valving in geese. *Respir Physiol* 1991;84(3):295-309.
24. Butler JP, Banzett RB, Fredberg JJ. Inspiratory valving in avian bronchi: aerodynamic considerations. *Respir Physiol* 1988;72(2):241-55.
25. Wang N, Banzett RB, Butler JP, Fredberg JJ. Bird lung models show that convective inertia effects inspiratory aerodynamic valving. *Respir Physiol* 1988;73(1):111-24.
26. Wang N, Banzett RB, Nations CS, Jenkins FA, Jr. An aerodynamic valve in the avian primary bronchus. *J Exp Zool* 1992;262(4):441-5.
27. Maina JN, Africa M. Inspiratory aerodynamic valving in the avian lung: functional morphology of the extrapulmonary primary bronchus. *J Exp Biol* 2000;203(Pt 18):2865-76.
28. Janeway CA. Immunobiology: the immune system in health and disease. In. Fourth Edition ed: Current Biology Publications / Garland Publishing; 1999.
29. Kagnoff M. Essentials of mucosal immunology. San Diego: Acad. Press; 1996.
30. Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 1998;10(5):363-72.
31. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216. Epub 2001 Oct 04.
32. Larsson BM, Larsson K, Malmberg P, Palmberg L. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* 1999;23(3):217-30.
33. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-252.
34. Martln-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003;198(4):615-21.

35. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999;17:189-220.
36. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 2002;169(8):4279-87.
37. Ficken MD, Edwards JF, Lay JC. Induction, collection, and partial characterization of induced respiratory macrophages of the turkey. *Avian Dis* 1986;30(4):766-71.
38. Toth TE, Siegel PB. Cellular defense of the avian respiratory tract: paucity of free-residing macrophages in the normal chicken. *Avian Dis* 1986;30(1):67-75.
39. Toth TE, Siegel P, Veit H. Cellular defense of the avian respiratory system. Influx of phagocytes: elicitation versus activation. *Avian Dis* 1987;31(4):861-7.
40. Maina JN, Cowley HM. Ultrastructural characterization of the pulmonary cellular defenses in the lung of a bird, the rock dove, *Columba livia*. *Proceedings of the Royal Society of London B* 1998;265:1567-1572.
41. Stearns RC, Barnas GM, Walski M, Brain JD. Deposition and phagocytosis of inhaled particles in the gas exchange region of the duck, *Anas platyrhynchos*. *Respir Physiol* 1987;67(1):23-36.
42. Lorz C, Lopez J. Incidence of air pollution in the pulmonary surfactant system of the pigeon (*Columba livia*). *Anat Rec* 1997;249(2):206-12.
43. Im Hof V, Klauser M, Gehr P. Phagocytic properties and organelle motility of pulmonary macrophages from smokers and nonsmokers estimated in vitro by magnetometric means. *Eur Respir J* 1990;3(2):157-62.
44. Toth TE, Pyle RH, Caceci T, Siegel PB, Ochs D. Cellular defense of the avian respiratory system: influx and nonopsonic phagocytosis by respiratory phagocytes activated by *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 1988;56(5):1171-9.
45. Mensah GA, Brain JD. Deposition and clearance of inhaled aerosol in the respiratory tract of chickens. *J Appl Physiol* 1982;53(6):1423-8.
46. Klika E, Scheuermann DW, De Groodt-Lasseel MH, Bazantova I, Switka A. Pulmonary macrophages in birds (barn owl, *Tyto tyto alba*), domestic fowl (*Gallus gallus f. domestica*), quail (*Coturnix coturnix*), and pigeons (*Columbia livia*). *Anat Rec* 1996;246(1):87-97.
47. Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 1993;23(7):1595-601.
48. Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1993;178(2):509-19.
49. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182(2):389-400.

50. Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, et al. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997;387(6634):713-7.
51. Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998;281(5373):96-9.
52. Glick B, T.S. Chang TS, Jaap RG. The bursa of Fabricius and antibody production on the domestic fowl. *Poult Sci*, 1956;35:p. 224ff.
53. Reynaud CA, Anquez V, Dahan A, Weill JC. A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell* 1985;40(2):283-91.
54. Reynaud CA, Anquez V, Grimal H, Weill JC. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 1987;48(3):379-88.
55. Bonneville M, Janeway CA, Jr., Ito K, Haser W, Ishida I, Nakanishi N, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of gamma delta T cells. *Nature* 1988;336(6198):479-81.
56. Bucy RP, Chen CL, Cihak J, Losch U, Cooper MD. Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J Immunol* 1988;141(7):2200-5.
57. Janeway CA, Jr., Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol Today* 1988;9(3):73-6.
58. Biggs PM. The association of lymphoid tissue with the lymph vessels in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Acta Anat (Basel)* 1957;29(1-2):36-47.
59. Bienenstock J, McDermott M, Befus D, O'Neill M. A common mucosal immunologic system involving the bronchus, breast and bowel. *Adv Exp Med Biol* 1978;107:53-9.
60. Kracke A, Hiller AS, Tschernig T, Kasper M, Kleemann WJ, Troger HD, et al. Larynx-associated lymphoid tissue (LALT) in young children. *Anat Rec* 1997;248(3):413-20.
61. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3(4):331-41.
62. Nair PN, Schroeder HE. Duct-associated lymphoid tissue (DALT) of minor salivary glands and mucosal immunity. *Immunology* 1986;57(2):171-80.
63. Bienenstock J, Johnston N, Perey DY. Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab Invest* 1973;28(6):686-92.
64. Fagerland JA, Arp LH. Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens. *Avian Dis* 1993;37(1):10-8.
65. Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(6):1270-9.
66. Knop E, Knop N. Lacrimal drainage-associated lymphoid tissue (LDALT): a part of the human mucosal immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(3):566-74.

67. Knop E, Knop N. [Eye-associated lymphoid tissue (EALT) is continuously spread throughout the ocular surface from the lacrimal gland to the lacrimal drainage system]. *Ophthalmologe* 2003;100(11):929-42.
68. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(9):699-710.
69. Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol* 2004;25(11):570-7.
70. Cleary PP, Zhang Y, Park HS. Nasal associated lymphoid tissue & M cells, a window to persistent streptococcal infections. *Indian J Med Res* 2004;119(Suppl):57-60.
71. Fujimura Y, Takeda M, Ikai H, Haruma K, Akisada T, Harada T, et al. The role of M cells of human nasopharyngeal lymphoid tissue in influenza virus sampling. *Virchows Arch* 2004;444(1):36-42. Epub 2003 Oct 10.
72. Jeurissen SH, Duijvestijn AM, Sontag Y, Kraal G. Lymphocyte migration into the lamina propria of the gut is mediated by specialized HEV-like blood vessels. *Immunology* 1987;62(2):273-7.
73. Burns RB. Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Res Vet Sci* 1982;32(3):359-67.
74. Olah I, Glick B, Taylor RL, Jr. Meckel's diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken. *Anat Rec* 1984;208(2):253-63.
75. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Atmungsapparat*. 2. Auflage ed: Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1992; 1992.
76. Bang BG, Bang FB. Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chickens. *Am J Pathol* 1968;53(5):735-51.
77. Klein E. *The anatomy of the lymphatic system*. II. The lung. London: Smith, Elder and Co.; 1875.
78. Sminia T, van der Brugge-Gamelkoorn GJ, Jeurissen SH. Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit Rev Immunol* 1989;9(2):119-50.
79. Plesch BE, Gamelkoorn GJ, van de Ende M. Development of bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in the rat, with special reference to T- and B-cells. *Dev Comp Immunol* 1983;7(1):179-88.
80. Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Massin N, Moulin JJ, Faure GC. Immunohistological analysis of macrophages, B-cells, and T-cells in the mouse lung. *Anat Rec* 1994;239(2):150-7.
81. Giddens WE, Jr., Whitehair CK, Carter GR. Morphologic and microbiologic features of trachea and lungs in germfree, defined-flora, conventional, and chronic respiratory disease-affected rats. *Am J Vet Res* 1971;32(1):115-29.
82. Milne RW, Bienenstodk J, Perey DY. The influence of antigenic stimulation on the ontogeny of lymphoid aggregates and immunoglobulin-containing cells in mouse bronchial and intestinal mucosa. *J Reticuloendothel Soc* 1975;17(6):361-9.

83. Plesch B. Histology and immunohistochemistry of BALT in the rat. In: *In Vivo Immunology*. New York: Plenum press; 1982. p. 491.
84. Gregson RL, Davey MJ, Prentice DE. Postnatal development of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the rat, *Rattus norvegicus*. *Lab Anim* 1979;13(3):231-8.
85. Hiller AS, Tschernig T, Kleemann WJ, Pabst R. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and larynx-associated lymphoid tissue (LALT) are found at different frequencies in children, adolescents and adults. *Scand J Immunol* 1998;47(2):159-62.
86. Suda T, Chida K, Hayakawa H, Imokawa S, Iwata M, Nakamura H, et al. Development of bronchus-associated lymphoid tissue in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1999;115(2):357-63.
87. Tschernig T, Pabst R. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology* 2000;68(1):1-8.
88. Sato A, Chida K, Iwata M, Hayakawa H. Study of bronchus-associated lymphoid tissue in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(2):473-8.
89. Sato A, Hayakawa H, Uchiyama H, Chida K. Cellular distribution of bronchus-associated lymphoid tissue in rheumatoid arthritis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(6 Pt 1):1903-7.
90. Richmond I, Pritchard GE, Ashcroft T, Avery A, Corris PA, Walters EH. Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers. *Thorax* 1993;48(11):1130-4.
91. Hiller AS, Kracke A, Tschernig T, Kasper M, Kleemann WJ, Troger HD, et al. Comparison of the immunohistology of mucosa-associated lymphoid tissue in the larynx and lungs in cases of sudden infant death and controls. *Int J Legal Med* 1997;110(6):316-22.
92. Jeurissen SH. Structure and Function of Lymphoid Tissues of the Chicken. *Poult Science Rev* 1994;5:183-207.
93. Fagerland JA, Arp LH. Distribution and quantitation of plasma cells, T lymphocyte subsets, and B lymphocytes in bronchus-associated lymphoid tissue of chickens: age-related differences. *Reg Immunol* 1993;5(1):28-36.
94. Jeurissen SH, Janse EM, Koch G, De Boer GF. Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell Tissue Res* 1989;258(1):119-24.
95. Fagerland JA, Arp LH. A morphologic study of bronchus-associated lymphoid tissue in turkeys. *Am J Anat* 1990;189(1):24-34.
96. Van Alstine WG, Arp LH. Histologic evaluation of lung and bronchus-associated lymphoid tissue in young turkeys infected with *Bordetella avium*. *Am J Vet Res* 1988;49(6):835-9.
97. Bienenstock J, Johnston N, Perey DY. Bronchial lymphoid tissue. II. Functional characteristics. *Lab Invest* 1973;28(6):693-8.
98. Chen CL, Ager LL, Gartland GL, Cooper MD. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *J Exp Med* 1986;164(1):375-80.

99. Luhtala M, Salomonsen J, Hirota Y, Onodera T, Toivanen P, Vainio O. Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species. *Hybridoma* 1993;12(6):633-46.
100. Luhtala M, Koskinen R, Toivanen P, Vainio O. Characterization of chicken CD8-specific monoclonal antibodies recognizing novel epitopes. *Scand J Immunol* 1995;42(1):171-4.
101. Rothwell CJ, Vervelde L, Davison TF. Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;55(1-3):225-34.
102. Mast J, Goddeeris BM, Peeters K, Vandesande F, Berghman LR. Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;61(2-4):343-57.
103. Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM, Cooper MD. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med* 1988;167(2):315-22.
104. Cihak J, Ziegler-Heitbrock HW, Trainer H, Schraner I, Merckenschlager M, Losch U. Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens. *Eur J Immunol* 1988;18(4):533-7.
105. Halbower AC, Mason RJ, Abman SH, Tuder RM. Agarose infiltration improves morphology of cryostat sections of lung. *Lab Invest* 1994;71(1):149-53.
106. Chen CL, Bucy RP, Cooper MD. T cell differentiation in birds. *Semin Immunol* 1990;2(1):79-86.
107. Hashi H, Yoshida H, Honda K, Fraser S, Kubo H, Awane M, et al. Compartmentalization of Peyer's patch anlagen before lymphocyte entry. *J Immunol* 2001;166(6):3702-9.
108. Fukuyama S, Hiroi T, Yokota Y, Rennert PD, Yanagita M, Kinoshita N, et al. Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LTbetaR, and NIK signaling pathways but requires the Id2 gene and CD3(-)CD4(+)CD45(+) cells. *Immunity* 2002;17(1):31-40.
109. Hinterseher C. Lektin histochemische Untersuchungen an der Lunge des Haushuhnes unter besonderer Berücksichtigung BALT-assoziiierter Strukturen. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2005.
110. Bucy RP, Chen CL, Cooper MD. Development of cytoplasmic CD3+/T cell receptor-negative cells in the peripheral lymphoid tissues of chickens. *Eur J Immunol* 1990;20(6):1345-50.

9 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
APC	antigenpräsentierende Zellen
BALT	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe
BCR	B-Zell-Rezeptor
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	bovines Serumalbumin
CALT	Konjunktiva-assoziiertes lymphatisches Gewebe
CD	Differenzierungscluster
DALT	Duct-assoziiertes lymphatisches Gewebe
DC	Dendritic cell
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EALT	Auge-assoziiertes lymphatisches Gewebe
FAE	Follikel assoziiertes Epithel
FARM	Free avian respiratory macrophage
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe
HEV	High endothelial venules
IAV	inspiratory aerodynamic valving
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILF	isolierte Lymphfollikel
LALT	Larynx-assoziiertes lymphatisches Gewebe
LDALT	Lacrimal drainage-assoziiertes lymphatisches Gewebe
LE	Lymphoepithel
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Mm.	Musculi
M-Zellen	Mikrofalten-Zellen, microfold cells
NALT	Nasopharynx-assoziiertes lymphatisches Gewebe

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Pb	Primärbronchus
PP	Peyersche Platten
Sb	Sekundärbronchus
SED	subepitheliale Dome Region
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
SPF	spezifisch pathogenfrei
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verzweigungsmuster der Sekundärbronchen an der linken Lunge eines Schwanes (1).....	3
Abbildung 2: Längsschnitt durch einen Parabronchus.....	5
Abbildung 3: Querschnitt durch mehrere Parabronchen.....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Lungen-Luftsack-Systems (12).....	7
Abbildung 5: Ausgusspräparat des Lungen-Luftsack-Systems (12).	7
Abbildung 6: Inspirations- (weiß) und Expirationsstellung (blau) von Rippen und Sternum (12).....	8
Abbildung 7: Schema des unidirektionalen Luftstromes durch die Lunge während der Inspiration und Expiration (12).	9
Abbildung 8: Schema des Primärbronchus mit seinem extra- und intrapulmonalen Anteil und den Abgängen der Medioventrobronchen kurz nach seinem Eintritt in die Lunge (26).....	10
Abbildung 9: Schematische Darstellung der induktiven und Effektor-Seite am Beispiel des Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) beim Menschen (modifiziert nach (69)).	21
Abbildung 10: Übersicht über die altersabhängige BALT Entwicklung vom Eintagsküken bis zur zwölften Lebenswoche (LW) anhand verschiedener Literaturangaben.	27
Abbildung 11: Stand der Präparation nach dem Abheben des Sternums.....	31
Abbildung 12: Ansicht auf den Querschnitt einer Lungenscheibe.....	31
Abbildung 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Lunge eines 14 Tage alten Tieres.....	41
Abbildung 14: REM-Übersichtsaufnahme der Lunge eines Eintagskükens.....	44
Abbildung 15: Vergrößerung des rot markierten Bereiches aus Abbildung 14.	44
Abbildung 16: Vergrößerung des blau markierten Bereiches aus Abbildung 15.....	45
Abbildung 17: Stärkere Vergrößerung des gelb markierten, zilienfreien Bereiches aus Abbildung 16.....	45
Abbildung 18: Semidünnschnitt des Primärbronchus eines Eintagskükens.	45
Abbildung 19: In der Lamina propria dieses sieben Tage alten Tieres sind deutliche Ansammlungen von CD45 ⁺ Zellen zu erkennen.	46

Abbildung 20: Im Primärbronchus desselben Tieres wie in Abbildung 19 werden erste B-Zellen gesehen.....	47
Abbildung 21: Zu sehen ist ein Ausschnitt eines teilweise längseröffneten Parabronchus von einem sieben Tage alten Tier.	48
Abbildung 22 gibt den in Abbildung 21 rot markierten Bereich vergrößert wieder. ...	48
Abbildung 23 zeigt den in Abbildung 22 blau markierten Bereich stärker vergrößert.	48
Abbildung 24 zeigt die Innenauskleidung eines Atriums bei einem drei Tage alten Tier.....	48
Abbildung 25: CD45 Färbung im Parenchym eines Eintagsküken.....	49
Abbildung 26: AV20 positive Zellen am Querschnitt eines Parabronchus (Eintagsküken).....	50
Abbildung 27: T-Zellverteilung im Parenchym eines Eintagsküken.	50
Abbildung 28: Perivaskuläre T-Zellansammlung bei einem sieben Tage alten Tier im Bereich eines Zwickels.	51
Abbildung 29: CD45 Färbung bei einem Eintagsküken.	52
Abbildung 30: CD45 Färbung bei einem drei Tage alten Tier.....	52
Abbildung 31: Überblick vom Querschnitt eines Primärbronchus und von Parabronchen anhand einer CD3 Färbung beim Eintagsküken.....	53
Abbildung 32: Überblick über die Verteilung von CD3 ⁺ T-Zellen bei einem 3 Tage alten Tier.....	53
Abbildung 33: Querschnitt des Primärbronchus eines sieben Tage alten Tieres.....	54
Abbildung 34: CD45 Färbung im Primärbronchus von drei Wochen alten Hühnern. 56	
Abbildung 35: Übersichtsaufnahme von der Lunge eines 2 Wochen alten Tieres....	57
Abbildung 36: Vergrößerung des blau markierten Bereiches aus Abbildung 35.....	57
Abbildung 37 zeigt den Übergang Pb zu Sb eines drei Wochen alten Tieres.....	57
Abbildung 38 gibt den in Abbildung 37 rot markierten Bereich vergrößert wieder. ...	57
Abbildung 39: Längsschnitt durch die Para-bronchuswand eines drei Wochen alten Tieres.....	58
Abbildung 40 zeigt die Vergrößerung des rot markierten Bereiches aus Abbildung 39.	58
Abbildung 41: CD45 Färbung im Parenchym eines drei Wochen alten Tieres.	59
Abbildung 42: CD45 Färbung im Parenchym eines drei Wochen alten Tieres.	59

Abbildung 43: Verteilungsmuster der CD45 ⁺ Zellen (Leukozyten) im Parenchym von zwei vier Wochen alten Tieren.	60
Abbildung 44: Immunhistologische Lungenschnitte aus dem Bereich des Primärbronchus eines drei Wochen alten Huhnes, welches eine besonders starke Infiltration durch Leukozyten aufweist.....	62
Abbildung 45: Primär- und Sekundärbronchus eines sechs Wochen alten Tieres. ...	63
Abbildung 46: CD45 Färbungen im Parenchym von sechs Wochen alten Tieren. ...	65
Abbildung 47: Immunhistologische Bilder eines sechs Wochen alten Tieres.	66
Abbildung 48: Ausschnitt des Primärbronchus.	67
Abbildung 49: Übergang vom Primär- in den Sekundärbronchus stark vergrößert...	67
Abbildung 50: REM-Bild von einem angeschnittenen Atrium mit Infundibulum und Luftkapillaren.	69
Abbildung 51: Starke Vergrößerung der Atriumoberfläche aus Abbildung 50.....	69
Abbildung 52: Stärkere Vergrößerung einer benachbarten Atrienwand.	69
Abbildung 53: Schnitt durch die Atrienwand (TEM-Bild).	69
Abbildung 54: T-Zellansammlungen in der Parabronchalwand eines zwölf Wochen alten Tieres (anti-CD3-Färbung).	70
Abbildung 55: Verteilung der B-Zellen in derselben Parabronchalwand, wie in Abbildung 54 gezeigt.	70
Abbildung 56: Die T-Zellansammlungen aus der Abbildung 54 bestehen zu einem wesentlichen Teil aus cytotoxischen T-Zellen.....	70
Abbildung 57: Bei den T-Zellansammlungen in der Parabronchalwand handelt es sich in der Mehrzahl um TCR2 ⁺ Zellen.	70
Abbildung 58: Die T-Zellenansammlung innerhalb des Zwickels zeigt eine deutliche Aussparung in dessen Zentrum.	72
Abbildung 59: Zwickel aus Abbildung 58 stärker vergrößert.....	72
Abbildung 60: Die in der Peripherie des Zwickels gelegenen T-Zellen tragen vorwiegend den $\alpha/\nu\beta_1$ TCR.	72
Abbildung 61: Ein deutlich geringerer Teil der T-Zellen in den Zwickeln sind TCR1 ⁺ (Vergleiche Abbildung 60).....	72
Abbildung 62: Die B-Zellen liegen über die gesamten Zwickelinfiltrate verteilt.	72
Abbildung 63: Die Zellen der unspezifischen Abwehr sind vermehrt in der Peripherie der Zwickelinfiltrate wiederzufinden.	72
Abbildung 64: Immunhistologie am Primärbronchus eines 12 Wochen alten Tieres.	73

11 Protokollverzeichnis

Protokoll 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung	32
Protokoll 2: Immunhistochemisches Färbeprotokoll	37
Protokoll 3: Aufbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie.....	39
Protokoll 4: Kontrastierung der TEM Proben	40
Protokoll 5: Verarbeitung der REM Proben nach der Fixierung.....	42

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probenentnahmeplan für die jeweilige Untersuchungsmethode.	28
Tabelle 2: Antikörperspezifität und Quelle	33
Tabelle 3: Einteilung der untersuchten Altersstufen in Entwicklungsphasen.	43
Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Zelltypen in der BALT Region.....	74
Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Zelltypen in der Wand der Parabronchen.....	74
Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Zelltypen in den Zwickeln.	74

13 Herstellerverzeichnis

13.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 3, Material und Methoden integriert.

- 1 AppliChem, Darmstadt
- 2 Amersham Pharmacia, Freiburg
- 3 Sigma, Deisenhofen
- 4 Fluka, Buchs, Ch
- 5 VWR ehemals Merck, Darmstadt
- 6 Roche Diagnostics, Mannheim
- 7 Roth, Karlsruhe
- 8 Serva, Heidelberg
- 9 Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA
- 10 DakoCyomation GmbH, Hamburg
- 11 Richard-Allan Scientific
- 12 Menzel-Gläser, Braunschweig
- 13 Feather, Japan
- 14 Boehringer, Mannheim
- 15 Miles Laboratories Inc., Elkhart, USA
- 16 Polysciences, Eppelheim
- 17 Plano GmbH, Wetzlar
- 18 Eppendorf AG, Hamburg
- 19 Vector Laboratories, Burlingame, Kanada
- 20 Honeywell Riedel-de Haën, Seelze

13.2 Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Paraffin-Ausgießstation	AP280	Microm, Walldorf
Digitale Kamera	PROGRES 3008	Jenoptik AG, Jena
Transmissionselektronenmikroskop-einheit	EM 902	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Kritisch-Punkt Trocknungsgerät	CPD030	BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein
Lichtmikroskop		Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Magnetrührer		Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Mikroskop	Leica DMR	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom-Kryostat	HM500 OM	Microm, Walldorf
Objektträger-Strecktisch	OTS40	Meditate, Burgdorf
Rasterelektronenmikroskop	Digital Scanning Microscope DSM950	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Rotationsmikrotom	HM360	Microm, Walldorf
Schüttler	Stone-Shaker IKA	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Sputtergerät	SCD 004	Balzers, Balzers, Liechtenstein
Transportabler Wärmeschrank	Elphor	Bender & Hobein, München, Karlsruhe, Freiburg
Ultramikrotom	Ultracut E	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H.-G. Liebich und Herrn Prof. Dr. B. Kaspers für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Insbesondere will ich mich bei Herrn PD Dr. Sven Reese für die hervorragende Betreuung und seine unermüdete Hilfsbereitschaft bedanken.

Silvia Mitterer möchte ich sowohl für die exzellente technische Unterstützung als auch für ihre stets aufbauenden Worte danken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Frau Annette Müller für die Anfertigung der TEM Schnitte und die Verarbeitung der REM Proben.

Ganz besonders danke ich Frau Bärbel Amann für die Einführung in die Kunst der Immunhistologie.

Den Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie und des Instituts für Tieranatomie I danke ich für das freundliche Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft, insbesondere Frau S. Mitterer, Frau S. Kothlow und Herrn C. Hinterseher.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Megendorfer und Thomas Hoschka.

Meinen Eltern danke ich für ihre großzügige finanzielle Unterstützung und ihren unerschütterlichen Glauben an mich.

Meinem Mann Mark danke ich für seine verständnisvolle Unterstützung und Geduld.