

Partikelaufnahme in der Hühnerlunge

von Alina Wilhelm

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

Partikelaufnahme in der Hühnerlunge

von
Alina Wilhelm
aus Selenokumsk

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Mitbetreuung durch Dr. med. vet. Grammatia Zengerling

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
PROTOKOLLVERZEICHNIS	XV
TABELLENVERZEICHNIS.....	XVII
I. EINLEITUNG	19
II. LITERATURÜBERSICHT	21
1. Anatomie und Physiologie des aviären Atmungstraktes	21
1.1 Lunge	21
1.2 Bronchialsystem.....	22
1.3 Luftsäcke.....	24
1.4 Gasaustausch.....	26
1.5 Atemphysiologie	27
1.5.1 Atembewegung	27
1.5.2 Luftströmung im Bronchialnetzwerk.....	28
2. Das Immunsystem	29
2.1 Das angeborene Immunsystem	29
2.1.1 Makrophagen	30
2.1.2 Dendritische Zellen.....	33
2.2 Das erworbene Immunsystem.....	36
2.2.1 B-Lymphozyten	37
2.2.2 T-Lymphozyten.....	40
2.3 Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe.....	42
2.3.1 Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe des Huhns	44
2.3.2 Germinale Zentren	44
2.3.2.1 Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe.....	47
2.3.2.2 Paraoculares lymphatisches Gewebe	47
2.3.2.3 Nasaes lymphatisches Gewebe	48
2.3.2.4 Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe	48
2.3.2.5 Entwicklung des Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes	49
3. Partikelaufnahme in der Hühnerlunge	50

3.1	Partikelverteilung	50
3.2	Zelluläre Abwehrmechanismen	51
3.2.1	Avian Respiratory Macrophages.....	51
3.2.2	Dendritische Zellen der Lunge.....	52
3.3	Follikelassoziiertes Epithel	53
3.4	Arienepithel	55
3.5	Infektionsmodelle	56
3.6	Dreidimensionale Rekonstruktionen von Gewebestrukturen	57
III.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	59
IV.	MATERIAL UND METHODEN	61
1.	Tiere	61
2.	Histologie	61
2.1	Neutralrot-Färbung	62
2.1.1	Materialien	62
2.1.2	Applikation	62
2.1.3	Fixierung.....	63
2.1.4	Agaroseapplikation in die Lunge.....	63
2.1.5	Probenentnahme.....	65
2.1.6	Einbettung der Lunge nach Agaroseapplikation.....	66
2.1.7	Schnittanfertigung.....	66
2.2	Tuscheversuche.....	66
2.2.1	Material	67
2.2.2	Füllung der gesamten Lunge.....	68
2.2.3	Lokale in situ-Applikation	69
2.2.4	Fixierung und Probenentnahme	71
2.2.4.1	Nach Füllung der gesamten Lunge	71
2.2.4.2	Nach lokaler in situ-Applikation.....	71
2.2.5	Einbettung.....	71
2.2.5.1	Nach Füllen der gesamten Lunge	71
2.2.5.2	Nach lokaler in situ-Applikation.....	72
2.2.6	Schnittanfertigung.....	73
2.2.6.1	Gefrierschnitte.....	73
2.2.6.2	Paraffinschnitte	73

2.2.6.3	Kunstharzschnitte.....	74
2.2.7	Färbungen	74
2.2.7.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	74
2.2.7.2	Kernechtrot-Färbung.....	75
2.2.7.3	Lichtgrün-Färbung	76
2.3	Beads-Versuche	78
2.3.1	Material	78
2.3.2	Applikation	79
2.3.2.1	Füllung der gesamten Lunge.....	79
2.3.2.2	Lokale in situ-Applikation	79
2.3.3	Fixierung, Probenentnahme und Einbettung.....	79
2.3.3.1	Nach Füllen der gesamten Lunge	80
2.3.3.2	Nach lokaler in situ-Applikation.....	80
2.3.3.3	Nach lokaler Applikation am eröffneten Primärbronchus	80
2.3.4	Schnittanfertigung.....	80
2.3.5	Färbung	80
2.4	Fluoresceinisothiocyanat.....	81
2.4.1	Material	82
2.4.2	Applikation	82
2.4.3	Einbettung	82
2.4.4	Schnittanfertigung.....	82
2.5	Immunhistochemische Einfachfärbung	83
2.5.1	Material	83
2.5.1.1	Durchführung an Gefrierschnitten	85
2.5.1.2	Durchführung an GMA-Schnitten	86
2.5.2	Aufreinigung des Endothelzellantikörpers	88
2.5.2.1	Material	88
2.5.2.2	Gewinnung des 1A3a-Zellkulturüberstandes.....	89
2.5.2.3	Aufreinigung des gewonnenen Zellkulturüberstandes.....	89
2.5.2.4	Immunhistochemische Färbung am Lymphherz.....	89
2.6	Immunfluoreszenz.....	90
2.6.1	Material	90
2.6.2	Durchführung.....	90
2.7	Transmissionselektronenmikroskopie.....	91
2.7.1	Material	91

2.7.2	Fixierung, Organentnahme und Einbettung	92
2.7.3	Trimmen und Schneiden	93
3.	Dreidimensionale Rekonstruktion eines Keimzentrums	93
3.1	Material	93
3.2	Durchführung	93
4.	Tracheale Infektion mit aviären pathogenen E. coli.....	94
5.	Vakzinierung gegen Newcastle Disease Virus	94
5.1	Versuchsaufbau	94
5.2	Probennahme.....	95
5.2.1	Material	95
5.2.2	Probennahme für die Genexpressionsanalyse.....	95
5.2.3	Probennahme für die Histologie	96
5.3	Probenverarbeitung für die Genexpressionsanalyse	97
5.3.1	Material	97
5.3.2	RNA-Isolation.....	98
5.3.3	Reinheitsbestimmung der RNA	99
5.3.4	cDNA-Synthese	99
5.4	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion.....	100
5.5	Statistische Auswertung der Proben	102
5.6	Immunhistochemische Färbung der Proben.....	103
5.6.1	Material	103
5.6.2	Durchführung	103
V.	ERGEBNISSE	103
1.	Vitalitätskontrolle	105
2.	Tuscheversuche	106
2.1	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe	106
2.2	Extrabronchiales Gewebe	111
2.2.1	Atrien	111
2.2.2	Interparabronchiale Septen und Zwickel	115
2.2.3	Blutgefäße	116
2.2.4	Germinale Zentren der Parabronchien	118
2.3	Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbungen	119
2.4	Transmissionselektronenmikroskopie.....	121

3.	Beads-Versuche	123
3.1	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe	124
3.2	Extrabronchiales Gewebe	124
3.2.1	Atrien	124
3.2.2	Interparabronchiale Septen	124
3.2.3	Blutgefäße	125
4.	FITC-Versuche.....	128
4.1	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe	128
4.2	Extrabronchiales Gewebe	129
4.2.1	Atrien	129
4.2.2	Interparabronchiale Septen	131
4.2.3	Geminale Zentren	131
5.	Zusammenfassung der Versuche zur Partikelaufnahme	132
6.	Keimzentren des extrabronchialen Lungengewebes	134
6.1	Phänotyp und Lokalisation	134
6.2	Dreidimensionale Rekonstruktion	134
6.3	Bromdesoxyuridin-Färbung.....	136
6.4	Partikelablagerung im Bereich der Keimzentren und Atrien.....	137
7.	Immunhistochemische Endothelzellfärbung	141
8.	Tracheale Infektion mit aviären pathogenen E. coli.....	142
9.	Expression der Gene Bu1 und AID nach NDV-Impfung	144
9.1	Expression von Bu1	144
9.2	Expression von AID.....	144
9.3	Immunhistochemische Untersuchung.....	146
VI.	DISKUSSION	151
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	173
VIII.	SUMMARY	175
IX.	LITERATURVERZEICHNIS.....	177
X.	ANHANG	195

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AID	<i>activation induced cytidine deaminase</i>
AM	Alveolarmakrophage
APC	Antigenpräsentierende Zelle, <i>antigen presenting cell</i>
APEC	aviäre pathogene <i>E. coli</i>
BALT	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe, <i>bronchus-associated lymphoid tissue</i>
BC	B-Zelle, <i>B-cell</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
BSDC	<i>bursal secretory dendritic cells</i>
CALT	Konjunktiva-assoziiertes lymphatisches Gewebe, <i>conjuncta-associated lymphoid tissue</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
ch	Hühner, <i>chicken</i>
chB6	<i>chicken B6 antigen</i>
ChS	<i>chicken serum</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
CT	Zäkaltonsille, <i>cecal tonsil</i>
d	Tag, <i>day</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle, <i>dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
et al.	und andere, <i>et alii</i>
FAE	Folikellosoziiertes Epithel
Fb	<i>fragment antigen binding</i>
FBS	Fetales bovines Serum
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FDC	Folikuläre dendritische Zelle, <i>follicular dendritic cells</i>
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe, <i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GC	Germinales Zentrum, <i>germinal center</i>
GMA	Glycolmethacrylat
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunden, <i>hours</i>

HE	Hämatoxylin-Eosin
HEMA	2-Hydroxymethylacrylat
HEV	Hochendotheliale Venole
HG	Harder'sche Drüse, <i>Harderian gland</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
IAV	<i>Influenza A Virus</i>
IBV	<i>Infektiöses Bronchitis Virus</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPBS	Interparabronchiale Septen
LALT	Larynx-assoziiertes lymphatisches Gewebe, <i>larynx-associated lymphoid tissue</i>
LE	Lymphoepithel
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe, <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MARCO	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
MD	Meckel'sches Divertikel
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
Mo	Monate
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
MSR	<i>macrophage scavenger receptor</i>
M-Zellen	Mikrofalten-Zellen
MΦ	Makrophage
NALT	Nasales assoziiertes lymphatisches Gewebe, <i>nasal-associated lymphoid tissue</i>
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
p. a.	nach Applikation
p. m.	post mortem
PALS	periarterielle Lymphscheide
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
Pb	Primärbronchus
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pIgR	poly-Ig-Rezeptor
PP	Peyer Plaques
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qPCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>

REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunden
Sb	Sekundärbronchus
SDS	Natriumlaurylsulfat, <i>sodium lauryl sulfate</i>
SED	<i>subepithelial dome region</i>
SPF	<i>specific pathogen-free</i>
TC	T-Zelle, <i>T-cell</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor, <i>T-cell receptor</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
T _H	T-Helferzelle
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Lunge des Haushuhns	21
Abbildung 2: Bronchialsystem der Hühnerlunge.....	23
Abbildung 3: Bronchialnetzwerk und Einteilung der Sekundärbronchien.....	24
Abbildung 4: Ausgusspräparat des Lungen-Luftsack-Systems des Haushuhns....	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Lungen-Luftsack-Systems.	25
Abbildung 6: Parabronchuswand.....	27
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Luftströmungsverhältnisse des Vogels.....	29
Abbildung 8: Lymphknoten und Antigenpräsentation.	36
Abbildung 9: Aufbau des Antikörpers und des TCR.....	41
Abbildung 10: Immunantwort am Beispiel einer viralen Infektion.....	42
Abbildung 11: Germinale Zentren des Säugers und Vogels.....	45
Abbildung 12: Aufbau des MALT.....	46
Abbildung 13: Hühner-BALT	50
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Probennahme	65
Abbildung 15: Schematische Darstellung der <i>in situ</i> -Applikation über den Primärbronchus.....	70
Abbildung 16: Schema des Aufblockens mithilfe von Technovit® 3040.....	73
Abbildung 17: Neutralrot-Färbung.....	105
Abbildung 18: BALT-Serienschnitt aus T3/3.....	107
Abbildung 19: Primärbronchus mit BALT im Querschnitt.....	108
Abbildung 20: Primärbronchus mit BALT.....	109
Abbildung 21: BALT-Querschnitt, KUL01-Färbung.....	110
Abbildung 22: Atrienbereich aus drei verschiedenen Tuscheversuchen	112
Abbildung 23: Parabronchien, Übersicht und Vergrößerung	113
Abbildung 24: Immunhistochemische KUL01-Färbung	114
Abbildung 25: Interparabronchiale Septen und Zwickel.....	115
Abbildung 26: Zwickelbereich	116
Abbildung 27: Extrabronchiale Blutgefäße, Zwickel und IPBS.....	117
Abbildung 28: Zwickel und IPBS.....	118
Abbildung 29: Extrabronchiale lymphoide Follikel	119
Abbildung 30: Immunhistochemische anti-Pan-Zytokeratin-Färbung der Atrien	120

Abbildung 31: Atrien und IPBS.....	121
Abbildung 32: Apikaler Bereich des Atrienseptums	122
Abbildung 33: Lungen-Makrophagen	122
Abbildung 34: Luftkapillaren und Atrienseptum.....	123
Abbildung 35: BALT, KUL01-Färbung.....	125
Abbildung 36: Querschnitt eines Atriums	126
Abbildung 37: Blutgefäß und Atrium.....	126
Abbildung 38: Atrien und BALT.....	127
Abbildung 39: Interparabronchiale Septen, KUL01-Färbung	127
Abbildung 40: Primärbronchus mit BALT im Längsschnitt	128
Abbildung 41: Primärbronchus am Übergang zum Sekundärbronchus mit BALT im Querschnitt.....	129
Abbildung 42: Parabronchus im Längsschnitt.....	130
Abbildung 43: Fluoreszenzhistologische KUL01-Färbung.....	130
Abbildung 44: Atrienbereich	131
Abbildung 45: Parabronchien im Quer- und Längsschnitt	132
Abbildung 46: Extrabronchiales GC.....	132
Abbildung 47: Partikelvergleichende Aufnahme	133
Abbildung 48: 3D-Rekonstruktion eines parabronchialen Keimzentrums.....	135
Abbildung 49: Schnittebenen durch ein dreidimensional rekonstruiertes Keimzentrum	135
Abbildung 50: Immunhistochemische BrdU und Bu1-Färbung von BALT	136
Abbildung 51: BrdU-Färbung des extrabronchialen Lungengewebes.	137
Abbildung 52: Immunhistochemischer Nachweis CVI-ChNL-68.1 ⁺ Zellen.....	138
Abbildung 53: Immunhistochemische anti-Pan-Zytokeratin-Färbung der Partikelablagerungen.	138
Abbildung 54: Immunhistochemische Färbungen von extrabronchialen GCs und von BALT	139
Abbildung 55: Partikelablagerungen im Bereich des Primärbronchus und der Milz.....	139
Abbildung 56: Partikelablagerungen im Bereich des BALT und der extrabronchialen GCs	140
Abbildung 57: Fluoreszenzhistologische KUL01-Färbung von BALT	141
Abbildung 58: Immunhistochemische Färbung mit dem gewonnenen Endothelzellantikörper 1A3a	141

Abbildung 59: Lymphherz eines eine Woche alten Huhns	142
Abbildung 60: Atrienbereich nach APEC-Infektion	143
Abbildung 61: Punktdiagramm der Bu1- und AID-dCt-Werte	145
Abbildung 62: Immunhistochemische Färbungen von BALT, CALT und Trachea	147
Abbildung 63: Immunhistochemische anti-NDV-Färbung an BALT und Atrien	148
Abbildung 64: Immunhistochemische anti-NDV-Färbung von CALT	149

PROTOKOLLVERZEICHNIS

Protokoll 1: Fixier-, Entwässerungs- und Einbettprotokoll zur Herstellung von Paraffinschnitten	72
Protokoll 2: Entwässerungs- und Einbettprotokoll für GMA-Proben	72
Protokoll 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung	75
Protokoll 4: Kernechtrot-Färbung.....	75
Protokoll 5: Lichtgrün-Färbung.....	76
Protokoll 6: Immunhistochemisches Färbeprotokoll.....	85
Protokoll 7: Probenverarbeitung für die Transmissionselektronenmikroskopie ...	92

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über die Einzelversuche der Tuscheversuchsreihe.....	77
Tabelle 2: Übersicht der Einzelversuche der Beads-Applikation.....	81
Tabelle 3: Übersicht der Einzelversuche der FITC-Applikation	83
Tabelle 4: Liste der verwendeten primären Antikörper	84
Tabelle 5: Für die Immunfluoreszenz verwendete Sekundär-Antikörper	90
Tabelle 6: Gruppeneinteilung der Tiere.....	95
Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer	97
Tabelle 8: Master Mix für je einen Ansatz zur cDNA-Synthese	100
Tabelle 9: Master Mix für qRT-PCR für eine Probe	101
Tabelle 10: Temperaturprotokoll für qRT-PCR	102
Tabelle 11: Partikelvorkommen in Abhängigkeit der Lokalisation.....	133

I. EINLEITUNG

In modernen industriellen Haltungssystemen von Wirtschaftsgeflügel wird eine hohe Tierzahl auf verhältnismäßig engem Raum untergebracht. Dabei kommt es regelmäßig zu Verlusten im Bestand durch diverse Infektionskrankheiten. Erkrankungen des Atmungsapparates sind hierbei ein wirtschaftlich bedeutender Faktor. Um Verluste zu minimieren bzw. zu verhindern, kommen routinemäßig Vakzinen zum Einsatz. Eine erste wichtige Eintrittspforte für Erreger, darunter auch für das epidemiologisch bedeutsame *Influenzavirus*, sind die Atemwege des Wirts [1]. Daher finden Aerosol- oder Spray-Vakzinierungen häufig Verwendung im Geflügelbereich, da sie es ermöglichen, alle Tiere eines Bestandes gleichzeitig zu impfen [2, 3]. Trotz des routinemäßigen Einsatzes dieser Impftechnik sind die lokalen Abwehrmechanismen des aviären Atmungstraktes, die zur Ausbildung einer Immunität führen, noch wenig verstanden [4]. Grund dafür sind zum einen die im Gegensatz zum Säuger komplexere Anatomie und Physiologie des aviären Atmungstraktes [5, 6]. Zum anderen sind die beim Säuger bekannten und bereits etablierten Immunzellmarker nur bedingt auf die Immunzellen des Vogels übertragbar [7].

Als Ergebnis intensiver Forschung der letzten Jahre am Modell Huhn wurden verschiedene Antikörper für die Charakterisierung aviärer Immunzellen entwickelt [8]. Jedoch stellt die im Vergleich zum Säuger noch immer geringere Verfügbarkeit an spezifischen Markern für die Unterscheidung der einzelnen Immunzellpopulationen und Subtypen – insbesondere der antigenpräsentierenden Zellen – sowie deren eingeschränkte Anwendbarkeit auf fixiertem Lungengewebe eine Herausforderung für die histologische Darstellung der pulmonalen Abwehrzellen dar [7, 9]. Obwohl einzelne Strukturen des Lungenimmunsystems wie das Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe beim Huhn bereits Gegenstand zahlreicher Studien waren [10-12], ist noch immer unklar, welche Rolle es bei der lokalen Immunantwort spielt. Ebenfalls unbekannt ist, wo in der aviären Lunge die Partikelaufnahme und der -abtransport sowie die Antigenpräsentation und Induktion der Immunantwort auf inhalierte Antigene bzw. Partikel stattfinden und welche Immunzellsubtypen der Lunge daran beteiligt sind [7, 13].

Ein besseres Verständnis der immunologischen Vorgänge in der Hühnerlunge ist im Hinblick auf die Krankheitsprophylaxe von großer Bedeutung, insbesondere in der intensiven Geflügelhaltung.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Anatomie und Physiologie des aviären Atmungstraktes

1.1 Lunge

Der Atmungstrakt des Vogels unterscheidet sich sowohl strukturell als auch funktionell von dem des Säugers. Unter den Wirbeltieren ist der Atmungsapparat der Klasse Aves an Komplexität und Effizienz unübertroffen [14]. Er lässt sich in die Lunge als Ort des Gasaustausches und in das Luftsacksystem unterteilen, welches der Ventilation der Lunge dient. Die Vogellunge liegt hochdorsal in der Pleurahöhle, mit der sie fest verwachsen ist und wird dorsomedial durch die Wirbel, dorsolateral durch die Rippen und ventral durch das Septum horizontale begrenzt, welches sich zwischen dem ventralen Rand der Wirbelkörper und der lateralen Thoraxwand bzw. den Rippen aufspannt. Der enge Kontakt zu den bogenförmig auf die Wirbel zulaufenden Rippen lässt tiefe Furchen, sogenannte Sulci costales auf der dorsalen und medialen Seite des Lungengewebes entstehen (Abbildung 1). Durch die allseitige Verwachsung mit der Thoraxwand und der engen Nachbarschaft zu den Rippen ist die Lunge sowohl in der Inspirations- als auch Expirationsphase nahezu völlig volumenkonstant [5].

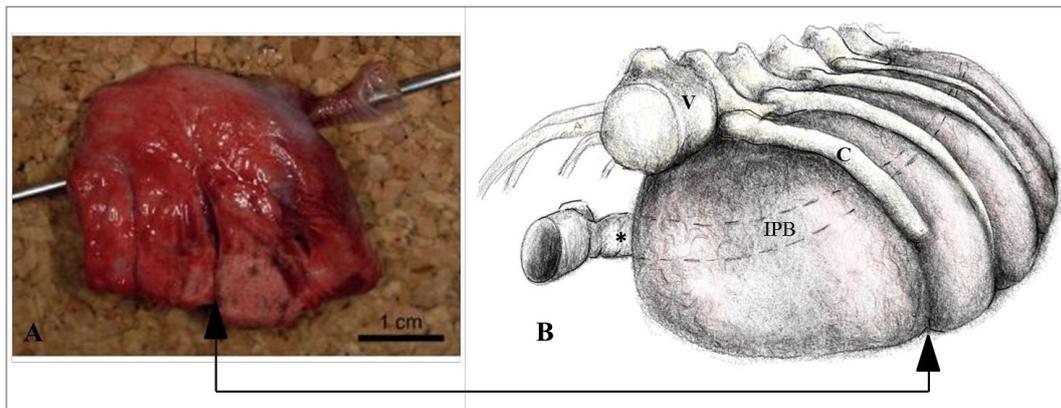


Abbildung 1: Lunge des Haushuhns. **A:** Blick auf die Dorsalseite mit Sondierung des Primärbronchus. links: kaudal, rechts: kranial, *Härtle et al.* [15]. **B:** Veranschaulichung der Lage der linken Lunge in situ (Abb. A. Wilhelm). V: Thorakalwirbel, C: Rippen, extrapulmonaler Primärbronchus (*), IPB: intrapulmonaler Primärbronchus; Pfeile: Sulci costales durch engen Rippenkontakt.

1.2 Bronchialsystem

Die Trachea teilt sich nach der Bifurkation bzw. der Syrinx zunächst in die beiden extrapulmonalen Anteile der Primärbronchien, die das Septum horizontale schräg durchwandern und die Lunge in Begleitung der pulmonalen Arterie und Vene medial im Bereich des kranialen Drittels erreichen. In einem bogenförmigen Verlauf durchzieht der intrapulmonale Primärbronchus, auch Mesobronchus genannt [16], die gesamte Lunge in ihrer Länge und passiert das kaudal der Lunge gelegene Septum obliquum, um sich über das Ostium abdominale in den Abdominalluft sack zu öffnen. Nach seinem Eintritt in die Lunge entlässt der Primärbronchus Sekundärbronchien in verschiedene Richtungen, die über rigide Parabronchien miteinander in Verbindung stehen und ein komplexes Netzwerk bilden. Dieses lässt sich in den phylogenetisch älteren Paleopulmo und den Neopulmo unterteilen, der aus einem Netzwerk aus Parabronchien besteht (s. Abbildung 3). Letzterer ist vor allem in der höher entwickelten Vogellunge zu finden bzw. ist am besten bei den Singvögeln und Galliformes ausgebildet [6]. Aus den Parabronchien wiederum gehen Atrien hervor, die trichterförmig in die Luftkapillaren als Ort des Gasaustausches münden und funktionell den Säuger alveolen entsprechen [17].

Zu Beginn entlässt die Dorsomedialwand des Mesobronchus vier Sekundärbronchien, Bronchi medioventrales, die die kraniale Ventralseite der Lunge einnehmen und sowohl lateral als auch medial bis an die Dorsalseite reichen. Anschließend zweigen sieben bis zehn Mediodorsobronchien, Bronchi mediodorsales vom Primärbronchus ab und erstrecken sich übereinander geordnet in kaudale Richtung. Kaudal nehmen Länge, Durchmesser und Verzweigung der Mediodorsobronchien ab, sodass der letzte keine Verzweigung mehr aufweist. Aus seiner ventralen Wand entlässt der Primärbronchus schließlich Lateroventrobronchien, Bronchi lateroventrales, die den Mediodorsobronchien gegenüber liegen. Sie ziehen ebenfalls in kaudale Richtung und füllen den lateralen Teil der Lunge aus. Der erste dieser Bronchien ist bei den meisten Vögeln stark ausgeprägt und übertrifft die anderen an Größe und Durchmesser. Er wendet sich in ventrale Richtung, passiert das Septum horizontale und mündet in den kaudalen Thorakalluft sack. Diese drei Bronchiengruppen werden dem Paleopulmo zugerechnet, der bei allen Vogelspezies zu finden ist. Das Bronchialnetzwerk des Neopulmo höher entwickelter Vogelarten besteht aus Parabronchien [6] bzw. parabronchienähnlichen Sekundärbronchien, den Bronchi laterodorsales [18, 19],

die ihren Ursprung aus der lateralen Seite des Primärbronchus bzw. den Bronchi lateroventrales nehmen. Sie finden über die laterale Seite wieder Anschluss an die Sekundärbronchien und damit auch an die kaudalen Luftsäcke. Oder sie vereinigen sich zu sogenannten Saccobronchien und münden direkt in die kaudalen Luftsäcke [6]. Diese Nomenklatur bzw. Gruppierung der Sekundärbronchien wurde im Zuge neuerer Untersuchungen häufiger diskutiert [14, 16, 20, 21], was den komplexen Aufbau der Vogellunge unterstreicht.

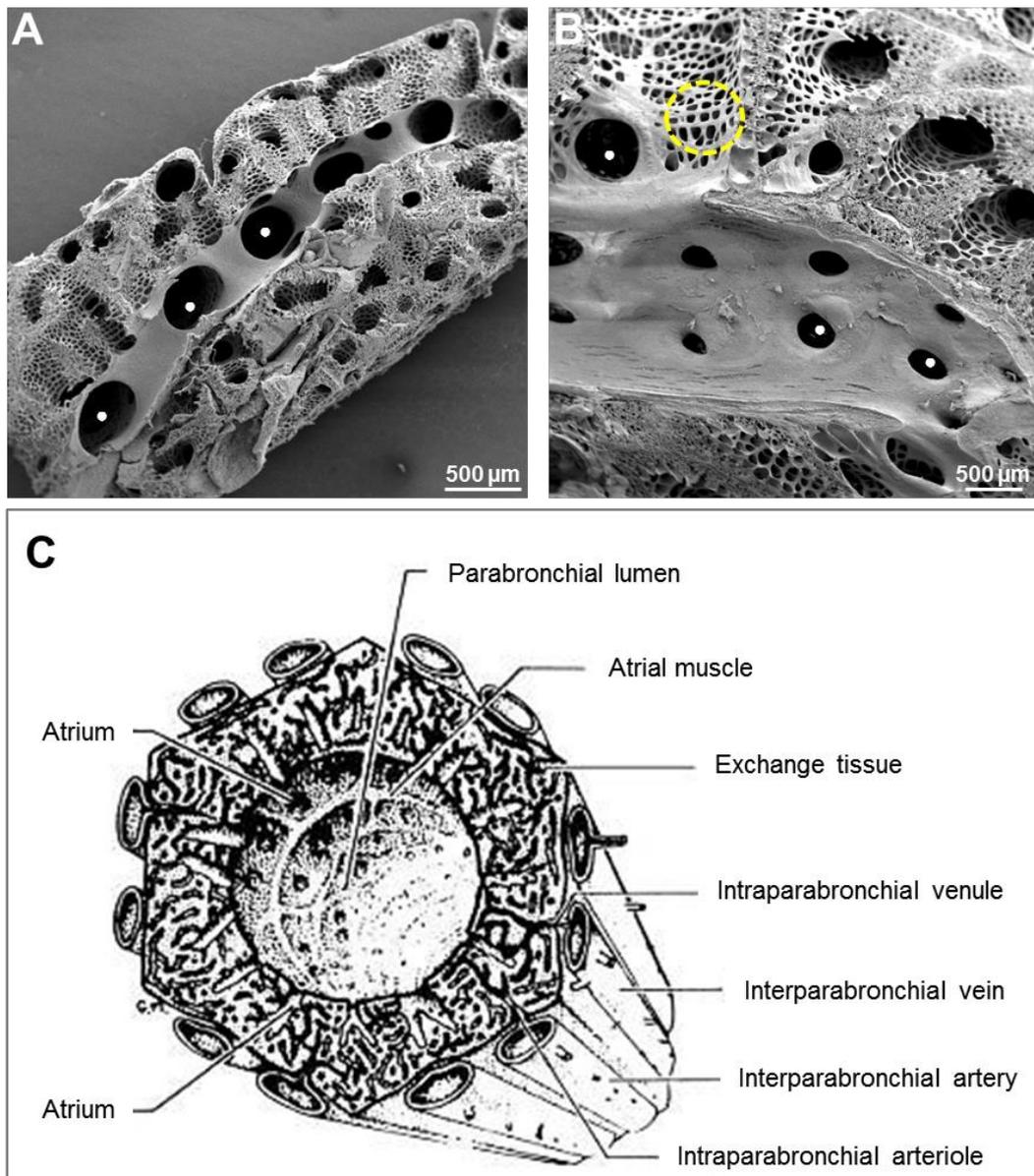


Abbildung 2: Bronchialsystem der Hühnerlunge. **A:** Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme der Lunge eines drei Tage alten Huhns mit eröffnetem Primärbronchus (Pb). ● Abgänge der Sekundärbronchien (Sb). **B:** REM-Aufnahme des Pb mit abzweigenden Sb, unveröffentlichte Institutsarbeit (A, B mit Genehmigung von S. Reese) **C:** Bereich gelber Kreis aus B, schematischer Aufbau eines Parabronchus, *Maina, J. N.* [22].

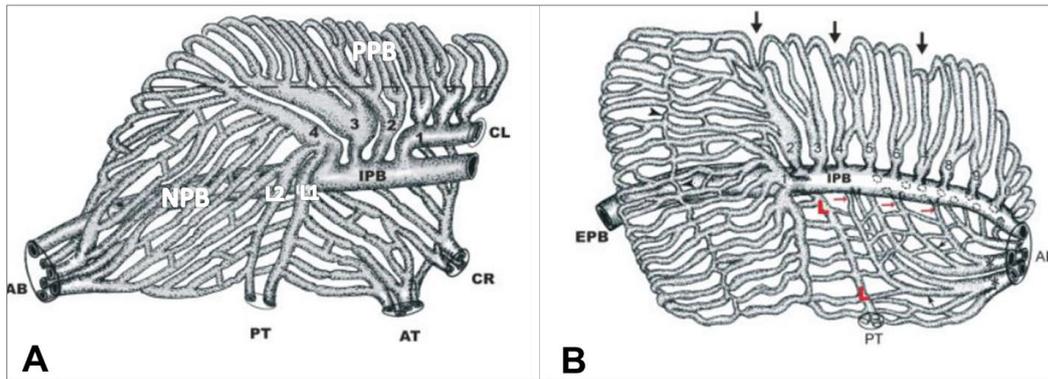


Abbildung 3: Bronchialnetzwerk und Einteilung der Sekundärbronchien. **A:** medioventrale Ansicht. **B:** laterale Ansicht. Gestrichelte Linie: medialer Rand, IPB: Intrapulmonaler Primärbronchus, CL: Cervicalluftsack, CR: Clavicularluftsack, AT: kranialer Thorakalluftsack, PT: kaudaler Thorakalluftsack, AB: Abdominalluftsack, rote L, L1/L2: Lateroventrobronchien, rote horizontale Pfeile: Parabronchien des Neopulmo mit Übergang in Saccobronchien (kleine Pfeile), dicke Pfeile: Furchenbildung durch Rippenkontakt, Pfeilspitzen: Anastomosen zwischen den Sekundärbronchien, Zahlen: Nummerierung der Medioventro- (1–4) bzw. Laterodorso- (1–10), Makanya et al. [16].

1.3 Luftsäcke

Eine weitere Besonderheit des aviären Atmungsapparates stellt das an die Lunge angeschlossene Luftsacksystem dar. Es besteht aus äußerst dünnwandigen, dehnbaren und sackförmigen Hohlräumen, die zum Teil mit Serosa überzogen sind oder sich in das Knochengewebe, insbesondere der Schultergürtelpartie fortsetzen und dieses pneumatisieren [19]. Ihre Wand ist reich an teilweise elastischen Kollagenfasern, enthält nur wenige Blutgefäße und Nervenfasern und wird ausgekleidet durch nicht-gasaustauschendes, squamöses Epithel, das stellenweise auch durch ziliotragendes, kubisches Epithel ersetzt wird [23, 24].

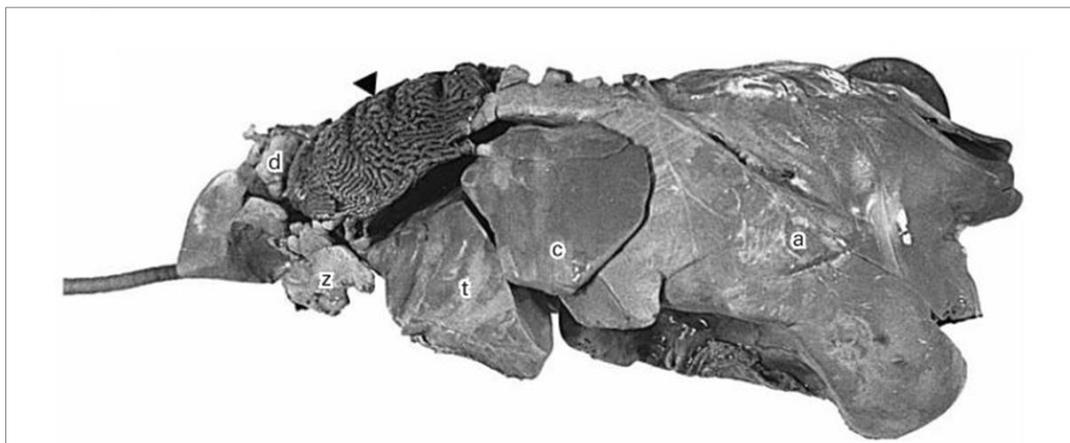


Abbildung 4: Ausgusspräparat des Lungen-Luftsack-Systems des Haushuhns, *Gallus gallus domesticus*, Maina, J. N. [22], seitliche Ansicht. d: Cervicalluftsack, z: Klavikularluftsack, t: kranialer Thorakal-luftsack, c: kaudaler Thorakalluftsack, a Abdominalluftsack, Lunge (Pfeil).

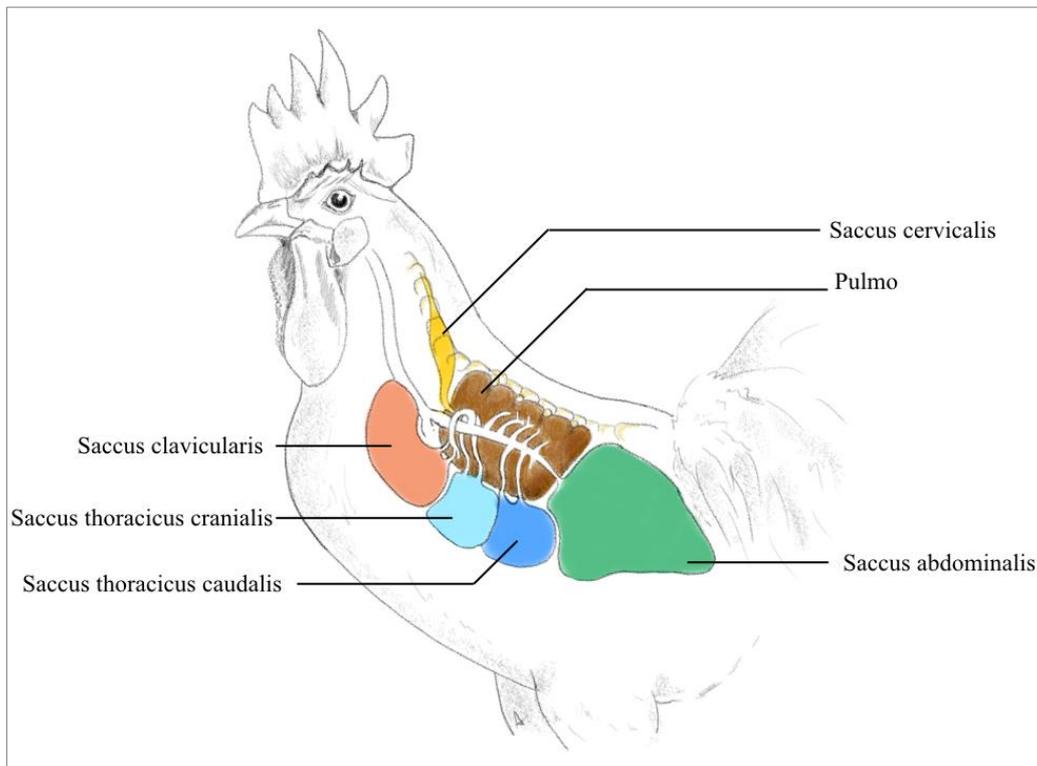


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Lungen-Luftsack-Systems (Abb. A. Wilhelm).

Die Luftsäcke befinden sich ventral der Lunge im Cavum subpulmonale, welches einerseits durch das Septum horizontale und obliquum und andererseits durch die ventrale Brustwand begrenzt wird. Das Septum obliquum entspringt dem ventralen Rand der thorakalen Wirbelsäule und nimmt einen schrägen Verlauf in Richtung des lateralen Randes des Sternums und trennt die Luftsäcke von den Viszeralorganen. Lediglich der paarige Abdominalluftsack erstreckt sich bis in die Abdominalhöhle, liegt dorsal den Viszeralorganen auf und ist – im Gegensatz zu den anderen Luftsäcken – bis auf die dorsale Fixierung im Bereich der Nieren frei beweglich. Die meisten Vogelarten, unter anderem auch das Huhn, besitzen neun Luftsäcke [25]. Sie lassen sich funktionell in eine vordere und eine hintere Luftsackgruppe einteilen: die vordere Luftsackgruppe besteht aus dem jeweils paarig ausgebildeten Zervikal- und kranialen Thorakalluftsack sowie dem meist unpaaren Klavikularluftsack. Die jeweils paarigen kaudalen Thorakal- und Abdominalluftsäcke hingegen gehören der hinteren Luftsackgruppe an (s. Abbildung 4 und Abbildung 5). Die Luftsäcke besitzen Anschluss an das Bronchialsystem der Lunge, wodurch sie sich während der Atemphasen mit Luft füllen und im Gegensatz zur Lunge ihr Volumen verändern. Während die Abdominalluftsäcke über das Ostium abdominale Atemluft aus dem Primärbronchus erhalten und die kraniale Luftsackgruppe über den ersten bzw. dritten

Ventrobronchus in Verbindung mit der Lunge steht, werden die kaudalen Thorakalluftsäcke über den größten ipsilateralen Bronchus lateroventralis belüftet und besitzen eine prominente Rolle bei der blasebalgartigen Ventilation der Lunge durch die Luftsäcke [6, 17].

1.4 Gasaustausch

Die aus den Sekundärbronchien hervorgehenden Parabronchien stellen die funktionelle Einheit der Vogellunge dar. Sie sind parallel angeordnet, kommunizieren mit den Sekundärbronchien bzw. anderen Parabronchien und sind voneinander jeweils durch interparabronchiale Septen getrennt. Ihre Wand buchtet sich in die taschenförmigen Atrien aus, die einen hexagonalen Aufbau besitzen und sich jeweils weiter in ein Infundibulum verjüngen, um schließlich in die Luftkapillaren zu münden. Als Ort des Gasaustausches entsprechen diese funktionell den Alveolen der Säugerlunge, wo sie engen Kontakt zu Blutkapillaren besitzen [26]. In ihrer Komplexität und gleichzeitig auch Effizienz im Hinblick auf den Gasaustausch ist die Vogellunge unübertroffen [22]. Dies liegt zum einen an der im Vergleich zum Säuger 15 % größeren Gasaustausch-oberfläche [27] und zum anderen an der ca. 2,5 mal dünneren Blut-Gas-Barriere aus Gefäßendothel, Basallamina bzw. extrazellulärer Matrix und äußerst dünnem, squamösem Epithel der Luftkapillaren. Die einheitliche Dicke der Blut-Gas-Schranke in Kombination mit der Stabilität der Luftkapillaren durch die extrazelluläre Matrix tragen zu der hohen Effizienz im Gasaustausch bei [28, 29]. Je nach Vogelart bestehen ca. 40–50 % der Vogellunge aus gasaustauschendem Gewebe der Parabronchien, etwa 90 % davon sind Luft- und Blutkapillaren [22]. Die Volumenkonstanz der rigiden Vogellunge erlaubt eine Erhöhung der Oberfläche der Blut-Gas-Schranke, da ein Kollabieren von Luftkapillaren und Blutgefäßen während der Expiration verhindert wird [6]. Somit ist die Gesamtoberfläche des gasaustauschenden Gewebes im Verhältnis zu dessen Volumen bis zu dreimal größer als beim Säuger, sodass bei verhältnismäßig gleichem Gewicht und gleicher Größe eine weitaus höhere Sauerstoffdiffusion von bis zu 82 % gegeben ist [27]. Die Blutströmung in den Lungenkapillaren und die Luftströmung in den luftleitenden Wegen stellen ein gegenläufiges System dar und tragen durch die effektive Sauerstoffbeladung des Blutes zum effizienten Gasaustausch der Vogellunge bei [21, 25]. Die Maximierung der Kapazität für die Sauerstoffdiffusion bei gleichzeitiger Minimierung des metabolischen Energie-

verlustes ist eine evolutionäre Anpassung der Vögel an die Anforderungen des Fliegens [30].

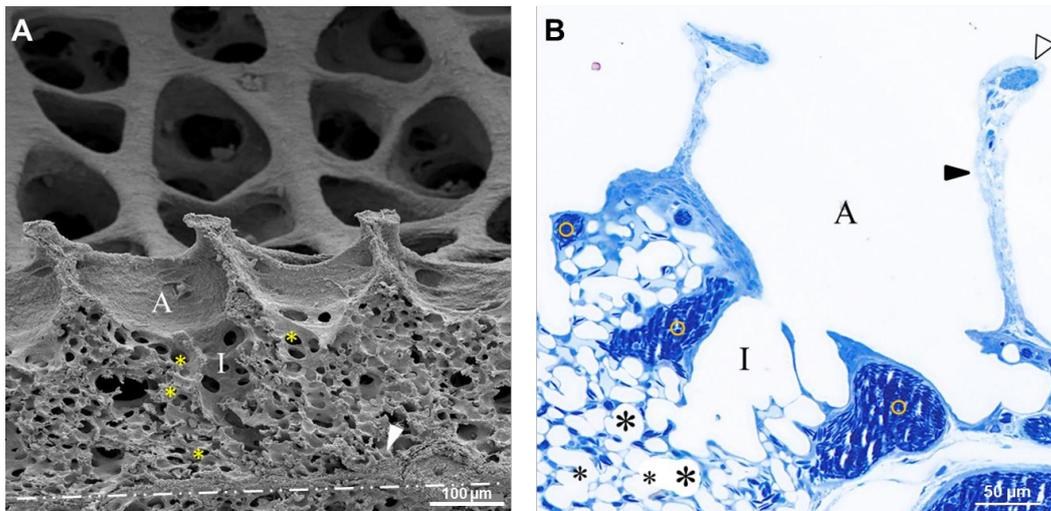


Abbildung 6: Parabronchuswand. **A:** REM-Aufnahme eines Parabronchus mit Atrien (A) und Infundibulum (I) sowie Luftkapillaren (*). Pfeil: interparabronchiales Septum, gestrichelte Linie: Verlauf des Septums, Zengerling, G. [9]. **B:** Atrien (A) und Infundibulum (I) mit Luftkapillaren (*), Richardson-Färbung. Schwarzer Pfeil: Atrienseptum, weißer Pfeil: glatte Muskulatur, o: Blutgefäße, (Abb. A. Wilhelm).

1.5 Atemphysiologie

Die aviäre Lunge besitzt im Vergleich zur Säugerylunge nicht nur anatomische, sondern auch funktionelle Besonderheiten. Aufgrund der anatomischen Situation bzw. des Fehlens eines Zwerchfells unterscheidet sich nicht nur die Atemmechanik, sondern auch die Luftströmungsverhältnisse folgen komplexen funktionellen und anatomischen Gegebenheiten [17, 31].

1.5.1 Atembewegung

Aufgrund der starren Verbindungen der Rippen mit dem Sternum ist die laterale Thoraxwand des Vogels annähernd unbeweglich und das Cavum pulmonale mit der darin verwachsenen Lunge nahezu volumenkonstant. Nur die vordere Rumpfwand hat einen gewissen Bewegungsspielraum, sodass es durch die scharnierartige Bewegung zwischen Wirbelsäule und Sternum zu einer Weitung der Körperhöhle und damit zu einer passiven Dehnung der mit der Rumpfwand verwachsenen Luftsäcke und zum Lufteinstrom kommt [5]. Diese Dehnung wird unterstützt durch das muskuläre Zusammenspiel der Inspirationsmuskeln Mm. levatores costarum, Mm. costosternales und Mm. intercostales externi. Die aktive Anspannung der inneren Interkostalmuskulatur sowie der Bauchmuskeln führt zur Kompression der Luftsäcke und zur blasebalgähnlichen Belüftung der Lunge durch die Luftsäcke [19].

1.5.2 Luftströmung im Bronchialnetzwerk

Das Gesamtvolumen des Atmungsapparates des Vogels ist je nach Vogelart bei vergleichbarem Gewicht drei bis fünfmal so groß wie das des Säugers [22]. Beim Einatmen weitet sich die Körperhöhle, sodass der Druck in den Luftsäcken sinkt und frische Luft über den Primärbronchus in den Abdominalluftsack bzw. über die Bronchi lateroventrales in die kaudalen Thorakalluftsäcke gelangt. Zeitgleich strömt Luft über die Bronchi medioventrales in die kraniale Luftsackgruppe (s. Kap. 1.3). Diese Luft hat bereits über den Primärbronchus und die Bronchi mediodorsales die Parabronchien des Lungengewebes passiert, bevor sie über die Medioventrobronchien die kranialen Luftsäcke erreicht. Somit erhalten die Abdominal- und kaudalen Thorakalluftsäcke während der Inspirationsphase frische Atemluft, während den kranialen Luftsäcken verbrauchte Luft zugeführt wird, die die Lunge bereits passiert hat. Während der Exspirationsphase werden die Luftsäcke komprimiert, sodass die frische Luft aus der kaudalen Luftsackgruppe retrograd über den Primärbronchus in die Mediodorsobronchien geleitet wird, wo sie zum Gasaustausch in die Parabronchien der Lunge gelangt. Die nun sauerstoffarme Luft wird zusammen mit der verbrauchten Luft aus den kranialen Luftsäcken über die Bronchi medioventrales in den kranialen Teil des Primärbronchus geleitet und über die Trachea wieder abgeatmet (s. Abbildung 7). Der Luftstrom innerhalb des Paleopulmo ist somit sowohl in der Inspirations- als auch Exspirationsphase stets unidirektional. Dagegen ändert sich der Luftstrom in den Luftsäcken, die sich während der Atemphasen aufblähen und komprimieren und die Lunge wie Blasebälge ventilieren [5, 6]. Der Gasaustausch findet in der Lunge in beiden Atemphasen statt, da jeder Luftbolus während dieser beiden Phasen in der Lunge verbleibt, bevor er abgeatmet wird [32].

Die einzigartigen Luftströmungsverhältnisse in der Vogellunge, auch als *aerodynamic valving* bezeichnet [33, 34], regten zu intensiver Forschung an [5, 17, 35-38]. Die Entdeckung eines Beschleunigungssegments (*segmentum accelerans*) in Form einer Schleimhautwölbung im Bereich des Primärbronchus vor den Abgängen der Medioventrobronchien bei der Gans (*aster aster*), dem Huhn (*Gallus gallus var. domesticus*) und auch bei der Taube (*Columbia livia*) lieferte eine Erklärung für die Strömungsverhältnisse in der Lunge während der Inspiration (*inspiratory aerodynamic valving*) [39-42]. Neure Untersuchungen zeigten, dass für einen effizienten Luftstrom zwei Ventilmechanismen vorhanden sein müssen und dass der Luftstrom unabhängig von der Atemfrequenz oder

Amplitude, jedoch abhängig von Asymmetrien des Strömungswiderstandes und der Zusammenarbeit mit den Luftsäcken ist [43].

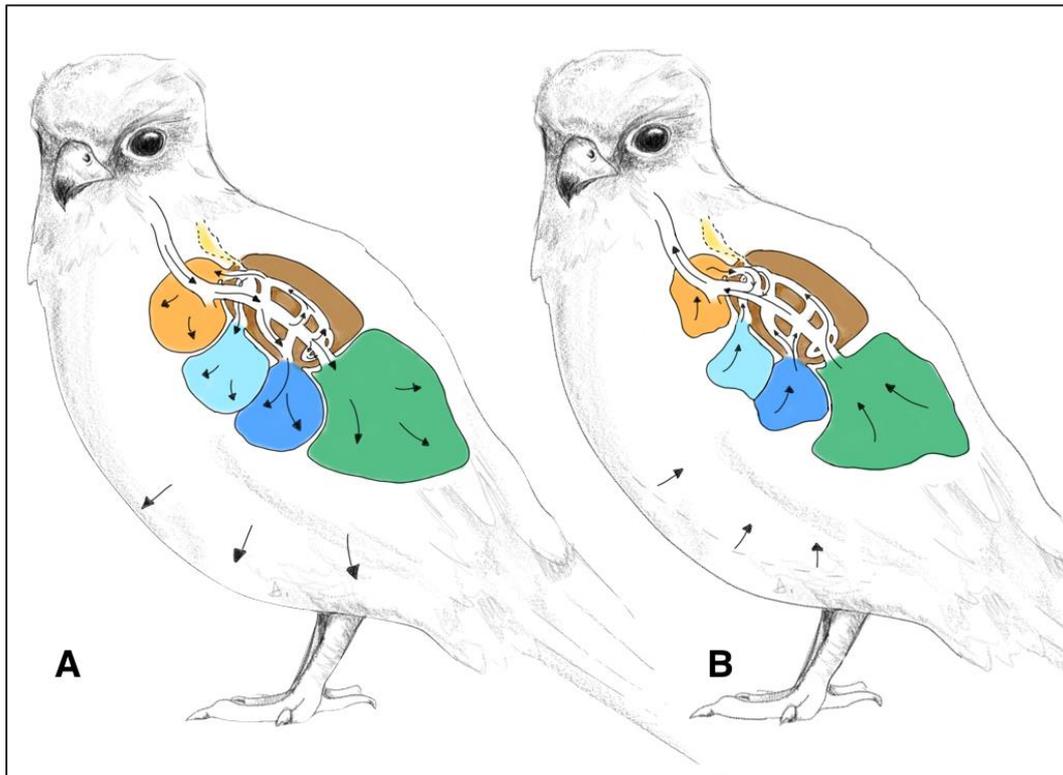


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Luftströmungsverhältnisse des Vogels. **A:** Inspiration, **B:** Expiration (Abb. A. Wilhelm).

2. Das Immunsystem

Die Abwehr des Körpers gegen Krankheitserreger basiert auf dem Prinzip der Erkennung spezifischer Oberflächen- oder Erbsubstanzbestandteile von Mikroorganismen. Nicht nur Pathogene können eine Immunantwort auslösen, auch unbelebte Partikel aus der Umwelt können von Immunzellen mithilfe von Rezeptoren erkannt werden und als sogenanntes Antigen fungieren. Das Abwehrsystem beruht auf einem komplizierten Zusammenspiel aus Immunzellpopulationen mit unterschiedlichen Aufgaben und löslichen Enzymen sowie zahlreichen Signal- und Botenstoffen, den Zytokinen oder Chemokinen, die der interzellulären Kommunikation dienen. Es lässt sich in das angeborene und erworbene bzw. adaptive Immunsystem einteilen, welche jeweils im Folgenden näher betrachtet werden [44].

2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist ein phylogenetisch altes Abwehrsystem, das den Körper von Geburt an gegen Infektionen schützt, noch bevor das adaptive

Immunsystem voll entwickelt ist. Es ist verantwortlich für die Erstantwort bei der Infektionsbekämpfung. Für eine effektive Abwehr interagiert es mit dem erworbenen Immunsystem, das nachfolgend betrachtet wird. Das angeborene Immunsystem erkennt konservierte Oberflächenstrukturen auf Pathogenen bzw. Erbsubstanzkomponenten, sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) mittels spezieller zellgebundener oder löslicher Rezeptoren, den *pattern recognition receptors* (PRR) [45]. Es gewährleistet somit die Erkennung einer Vielzahl von Krankheitserregern und lässt sich in eine humorale und zelluläre Komponente einteilen [44]. Die humorale Komponente besteht aus im Plasma gelösten Stoffen. Zu diesen zählen u. a. Defensine, Lysozyme, Proteine der Akute-Phase-Reaktion, Zytokine und das Komplementsystem. Letzteres besteht aus inaktiven Enzymen, die im Blut zirkulieren. Nach Antigenerkennung über den Lektin-Weg mittels PRR, den klassischen Weg über Antikörpererkennung oder den alternativen Weg der spontanen Enzymaktivierung kommt es zu einer Reaktionskaskade weiterer Enzyme, wodurch wiederum proinflammatorische Zytokine sezerniert und Immunzellen an den Ort der Infektion gelockt werden [45, 46]. Zur zellulären Komponente des angeborenen Immunsystems zählen Mastzellen, Natürliche Killerzellen (*NK-Zellen*), Granulozyten sowie Makrophagen und dendritische Zellen (*dendritic cells – DCs*). Aufgrund ihrer essentiellen Rolle bei der Erkennung von Antigenen und Initiierung der adaptiven Immunantwort wird im Folgenden insbesondere auf die Makrophagen und DCs sowie ihre Funktion als Phagozyten (*Fresszellen*) bzw. antigenpräsentierende Zellen eingegangen [47, 48].

2.1.1 Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems und werden zusammen mit Monozyten des Blutes und Monoblasten des Knochenmarks zum *mononukleären Phagozytensystem* (MPS) gezählt [49]. Mithilfe der *macrophage scavenger-receptors* (MSR), u.a. dem *MARCO-Rezeptor* (*macrophage receptor with collagenous structure*), bzw. *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) als Mitgliedern der PRRs, sind sie in der Lage, PAMPs entweder direkt oder nach sogenannter *Opsonisierung*, der Markierung der Oberfläche durch Antikörper bzw. durch das Komplementsystem, zu phagozytieren. Opsonisierte Mikroorganismen werden im Falle der Markierung durch Antikörper mittels *Fragment crystallizable* (Fc)-Rezeptoren oder im Falle der Markierung durch das Komplementsystem mittels

Komplementrezeptoren erkannt und phagozytiert. Die Prozessierung der phagozytierten Mikroorganismen erfolgt durch verschiedene Mechanismen, wie die Ansäuerung des pH-Wertes, indem das Phagosom mit dem enthaltenen phagozytierten Mikroorganismus mit dem Lysosom zum Phagolysosom verschmilzt. Reaktive Sauerstoffverbindungen und endogene Enzyme dienen ebenfalls der Antigenprozessierung [50]. Über MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) können diese Antigene anschließend T-Lymphozyten als Zellen des erworbenen Immunsystems präsentiert werden und eine Immunantwort initiieren, weshalb sie zu den *antigenpräsentierenden Zellen* zählen (*antigen presenting cells* - APCs). Auch körpereigenes Antigen von z. B. untergehenden Zellen oder Antigen unbelebter Natur kann erkannt, phagozytiert und abgebaut werden [45]. Zudem locken Makrophagen weitere Immunzellen durch die Ausschüttung einer Vielzahl von Botenstoffen, sogenannten Zytokinen an. Wichtige Vertreter dieser Zytokine sind u. a. TNF- α (*Tumornekrosefaktor*) und die proinflammatorischen Interleukine IL-1 α und β sowie IL-6. Neben ihrer pyrogenen Wirkung aktivieren sie Endothelzellen, fördern u. a. die Hämatopoese, regen wiederum die Zytokinproduktion in anderen Zellen an oder induzieren die Bildung von Akute-Phase-Proteinen und Thrombozyten. Neben Zytokinen sezernieren Makrophagen auch verschiedene Enzyme wie z. B. Kollagenase oder antibakterielles Lysozym. Das ebenfalls sezernierte Zytokin GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) fördert die Differenzierung der Vorläuferzellen im Knochenmark zu Granulozyten und Monozyten [50-52]. Makrophagen residieren in verschiedenen Geweben und tragen je nach Sitz unterschiedliche Namen. So sind sie als *Langerhans-Zellen* in der Haut, als *Kupffer-Sternzellen* in der Leber, als *Mikroglia-Zellen* im ZNS, als *Osteoklasten* im Knochen und als Peritoneal- oder Lungen-Makrophagen zu finden. Sie alle gehen aus den im Blut zirkulierenden Monozyten hervor und erhalten ihre spezifische Bezeichnung nach Auswanderung in das jeweilige Gewebe. Neuere Forschungsergebnisse deuten auf eine Abstammung der Gewebemakrophagen aus einer erythromyeloiden Vorläuferzelle aus dem Dottersack hin [53]. Abhängig von ihrer Lokalisation besitzen sie unterschiedliche, charakteristische Eigenschaften und Funktionen. Die Makrophagen der Lunge stellen hier eine Besonderheit dar, da sie als einzige Makrophagen Kontakt mit der Außenluft besitzen [54]. Vom Säuger ist bekannt, dass ortsansässige Makrophagen für die Eliminierung von Bakterien aus der Lunge von großer Bedeutung sind [55]. Diese

befinden sich im Bereich der Bronchien, im Lungeninterstitium und in den Alveolen, wo sie beim Säuger im Normalzustand bis zu 95% des Zellvorkommens ausmachen [56]. Diese Alveolarmakrophagen tasten mit ihren Zellfortsätzen die Lungenoberfläche kontinuierlich nach fremdem Antigen bzw. Partikeln ab, rekrutieren, wenn nötig, durch Zytokin- bzw. Chemokinausschüttung weitere Immunzellen an den Infektionsort und spielen somit neben den respiratorischen Epithelzellen eine wichtige Rolle bei der ersten lokalen unspezifischen Immunabwehr [57, 58]. In Mausinfektionsmodellen konnte gezeigt werden, dass die Anfälligkeit für bestimmte bakterielle Infektionen wie z. B. durch *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* oder *Klebsiella pneumoniae* nach experimenteller Dezimierung der AMs deutlich steigt und zu einer erhöhten Mortalität führt [59-61]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Alveolarmakrophagen bei der lokalen Immunabwehr der Lunge. Respiratorische Makrophagen beim Vogel sind wenig erforscht und ihre Lokalisation wurde kontrovers diskutiert, wie unter Kapitel 3.2. näher beschrieben wird.

Aviäre Makrophagen

Analog zur Einteilung beim Säuger werden auch aviäre Makrophagen gemeinsam mit Monozyten und Monoblasten dem MPS zugeordnet. Aviäre Phagozyten des MPS ähneln in ihrer Morphologie, Verteilung und Funktion den Säuger-Phagozyten [62]. Sie entwickeln sich aus hämatopoetischen Zellen des Dottersacks und durchlaufen ebenfalls Differenzierungsprozesse, durch die sie ihre gewebespezifischen Funktionen erhalten [63]. Die histologische Untersuchung der aviären Makrophagen durch immunhistochemische Färbungen gestaltet sich im Vergleich zum Säuger als schwierig. Bislang zur Verfügung stehende monoklonale Antikörper ermöglichen die Detektion von Makrophagen [64-66] und DCs [67]. Trotz dieser verfügbaren Antikörper zur Charakterisierung von APCs, ist eine eindeutige Unterscheidung von Makrophagen und DCs jedoch aufgrund der fehlenden linienspezifischen Marker nicht möglich, wie Nagy *et al.* übersichtlich in einem Review zusammenfassten [7]. Dies erschwert, die Entwicklung und Wanderung der Makrophagen beim Huhn zu verstehen.

Für die Antigenaufnahme in der Hühnerlunge spielen in der Lunge residierende Makrophagen beim Säuger eine wichtige Rolle. Diese Makrophagenpopulation wird beim Vogel kontrovers diskutiert und wird im Rahmen der zellulären Abwehrmechanismen der Vogellunge in Kapitel 3.2. näher betrachtet.

2.1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind Zellen des angeborenen Immunsystems, die gemeinsam mit Makrophagen zum MPS zählen und zur Gruppe der *antigenpräsentierenden Zellen* gehören. Sie sind ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und darauf spezialisiert, Antigen aufzunehmen und zu prozessieren. Durch anschließende Präsentation an naive T-Zellen wird das erworbene Immunsystem effektiv stimuliert [45]. Da diese Funktion im Gegensatz zu anderen APCs als Hauptaufgabe der dendritischen Zellen gilt, werden sie auch als *professionelle antigenpräsentierende Zellen* bezeichnet [68]. Dendritische Zellen exprimieren wie auch Makrophagen PRRs, mit denen sie Oberflächenmoleküle von Pathogenen (PAMPs) erkennen und aufnehmen. Zu diesen zählen verschiedene oberflächengebundene oder zytoplasmatische TLRs, mit denen Mikroorganismen erkannt und aufgenommen werden können. Nach Antigenaufnahme wandern die DCs aus dem Gewebe in den Paracortex lokaler Lymphknoten ein und präsentieren das aufgenommene Antigen über MHC-I bzw. MHC-II-Moleküle und costimulatorische Moleküle an dort ansässige naive T-Zellen (s. Abbildung 8), wodurch es zum Priming der T-Zellen und zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems kommt [69, 70]. Durch ihr nahezu ubiquitäres Vorkommen im Körper können DCs mithilfe ihrer langen Zellfortsätze effektiv Gewebeoberflächen abtasten. Neben Fremdanigen werden durch DCs im Thymus auch körpereigene Antigene an heranreifende T-Zellen präsentiert, wodurch eine zentrale Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe erzielt wird. Ist dieses System gestört, kann es zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen kommen. Auch bei der Allergieentstehung oder Transplantatabstoßung spielen dendritische Zellen eine wichtige Rolle, da hierbei Antigen aus der Umwelt bzw. des Fremdgewebes präsentiert wird und somit eine unerwünschte Immunreaktion ausgelöst werden kann.

Im Laufe ihrer Entwicklung differenzieren sich die DCs in Subtypen, die wiederum weiter heranreifen und sich schließlich voneinander sowohl in ihrer Funktionen der Antigenprozessierung und -präsentation als auch Aktivierungseffizienz unterscheiden [69, 71, 72]. Obwohl DCs im Körper wandern und somit in fast allen Geweben und mukosalen Oberflächen zu finden sind [73], gibt es favorisierte Lokalisationen bestimmter Subtypen. Ihrer Funktion nach lassen sich die dendritischen Zellen in die *plasmazytoiden* DCs einerseits und die *klassischen* oder *interdigitierenden* DCs andererseits einteilen. Plasmazytoide DCs spielen

eine wichtige Rolle bei der viralen Abwehr. Über die intrazellulären PRRs TLR-9 und TLR-7 erkennen sie virale Nukleinsäurefragmente, präsentieren Virusbestandteile mithilfe von MHC-I auf ihrer Oberfläche und sezernieren das antivirale Zytokin Interferon- α [74]. Klassische DCs befinden sich zum einen als spezialisierte *Langerhans Zellen* in der Epidermis und zum anderen vornehmlich in der T-Zell-Zone von Lymphknoten – dem Paracortex – sowie in der PALS (*periarterielle Lymphscheide*) der Milz. Langerhans-Zellen sind spezialisierte APCs der epidermalen Hautschicht, die sowohl Eigenschaften von Makrophagen als auch von DCs besitzen und sich in der Expression von Oberflächenmolekülen wie z. B. *Langerin* und den *Birbeck-Granula* von anderen Makrophagen oder DCs unterscheiden [75, 76]. Für Langerhans-Zellen wird eine Abstammung aus Vorläuferzellen der fetalen Leber und dem Dottersack angenommen [77], während sich die übrigen DCs von myeloiden Vorläuferzellen ableiten. Neuere Untersuchungen liefern detaillierteres Wissen über Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (*u. a. CD11b und CD11c, Langerin*), Funktion und Entwicklung der DCs. Bei der Maus kann eine Einteilung der klassischen DCs in $CD8^+$ DC-ähnliche und $CD11b^+$ migrierende bzw. im lymphatischen Gewebe residierende DCs, von Monozyten abstammende sowie epidermale DCs (Langerhans-Zellen) bzw. dermale DCs vorgenommen werden.

Ein Zelltyp, der aufgrund seines Phänotyps als *follikuläre dendritische Zelle* (FDC) bezeichnet wird, unterscheidet sich jedoch in seiner Funktion von den übrigen genannten DCs und ist in germinalen Zentren zu finden [78]. Während Langerhans-Zellen und interdigitierende DCs naive T-Zellen aktivieren, konnte die Funktion der follikulären dendritischen Zellen erst durch neuere Forschungsergebnisse näher beleuchtet werden. Sie stammen nicht von myeloiden, sondern von ubiquitären perivaskulären Vorläuferzellen ab und tragen Immunkomplexe auf ihrer Oberfläche. Als Funktion der FDCs wird im Gegensatz zu den übrigen DCs nicht die Phagozytose, sondern die Aktivierung und Stimulierung von B-Zellen im Rahmen der germinalen Zentrumsreaktion (s. Kap. 2.2.1) als Hauptaufgabe postuliert [71].

Aviäre dendritische Zellen

Analog zum Säuger lassen sich die aviären DCs in Langerhans-Zellen und interdigitierende DCs unterteilen, die sowohl hinsichtlich ihrer Lokalisationen in den sekundären lymphatischen Organen als auch ihrer Funktionen denen der

Säuger-DCs ähneln [79]. Aviäre dendritische Zellen leiten sich von einer hämatopoetischen Stammzelle der fetalen Leber bzw. dem Knochenmark ab und finden sich wie beim Säuger in verschiedenen lymphatischen Geweben, so z. B. in Bursa Fabricii, Thymus, Milz und Zäkaltonsillen sowie anderen Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben. Als Langerhans-Zellen besiedeln sie die Haut sowie die Schleimhäute von Augen, Ösophagus und Zunge. Aviäre Langerhans-Zellen entwickeln sich neuen Erkenntnissen nach zum Großteil aus erythromyeloiden Vorläuferzellen aus dem Dottersack und nicht aus der fetalen Leber oder dem Knochenmark, wie dies für die übrigen aviären dendritischen Zellen postuliert wird. Ihr Nachschub und ihre Proliferation werden beim Huhn in der Epidermis angenommen [80]. Beim Huhn wurden Zellen mit dem Phänotyp einer DC mittels Mikroskopie in den GCs der Bursa Fabricii bzw. den Zäkaltonsillen beschrieben und aufgrund ihrer vielen Granula als *bursal secretory dendritic cell* (BSDC) bezeichnet [81, 82]. BSDCs besitzen ähnlich wie FDCs eine wichtige Funktion bei der B-Zell-Reifung beim Vogel [83, 84]. Anhand von Untersuchungen an der Hühnermilz wird die Hypothese aufgestellt, dass aviäre IDCs und FDCs der Milz aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der Ellipsoid-assoziierten Zelle [85] entstammen.

Im Vergleich zum Säuger ist über die Entwicklung und die funktionellen Eigenschaften der DCs weniger bekannt. Zur histologischen Beschreibung werden beim Huhn zum einen die phänotypische Charakterisierung und zum anderen das Vorhandensein spezifischer Marker herangezogen. Die Charakterisierung der aviären DC-Subtypen ist im Hinblick auf das Verständnis der Antigenaufnahme und Generierung einer Immunantwort beim Vogel von großer Bedeutung und daher das Ziel verschiedener Forschungsgruppen. In jüngeren Studien konnte an aviären DCs, die durch Stimulation aus Knochenmarkzellen generiert wurden, gezeigt werden, dass diese ähnliche Oberflächenmoleküle wie Säuger-DCs exprimieren, u. a. CD11, MHC-II, CD40 und das LPS-induzierte C-Typ-Lektin DEC205 [1, 86]. Trotz dieser Erkenntnisse und Etablierung von *in vitro*-Experimenten mit aviären DCs ist eine eindeutige Charakterisierung von aviären DC-Subtypen noch immer schwierig. Grund dafür sind zum einen fehlende linienspezifische Marker und zum anderen sind einige der Zielantigene der für das Haushuhn verfügbaren Antikörper noch nicht identifiziert, sodass die Zusammenhänge der verschiedenen DC-Subtypen noch nicht gänzlich verstanden sind [7].

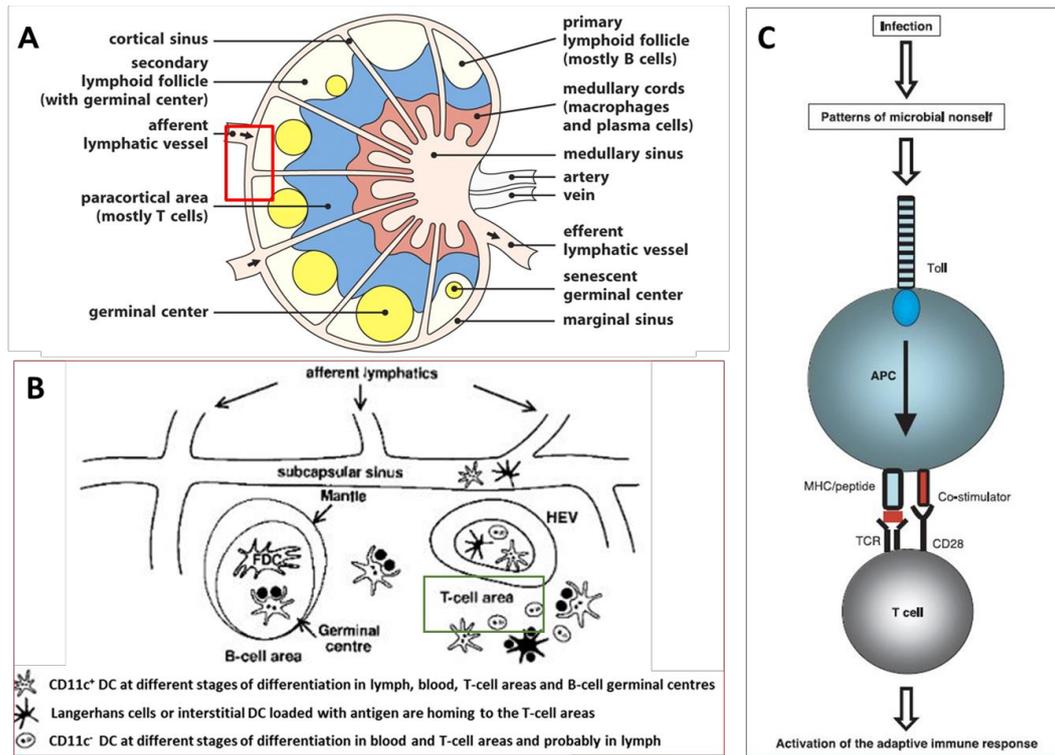


Abbildung 8: Lymphknoten und Antigenpräsentation. **A:** Schematische Darstellung eines Lymphknotens mit primären und sekundären Lymphfollikeln, *Janeway Jr. et al.*[87]. **B:** Ausschnitt aus A (rotes Rechteck). DCs wandern in den Lymphknoten ein und präsentieren den T-Zellen Antigen im Paracortex, *Banchereau et al.* [88]. HEV: Hochendotheliale Venole **C:** Ablauf der Antigenpräsentation durch eine APC an eine T-Zelle mithilfe der Interaktion des MHC-Moleküls mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und der costimulatorischen Moleküle, *Medzhitov et al.* [89].

2.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene oder adaptive Immunsystem unterscheidet sich vom angeborenen in der Art und Weise, wie es Pathogene erkennt. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem erkennt es diese zunächst nicht selbst, sondern es bedarf der Stimulierung der T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen. Es besteht aus Lymphozyten, den B- und T-Zellen, die einen Reifungsprozess in primären lymphatischen Geweben (beim Säuger Knochenmark und Thymus) durchlaufen und anschließend in die peripheren lymphatischen Gewebe, den Ort der Antigenpräsentation, auswandern. Nach einer erfolgten Antigenpräsentation differenzieren sich die T-Zellen, nehmen ihre Effektorfunktionen wahr und stimulieren wiederum B-Zellen, wie nachfolgend näher beschrieben wird [90].

Der Ort der primären Reifung der Lymphozyten verleiht ihnen ihren Namen: so reifen B-Lymphozyten im Knochenmark (*bone marrow*) bzw. beim Vogel in der Bursa Fabricii heran, während sich die T-Lymphozyten im Thymus entwickeln [87]. Beide besitzen jeweils unterschiedliche Effektorfunktionen, die im Folgenden nähere Betrachtung finden. Das adaptive Immunsystem ist in der Lage,

durch Gensegmentumlagerung, sogenanntes *gene rearrangement*, unterschiedliche Verknüpfung von Teilen der leichten und schweren Ketten des B- und T-Zell-Rezeptors herzustellen. Durch zusätzliche *somatische Hypermutation* bzw. *Punktmutation* des B-Zell-Rezeptors (BCR) wird zudem die Variabilität zellgebundener bzw. sezernierter Rezeptoren, den Antikörpern, erhöht. Dadurch kann das weite Spektrum der Erreger nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip erkannt und gebunden werden. Die Bindung des Antikörpers mit einem Antigen führt zur Bildung eines Immunkomplexes. Dieser kann dann über das Endstück des Antikörpers, das Fc-Fragment von Zellen des angeborenen Immunsystems, den APCs, Granulozyten, Mastzellen, NK-Zellen aber auch von B-Zellen mithilfe ihrer Fc-Rezeptoren erkannt und abgebaut werden. Somit sind beide Immunsysteme voneinander abhängig und ihr Zusammenspiel ist von essentieller Bedeutung für eine erfolgreiche Immunabwehr [47].

2.2.1 B-Lymphozyten

Nach ihrer Reifung im Knochenmark wandern die B-Lymphozyten (*B-Cells*, BC) in die peripheren bzw. sekundären lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz und Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe) aus und residieren dort in speziellen Bereichen, wo sie sogenannte *primäre Lymphfollikel* bilden. Diese BCs hatten noch keinen Antigenkontakt und werden daher als naiv bezeichnet. Sie exprimieren zunächst den membrangebundenen und wenig antigenspezifischen B-Zell-Rezeptor bzw. *Immunglobulinrezeptor* IgM [87].

Immunglobulin-Rezeptor

Der BCR gehört zur Familie der Immunglobuline. Diese können beim Säuger in fünf Isotypen eingeteilt werden: IgM, IgG, IgD, IgA, und IgE, die sich jeweils in ihrem Aufbau unterscheiden [91]. Während IgM ein Pentamer mit relativ geringer *Affinität* der einzelnen Rezeptoren, aber hoher *Avidität* ist und im Serum zu finden ist [92], handelt es sich bei IgA um ein von subepithelial gelegenen Plasmazellen gebildetes Monomer, das in Form eines Dimers durch Transzytose über den pIg-Rezeptor (*polymeric immunoglobulin receptor*) an Epitheloberflächen transportiert wird und vor allem schleimhautassoziiert vorliegt bzw. in Sekreten der Schleimhäute zu finden ist [93, 94]. IgD und IgG sind Monomere und können aufgrund ihrer geringen Größe nahezu alle Körpergewebe erreichen. Während IgD beim Säuger einen sehr geringen Anteil ausmacht und dessen Funktion noch nicht völlig verstanden ist, handelt es sich beim IgG um das zentrale

Immunglobulin bei der spezifischen Antigenerkennung und -bindung im Blut und Gewebe. In der Anfangsphase einer Infektion wird zunächst antigenspezifisches IgM sezerniert. Erst nach dem Isotypwechsel im germinalen Zentrum kommt es zur Bildung hochaffiner Antikörper (s. u.). Das Immunglobulinmolekül lässt sich durch enzymatische Spaltung in drei Fragmente unterteilen: zwei Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*), die aus den V-Domänen der leichten und schweren Ketten bestehen und ein Fc-Fragment, wie in Abbildung 9 dargestellt ist [95]. Die große Vielfalt der Immunglobulinrezeptoren entsteht zum Teil durch das primäre *gene rearrangement* einzelner Gensegmente im Knochenmark bzw. beim Vogel in der Bursa Fabricii. Die sekundäre Diversifizierung des BCR erfolgt in den sekundären lymphatischen Organen [87, 96].

Germinale Zentrumsreaktion

Nach der Bindung von löslichem Antigen durch den BCR bzw. nach Stimulation durch eine spezielle Population der T-Lymphozyten, den *T-Helferzellen* (T_H), werden die B-Zellen aktiviert. Die T_H wiederum wurden zunächst durch eine APC aktiviert und erhalten dadurch ihre Fähigkeit, B-Zellen zu aktivieren [90].

Im weiteren Verlauf der Immunantwort kommt es zur Bildung eines *sekundären Lymphfollikels* mit einem *germinalen Zentrum* (GC). In diesem finden die weitere Variation des B-Zell-Rezeptors und die Differenzierung der B-Zelle in eine antikörperproduzierende Plasmazelle statt. Dabei kommt es unter Mitwirkung des Enzyms AID (*activation induced cytidine deaminase*) zum Wechsel des Immunglobulin-Isotyps sowie zur Diversifizierung der antigenbindenden Domäne des Rezeptors durch somatische Hypermutation [91, 97]. Das Enzym AID wandelt dabei Cytidin durch Deaminierung in Uracil um und führt somit zu einer Fehlpaarung mit Guanin, einem U:G-*mismatch*, der durch Polymerasen in ein A:T-Paar umgeschrieben wird, sodass es zu einer Änderung der ursprünglichen Nukleotidsequenz kommt. Dieser Vorgang findet nur in B-Zellen während der *germinalen Zentrumsreaktion* statt. Durch die somatische Hypermutation erhöht sich die Bindungsstärke, die *Affinität*, des Immunglobulinezeptors zu einem bestimmten Antigen, sodass dieser Vorgang als *Affinitätsreifung* bezeichnet wird. Gleichzeitig wird die Anzahl der antigenspezifischen B-Zellen durch *klonale Expansion* erhöht [87, 98]. Ein Teil der B-Zellen entwickelt sich zu antigenspezifischen Plasmazellen, die in der Lage sind, ihren BCR in Form von hochaffinen Antikörpern zu sezernieren, die sich sowohl im Blut als auch im

Gewebe verteilen. Einige der BCs entwickeln sich zu sogenannten Gedächtniszellen mit erhöhter Lebensdauer und der Fähigkeit, erregerspezifische Antikörper über einen langen Zeitraum zu sezernieren. Die Gedächtniszelle ermöglicht die Ausbildung *des immunologischen Gedächtnisses*, wodurch es bei Neuinfektion mit einem bereits bekannten Erreger zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort kommt [47, 87].

B-Lymphozyten des Huhns

Viele der grundlegenden Vorgänge bei der Generierung einer humoralen Immunantwort sind innerhalb der Wirbeltiere ähnlich oder sogar konserviert, ebenso wie der Aufbau bestimmter (Co-) Rezeptoren. Beim Vogel finden sich im Vergleich zum Säuger Unterschiede hinsichtlich der Entstehung, Reifung und Ausbildung des Immunglobulinrezeptors der B-Zellen. Auch die T-Zell-Linien weisen Unterschiede in der Expression ihrer Rezeptormoleküle auf, auf die nachfolgend eingegangen wird [63].

Die B-Zell-Entwicklung und Reifung finden beim Vogel in der Bursa Fabricii statt, einem Organ, das exklusiv in der Klasse der Aves zu finden ist. Die nach seinem Namensgeber Hieronymus Fabricii benannte Bursa stellt eine dorsale Ausstülpung der Kloake dar und ist als primäres lymphatisches Organ essentiell für die Bildung immunkompetenter B-Zellen und die Generierung einer humoralen Immunantwort [99], wie an bursektomierten Tieren gezeigt werden konnte [100-103]. Nachdem lymphoide Vorläuferzellen des Knochenmarks die Bursa besiedelt haben, beginnt ein Reifungsprozess. Anschließend verlassen die B-Zellen die Bursa und wandern in die peripheren lymphatischen Organe Milz und Lymphfollikel des *Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes* (MALT). Beim Huhn finden sich die Immunglobulin-Isotypen IgM, IgA und IgY, wobei letzterer einem Zwischenmolekül des Säuger-IgG und IgE entspricht. In ihrem Aufbau, Funktion und Verteilung besitzen die Immunglobuline viele Gemeinsamkeiten mit den Immunglobulin-Isotypen der Säuger. Die Diversifizierung des Ig-Rezeptors kann in Bursa, Dottersack, Milz, Knochenmark, oder Blut erfolgen und entsteht ähnlich wie beim Säuger durch das *gene rearrangement* von leichter und schwerer Kette. Die Diversität des Rezeptors wird beim Huhn jedoch durch einen Vorgang geschaffen, der als *somatic gene conversion* bezeichnet [104]. Das ist ein Vorgang, der während der Reifung der B-Zellen in der Bursa stattfindet und bei dem eine Sequenz des neu arrangierten

Gensegments durch eine homologe benachbarte Sequenz eines Pseudogens ersetzt wird [105-108].

2.2.2 T-Lymphozyten

Nach der Bildung im Knochenmark wandern T-Lymphozyten, kurz T-Zellen (TC) in den Thymus ein, wo sie einen Reifungs- und Selektionsprozess durchlaufen, bei dem ihnen durch dendritische Zellen körpereigene Antigene präsentiert werden. Ziel dieser Selektion ist die Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe und die Verhinderung von Autoimmunreaktionen. Autoreaktive TCs werden eliminiert, sodass nur autotolerante TCs den Thymus verlassen, um ähnlich wie die B-Lymphozyten, in die peripheren lymphatischen Organe auszuwandern und auf ihre Aktivierung zu warten. In den Lymphknoten finden sie sich vor allem im Bereich des Paracortex. Es lassen sich zwei Subtypen unterscheiden: $CD8^+$ - und $CD4^+$ - T-Zellen. Diese unterscheiden sich sowohl in der Expression ihrer Co-Rezeptoren als auch in ihren Funktionen. Zu diesen zählen die Aktivierung von Makrophagen, die Zytotoxizität, Regulierung der T-Zell-Antwort, Hilfe bei der Antikörperproduktion durch B-Zellen und die Ausbildung einer Memory-Funktion [87, 90]. $CD4^+$ -TCs oder auch T-Helferzellen (T_H) lassen sich in T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} und folliculäre T_H (T_{FH}) bzw. regulatorische T-Zellen (T_{reg}) unterscheiden. T_{H1} , T_{H2} und T_{FH} haben hierbei eine essentielle Bedeutung, da nur sie B-Zellen aktivieren und deren Differenzierung zu Effektorzellen einleiten können. T_{H17} -Zellen unterstützen die Immunantwort durch neutrophile Granulozyten, während T_{reg} -Zellen in der Lage sind, die T-Zell-Antwort über die Ausschüttung von TGF- β (*transforming growth factor*) zu supprimieren. $CD8^+$ -TCs sind zytotoxische T-Zellen, die ähnlich wie Natürliche Killerzellen körpereigene Zellen anhand von speziellen Signalmolekülen bzw. deren Fehlen (*missing self*) abtöten. Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Erreger. Infizierte Körperzellen präsentieren $CD8^+$ -TCs Pathogenfragmente über MHC-I auf ihrer Oberfläche und geben damit das Signal zur ihrer Abtötung [47, 90, 109].

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ähnelt in seinem Aufbau dem BCR. Er besteht aus zwei Ketten, der α - und β -Kette, die jeweils aus einer variablen Region mit der *antigen binding site* und einer konstanten Region bestehen. Auch der TCR entsteht durch Gensegmentumlagerung, seine Diversität beruht auf der im Vergleich zum BCR höheren Anzahl an Kombinationen der einzelnen

Gensegmente, was die B-Zelle durch die somatische Hypermutation kompensiert. Im Gegensatz zum BCR ist der TCR stets membrangebunden und kann anders als der BCR nur bereits prozessiertes Antigen in Form von Peptidfragmenten erkennen. Ähnlich wie B-Zellen können auch T-Zellen eine Gedächtnisfunktion besitzen und dadurch bei wiederholter Infektion mit einem bereits bekannten Erreger effektiver B-Zellen aktivieren. Neben den α/β -T-Zellen gibt es γ/δ -T-Zellen. Diese sind beim Säuger sehr selten, machen beim Huhn aber bis zu 50 % der peripheren Lymphozyten aus [109-111].

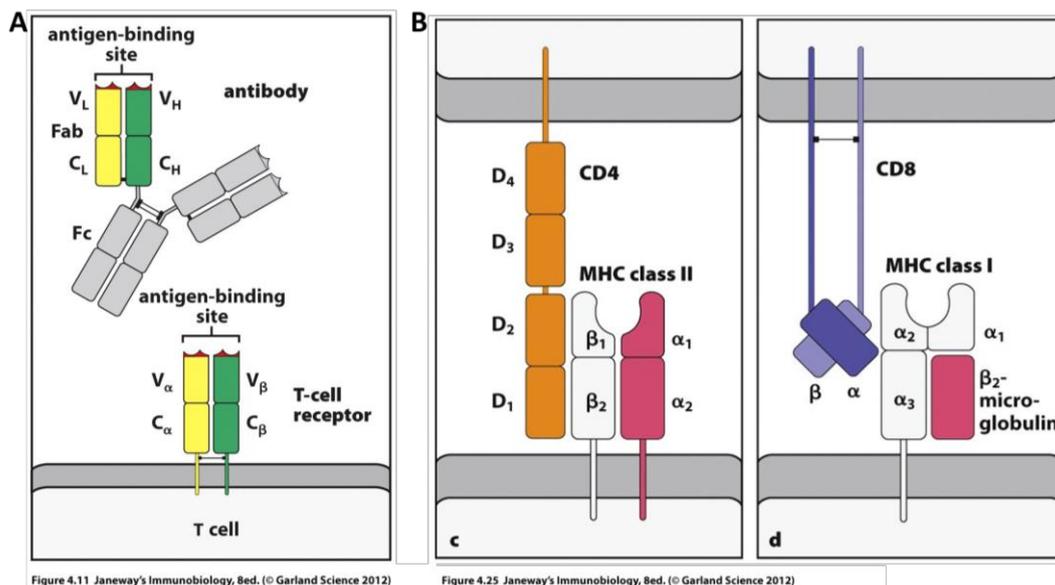


Abbildung 9: Aufbau des Antikörpers und des TCR (A). Der BCR kann als Antikörper bzw. Immunglobulin sezerniert werden oder zellmembrangebunden vorliegen, wohingegen der TCR stets membrangebunden ist. Immunglobuline bestehen aus je zwei schweren Ketten (H) und zwei leichten Ketten (L), die wiederum aus variablen (V) und konstanten Regionen (C) aufgebaut sind. Die V-Domänen der schweren und leichten Kette bilden die *antigen binding site*. Immunglobuline lassen sich enzymatisch in ein Fab- und Fc-Fragment unterteilen, wobei ersteres für die Antigenbindung und letzteres für die Effektormechanismen verantwortlich ist. Der TCR ist ähnlich wie der BCR aufgebaut, besteht jedoch aus einer α - und β -Kette. B: Aufbau der MHC-Molekül-Klassen und der TC-Co-Rezeptoren und Interaktion zwischen diesen beiden während der Antigenerkennung, *Janeway Jr. et al.* [87].

T-Lymphozyten des Vogels

Die Entwicklung der T-Zellen findet beim Vogel ähnlich wie beim Säuger im Thymus statt. Nach Reifung und klonaler Selektion verlassen die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen den Thymus und wandern in die peripheren lymphatischen Organe Milz und MALT ein [112]. Analog zum Säuger kann der TCR aus α -, β -, γ - oder δ - Ketten aufgebaut sein, so lassen sich α/β -T-Zellen (TCR2), die häufig $CD4$ und $CD8$ exprimieren, γ/δ -T-Zellen (TCR1), die selten $CD4$ oder $CD8$ exprimieren [113] sowie ein $CD4$ und teilweise $CD8$ exprimierender TCR3 unterscheiden [114]. Im Gegensatz zum Säuger besitzt das Huhn einen weitaus

höheren Anteil an T-Zellen mit γ/δ -TCR [115]. Diese sind auch im intestinalen Epithel des Huhns zu finden, ihre Funktion ist jedoch nach wie vor noch nicht verstanden [111]. Im Gegensatz zur Generierung des BCR laufen viele der Vorgänge bei der TCR-Entwicklung analog zum Säuger ab [116], wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

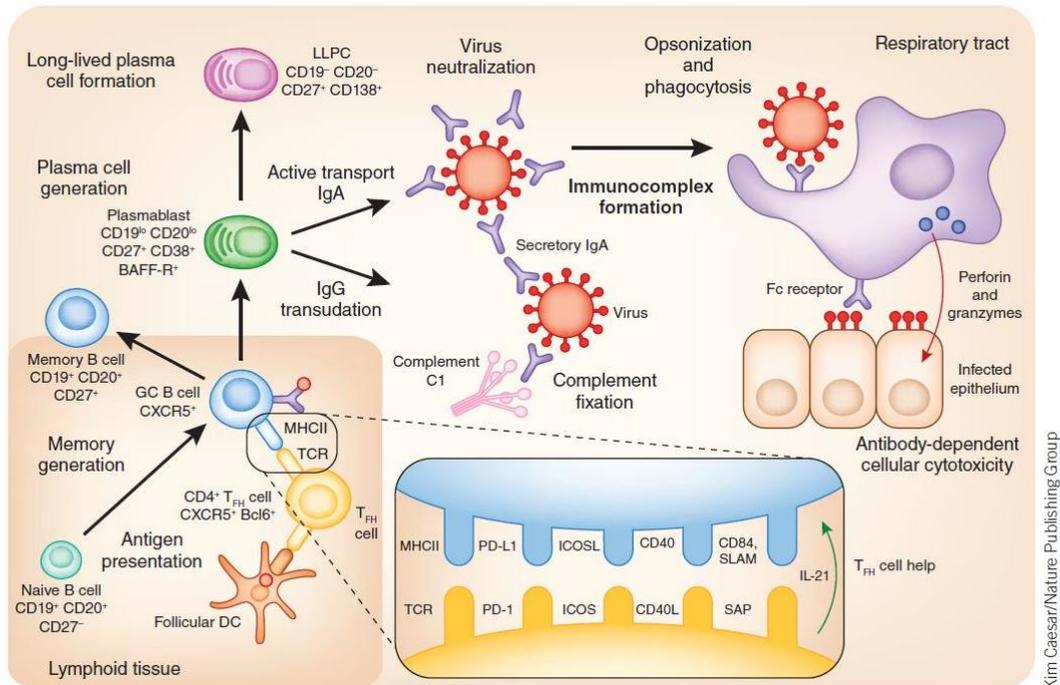


Abbildung 10: Immunantwort am Beispiel einer viralen Infektion. Nach Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen differenzieren sich die naiven B-Zellen mithilfe von $CD4^+$ - T_{FH} -Zellen im Rahmen der germinalen Zentrumsreaktion zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen. Sie sezernieren die Immunglobuline IgA und IgG, die das Antigen neutralisieren oder opsonisieren und damit zur Phagozytose durch Fresszellen kennzeichnen und aktivieren das Komplementsystem; LLPC long lived plasma cell, DC: dendritic cell, MHC-II: major histocompatibility complex-II, Chiu *et al.* [117].

2.3 Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe

Neben Milz und Lymphknoten zählt das konstitutive Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe (*mucosa associated lymphoid tissue*, MALT) zu den sekundären lymphatischen Organen. Dabei handelt es sich um Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe aus Lymphfollikelaggregaten, das in engem Kontakt zu mukosalen Körperoberflächen steht. Wie in Milz und Lymphknoten finden sich auch im MALT *hochendotheliale Venolen* (HEV), über die Immunzellen in das lymphatische Gewebe ein- und auswandern können. Die Lymphfollikel zeigen den gleichen Aufbau wie andere lymphatische Gewebe mit B- und T-Zell-Zone sowie Ausbildung von Keimzentren. Über die angrenzende Schleimhaut wird dem MALT Antigen aus der Umwelt zugeführt, wie es beim

Darm, der Lunge, dem Augen- und Nasenbereich oder dem Urogenitaltrakt der Fall ist. Die Schleimhautepithel im Bereich des MALT wird als *Lymphoepithel* (LE) oder *follikelassoziertes Epithel* (FAE) bezeichnet. Neben Bereichen aus zilienträgenden Zellen, Lymphozyten und Becherzellen ist das FAE durch spezialisierte Zellen gekennzeichnet, die ein flacheres Erscheinungsbild als die anderen Epithelzellen aufweisen und Mikrofalten an ihrer apikalen Seite besitzen, weshalb sie als *Mikrofalten-* oder *membranöse Zellen* (M-Zellen) bezeichnet werden [118, 119]. Sie sind in der Lage, Antigene aus dem Lumen über Endozytose aufzunehmen bzw. durch Transzytose an darunter liegende Immunzellen weiterzuleiten. Bei diesem Vorgang spielt der IgA-Rezeptor auf M-Zellen eine wichtige Rolle. Über ihn kann die M-Zelle Komplexe aus IgA und Antigen erkennen und aufnehmen [120]. Das FAE wird von den Lymphfollikeln durch die sogenannte *subepithelial dome region* (SED) getrennt, die reich an B- und T-Zellen sowie DCs ist und mit dem FAE interagiert (s. Abbildung 12). Dort findet die Antigenpräsentation innerhalb des MALT statt, wodurch es zur Aktivierung und Proliferation der lokalen T- und B-Zellen und somit zur Induktion der Immunantwort kommt [121]. B-Zellen, die sich zu Plasmazellen differenziert haben, wandern über das Blut aus und lassen sich in benachbarten Schleimhäuten nieder, um ihre Effektorfunktionen wahrnehmen. [120, 122, 123].

MALT ist unter den Wirbeltieren unterschiedlich ausgeprägt und je nach Lokalisation trägt es unterschiedliche Namen: GALT im Darm (*gut associated lymphoid tissue*), im Rachen als Waldeyer-Rachenring bzw. Larynx-assoziertes lymphatisches Gewebe (*larynx associated lymphoid tissue*, LALT), im Augenbereich als Konjunktiva-assoziertes Lymphatisches Gewebe (*conjunctiva associated lymphoid tissue*, CALT) oder im Nasopharynx als nasales lymphatisches Gewebe (*nasal associated lymphoid tissue*, NALT) [124-127]. Neben dieser konstitutiven Form des MALT lässt sich eine nicht von Geburt an angelegte, induzierbare bzw. fakultative Form des MALT unterscheiden, die nach Antigenkontakt bzw. längerer Immunstimulation entsteht und als tertiäres oder induziertes lymphatisches Gewebe bezeichnet wird. Dieses kommt u. a. im Darm (GALT) und in der Lunge als Bronchus-assoziertes lymphatisches Gewebe (*bronchus associated lymphoid tissue*, BALT) vor [128, 129]. Des Weiteren lässt sich auch ektopisches lymphatisches Gewebe in Form von isolierten Lymphfollikeln in verschiedenen Geweben, u. a. der Lunge unterscheiden. Die

Funktion des induzierten MALT sowie des ektopischen lymphatischen Gewebes ist nicht gänzlich geklärt. Zuweilen sind nicht immer alle histologischen Charakteristika des konstitutiven MALT darstellbar, wie HEVs, T- und B-Zell-Zone und efferente Lymphgefäße. Beim induzierten MALT findet sich beim Säuger im Falle des BALT jedoch ebenfalls ein FAE [130, 131]. Im Folgenden wird auf das MALT des Haushuhns eingegangen, unter besonderer Berücksichtigung des BALT.

2.3.1 Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe des Huhns

Das Haushuhn besitzt wie die meisten Vogelarten keine Lymphknoten [132], allerdings findet sich MALT in verschiedenen Organen wie z. B. im Darm (GALT), am Auge als Harder'sche Drüsen (*Harderian glands*, HG) und CALT, im Nasopharynx (NALT) sowie in der Lunge (BALT) [12, 133-135].

Neben diesem aggregierten lymphatischen Gewebe finden sich auch einzelne Lymphfollikel im Parenchym von z. B. Darm oder Lunge. Die Entwicklung des MALT beginnt bereits vor dem Schlupf und für die weitere Entwicklung des bedarf es eines Antigenkontaktes, wie Versuche mit keimfrei gehaltenen Hühnern zeigten [136]. B-Zellen bilden Lymphfollikel, in denen antigenabhängig GCs entstehen, die neben B-Zellen wie auch beim Säuger FDCs enthalten. Das interfollikuläre lymphatische Gewebe ist dagegen Sitz der T-Zellen. Die Bursa Fabricii, das GALT und die Pylorus-Tonsillen des Huhns sind ähnlich wie beim Säuger-MALT durch FAE überkleidet. Im GALT enthält es im Bereich der Zäkaltonsillen (*Cecal tonsil*, CT) und des *Meckel'schen Divertikels* (MD) wie auch beim Säuger neben Becherzellen und zilientragenden Zellen auch M-Zellen, die Antigen aus dem Lumen aufnehmen und an eng benachbarte Immunzellen weitergeben [137]. Mit Ausnahme des Epithels der Bursa Fabricii ist das FAE mit Lymphozyten durchsetzt und bildet das sogenannte Lymphoepithel [138-140]. Das FAE des BALT stellt hinsichtlich der Endozytosefunktion eine Besonderheit dar, da im BALT-Epithel noch keine typischen M-Zellen nachgewiesen werden konnten, wie es z. B. für das GALT gelungen ist [11].

2.3.2 Germinale Zentren

Germinale Zentren (GC) oder *Keimzentren* sind Aggregate von B-Lymphozyten, die nach Antigenstimulation in den lymphatischen Organen oder in ektopischem lymphatischem Gewebe innerhalb von Lymphfollikeln zu finden sind. Im GC

finden im Rahmen der humoralen Immunantwort die *Affinitätsreifung* und *klonale Expansion* der BCs statt, bei der es durch die Hilfe der dort ansässigen immun-komplexspeichernden FDCs zum *Immunglobulin-Klassenwechsel* und zur *somatischen Hypermutation* und Bildung von Gedächtniszellen kommt (s. Kap. 2.2.1). Beim Säuger lässt sich das GC in eine helle Zone aus ruhenden B-Zellen oder *Zentrozyten*, T_H -Zellen und FDCs und eine dunkle Zone aus proliferierenden B-Zellen, sogenannten *Zentroblasten*, im Randbereich unterscheiden (s. Abbildung 11). Beim Huhn dagegen und – wie in neueren Untersuchungen gezeigt wurde – auch bei der Ente und beim Zebrafinken, ist diese Einteilung histologisch weniger deutlich (s. Abbildung 11, 2 und 3). Auch der GC-Aufbau weicht von dem des Säugers ab, da sich FDCs im Zentrum statt wie beim Säuger am GC-Pol befinden [141] (vgl. Abbildung 11, 1). Trotz des unterschiedlichen histologischen Erscheinungsbildes wird eine ähnliche Funktion der GCs wie beim Säuger angenommen [142, 143]. Die GCs des Huhnes besitzen im Gegensatz zum Säuger eine Bindegewebskapsel und lassen sich in ganz oder teilweise umkapselte Keimzentren einteilen. Ob die unterschiedlich ausgebildete Bindegewebskapsel der aviären Keimzentren ein Ausdruck unterschiedlicher Funktion ist oder lediglich unterschiedliche Entwicklungsstadien repräsentiert, ist noch unklar [137].

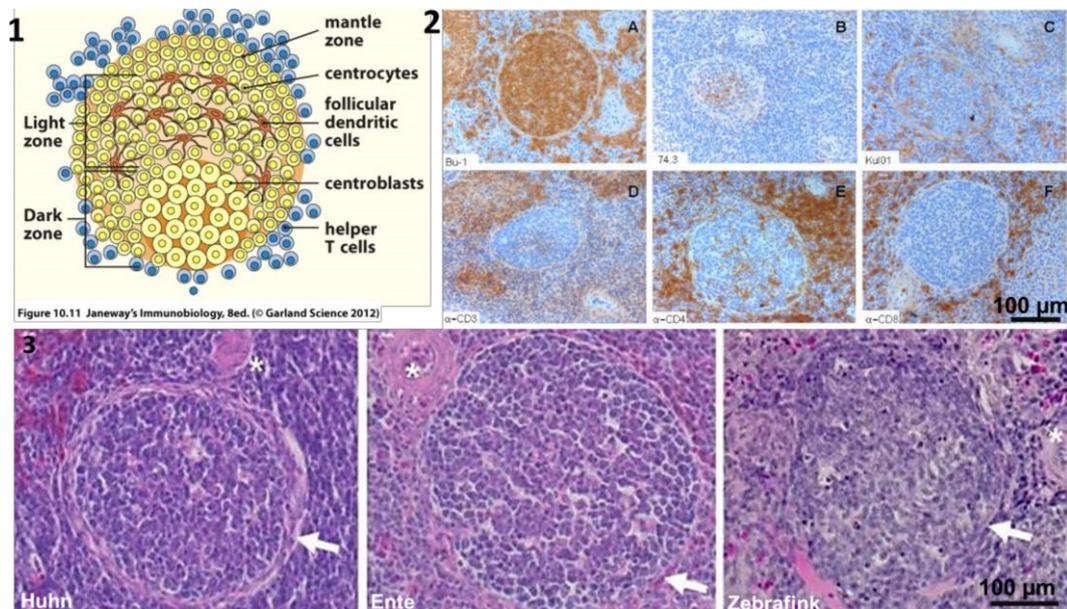


Abbildung 11: Germinale Zentren des Säugers und Vogels. **1:** Schematische Darstellung eines Säuger-GCs mit dunkler Zone aus Zentroblasten und heller Zone aus Zentrozyten und FDCs. Diese werden ummantelt von einer Zone aus T_H -Zellen, *Janeway Jr. et al* [87]. **2:** Immunhistochemische Färbung von GCs der Hühnermilz; A: B-Zell-Färbung (Bu1), B: 74.3, C: Kul01, D: anti-CD3, E: anti-CD4, F: anti-CD8, **3:** HE-Färbung der GCs aus der Milz von Huhn, Ente und Zebrafink; Pfeil: Bindegewebskapsel, * Milzgefäß, 2. und 3. *Hainke, S.* [141]

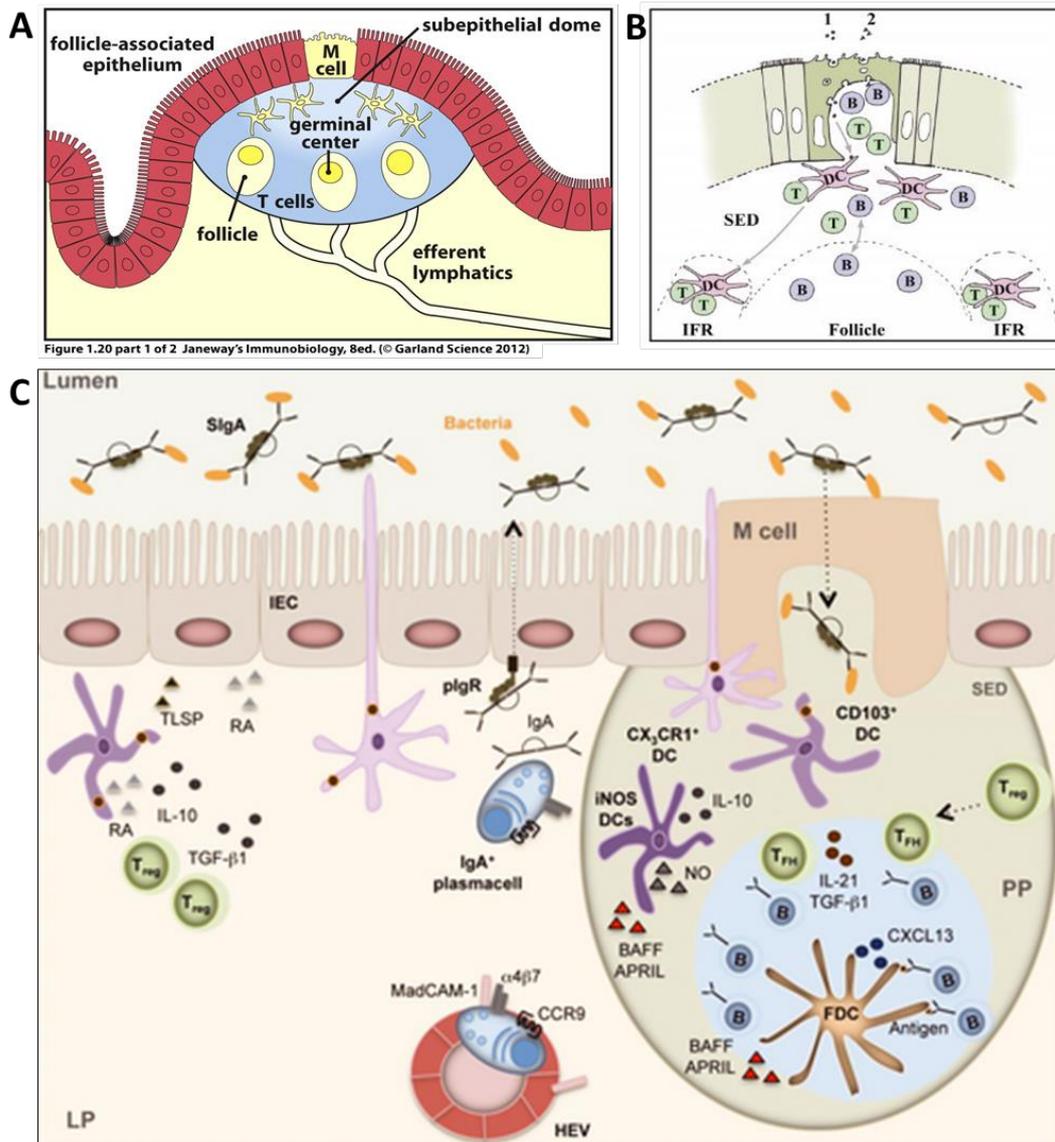


Figure 1.20 part 1 of 2 Janeway's Immunobiology, 8ed. (© Garland Science 2012)

Abbildung 12: Aufbau des MALT. **A:** Mehrere Lymphfollikel aus B-Zellen (BCs) und folliculären dendritischen Zellen (FDCs) sind durch T-Zell-(TC)-Regionen getrennt und an efferente Lymphgefäße angebunden. Zwischen dem follikelassoziierten Epithel (FAE) mit M-Zellen befindet sich die SED aus TCs, BCs und DCs [87]. **B:** Antigene aus dem Lumen (1,2) werden über M-Zellen aufgenommen und von DCs in der SED (subepitheliale Domäne) erkannt. Die DCs wandern entweder in das interfollikuläre Gewebe (IFR) und/oder in mesenterische Lymphknoten und präsentieren das Antigen naiven TCs oder sie interagieren direkt mit Memory-BCs und TCs in der basalen, taschenförmigen Einbuchtung der M-Zellen [122]. **C:** Darstellung der Peyer Plaques: ein anderer Aufnahmemechanismus verläuft über IgA-gebundenes Antigen, das durch IgA-Rezeptoren auf der M-Zelle erkannt wird. Nach Transzytose und Übergabe des Antigens an DCs sowie nach Antigenpräsentation an TCs kommt es mithilfe der FDCs zur klonalen Expansion der BCs und zur Affinitätsreifung des BCR. Die BCs wandern über efferente Lymphgefäße aus dem MALT (mucosa associated lymphoid tissue), gelangen in das Kreislaufsystem und wandern über hochendotheliale Venolen (HEV) mithilfe von Adhäsionsmolekülen in die Lamina propria benachbarter Darmabschnitte aus, wo sie sich zu immunoglobulinbildenden Plasmazellen entwickeln. Dort sezernieren sie IgA, das mithilfe des polyIg-Rezeptors (pIgR) der Darmzellen über Transzytose in das Darmlumen abgegeben wird und dort Antigene binden kann. Diese Vorgänge werden durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zytokine gesteuert, *Gutzeit et al.* [123].

2.3.2.1 Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe

Das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe des Verdauungstraktes macht den größten Anteil des MALT beim Huhn aus [144] und besteht sowohl aus diffus verteilten Lymphfollikeln als auch aus aggregiertem lymphatischem Gewebe. Zu diesem zählen neben den Ösophageal- und Pylorus-Tonsillen auch das GALT, das beim Huhn aus der Bursa Fabricii, der CT, den PPs und dem MD als Rudiment des Dottersackes besteht [137, 145]. Die CT und das MD sowie die Pylorus-Tonsillen sind von FAE überzogen, das endozytotisch aktive M-Zellen enthält [138-140].

2.3.2.2 Paraoculares lymphatisches Gewebe

Das MALT des Hühnerauges besteht im Wesentlichen aus der Harder'schen Drüse (Harderian Gland, HG) und dem CALT. Während die HG als tubulo-azinäre Drüse innerhalb der Orbita dem Augapfel anliegt, findet sich das CALT im Bereich des unteren Augenlids. Die HG entwickelt sich antigenunabhängig, wie *Bang et Bang* an SPF-Tieren zeigen konnten [134], während das CALT bei SPF (*specific pathogen-free*)-Hühnern nur gelegentlich, bei Puten unter konventionellen Haltungsbedingungen jedoch kontinuierlich ausgebildet ist [133, 144, 146]. Die HG lässt sich ihrem Aufbau und ihrer epithelialen Auskleidung nach in einen Kopf und einen Körper einteilen. Der Kopf ähnelt in seinem Aufbau anderen sekundären lymphatischen Organen und besteht aus Lymphfollikeln mit GCs, interfollikulären T-Zell-Arealen, APCs sowie einem FAE, wohingegen der Körper neben T-Zellen vorwiegend Plasmazellen beherbergt [147]. Diese Plasmazellen entstammen der Bursa Fabricii und produzieren IgM, IgA sowie IgY [144, 148]. Nach lokaler Vakzinierung mit *Infektiösem Bronchitis Virus* (IBV) konnten ebenfalls antigenspezifische Plasmazellen in der HG nachgewiesen werden, was für eine lokale Immunantwort dieses Gewebes spricht [149]. Das Sekret der HG befeuchtet die Nickhaut über einen Kanal, fließt in Richtung der oberen Atemwege ab und führt somit dem Respirationstrakt neben Antigenen aus den Schleimhäuten des Auges auch Immunglobuline zu [150]. Die genauen Mechanismen der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation, die zur Entstehung lokaler Plasmazellen führen, sind nach wie vor unklar [137]. Dem lymphatischen Gewebe des Auges wird allerdings zusammen mit dem NALT eine wichtige Funktion bei der Generierung einer Immunantwort des Atmungstraktes zugesprochen [133, 135].

2.3.2.3 Nasales lymphatisches Gewebe

Das Huhn sowie die Ente besitzen, ähnlich wie beim Säuger beschrieben, sowohl diffuses als auch aggregiertes lymphatisches schleimhautassoziiertes Gewebe im Bereich der Nasenhöhle und des Tränennasenkanals. Dieses analog zum Säuger als NALT bezeichnete Gewebe stellt die erste Eintrittspforte für inhalierte Antigene aus der Umwelt dar und beherbergt sowohl T-Zellen als auch immunglobulinproduzierende Plasmazellen [151]. Aufgrund der strategisch günstigen Lage und der frühen Entwicklung des NALT wird ihm gemeinsam mit dem BALT der Lunge eine wichtige Rolle bei der lokalen und systemischen Immunantwort gegenüber aerogenen Infektionen beim Säuger zugesprochen [152, 153]. Neuere Untersuchungen zur Antigenaufnahme durch das NALT beim Huhn suggerieren ebenfalls eine wichtige Bedeutung bei der Einleitung der Immunantwort [135].

2.3.2.4 Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe

Obwohl bereits mehrere Untersucher lymphatische Follikel in der bronchialen Wand des Säugers beschrieben [154-156], waren es *Bienenstock et al.*, die 1973 erstmals subepitheliales lymphatisches Gewebe im Bronchialbaum des Kaninchens beobachteten. Ähnliche Ansammlungen lymphatischen Gewebes konnten sie auch bei anderen Säugern einschließlich des Menschen, aber auch beim Huhn beobachten, wobei beim Huhn am häufigsten germinale Zentren zu finden waren. Aufgrund der Nähe dieses lymphatischen Gewebes zum Hauptbronchus und seiner gleichzeitigen Ähnlichkeit zu den Peyer Plaques bzw. dem GALT gaben er ihm den Namen Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe [12, 157]. Beim Huhn findet sich das BALT an den Abgängen der kaudalen Sekundärbronchien [11] sowie im Bereich der Öffnungen der Luftsäcke [158]. Turbulenzen der Luftströmung, die während der Atmung in diesen Bereichen entstehen und somit zu einer erhöhten Antigenablagerung an diesen Abgängen führen, werden als Erklärung für die Entstehung des BALT in diesen Regionen gesehen [11]. Erste B- und T-Lymphozyten-Ansammlungen in der BALT-Region sind bereits am ersten Tag nach dem Schlupf zu finden [159]. Im Laufe der nächsten zwei Wochen sind IgM^+ -B-Zellen, CVI-ChNL-68.1^+ -Zellen und Keimzentren zu finden, die neben BCs auch immunkomplexspeichernde FDCs enthalten [144]. Im Alter von sechs bis acht Wochen sind auch erste IgG sowie IgA produzierende Plasmazellen in den GCs zu finden [159]. Im Laufe der

Organisierung der Lymphfollikel zeigt sich ein zonaler Aufbau, bei dem das Zentrum aus T-Lymphozyten besteht, während B-Zellen in der Peripherie zu finden sind [9, 11, 160]. In reifen BALT-Knoten kehrt sich die Zonierung um, sodass B-Lymphozyten im GC-Zentrum zu finden sind und kappenartig von CD4⁺-T-Zellen umgeben werden, wobei CD8⁺- Zellen v.a. im parafollikulären Gewebe zu finden sind [159].

2.3.2.5 Entwicklung des Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes

Untersuchungen an Mäusen und Kaninchen zeigten, dass BALT nicht durch Antigenstimulation entsteht, da es durchwegs auch bei SPF-gehaltenen Ratten und auch in subkutan transplantierten Mäuselungen nachgewiesen werden konnte, wenn auch im Vergleich zu konventionell gehaltenen Tieren zeitlich verzögert [12, 161, 162]. Das spricht dafür, dass es sich beim Säuger-BALT um ein konstitutives MALT handelt. Dennoch sehen andere Arbeitsgruppen zumindest die altersabhängige Entwicklung des BALT als antigeninduziert, da sich das LE wesentlich früher in konventioneller Haltung entwickelt [163]. Klinische Studien an Menschen weisen ebenfalls darauf hin, dass sich das BALT antigenabhängig entwickelt, da es nur unter pathologischen Bedingungen zu finden ist [129, 164]. Bei der Entwicklung des Hühner-BALT zeigte sich, dass dieses bei Puten und Hühnern im Gegensatz zum Menschen und ähnlich wie bei Kaninchen, Ratte und Maus ein konstitutives MALT zu sein scheint, da es sowohl regelmäßig unter konventionellen Haltungsbedingungen gefunden wurde [10, 11] als auch unter SPF-Bedingungen nachgewiesen werden konnte [159]. Andererseits zeigten Infektionsversuche mit *Bordetella avium* an Puten, dass die Anzahl und Ausdehnung der Lymphfollikel des BALT infektionsbedingt zunimmt [165]. Diese Ergebnisse ließen einige Arbeitsgruppen im aviären BALT einen Ersatz für die fehlenden Lymphknoten der Lunge vermuten [159]. Andererseits erscheint es möglich, dass auch im SPF-Umfeld genug Antigene vorhanden sind, um die BALT-Entwicklung anzuregen, sodass die Frage der antigenabhängigen Entwicklung weiterhin im Raum steht [166]. Insbesondere die Rolle des BALT bei der Immunantwort bleibt noch zu klären, da noch nicht verstanden ist, ob diese durch lokale oder durch eingewanderte antigenspezifische T- und B-Zellen erfolgt [15].

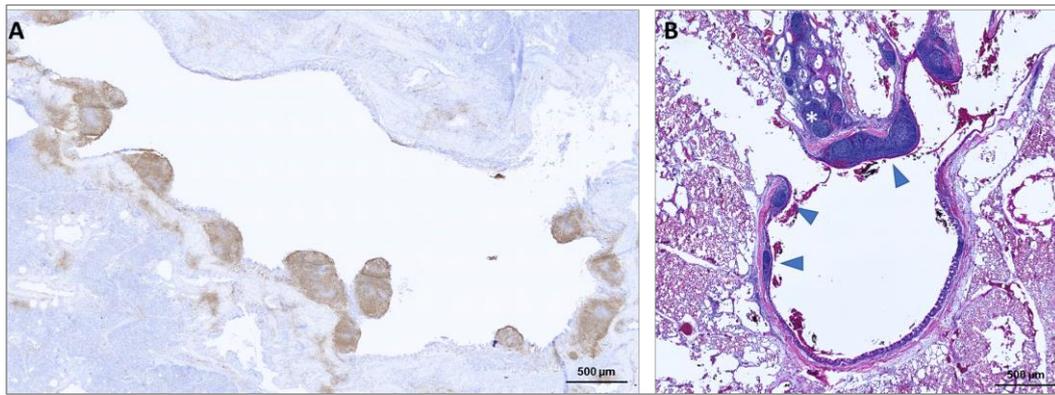


Abbildung 13: Hühner-BALT. **A:** Immunhistochemische Bu1-Färbung. Primärbronchus im Längsanschnitt eines zwei Monate alten Huhns mit Verteilung der BALT-Knoten (braun). **B:** Querschnitt des Primärbronchus mit BALT-Knoten (Pfeile) und extrabronchialem lymphatischem Gewebe in Form von lymphoiden Follikeln (*). HE, (Abb. A. Wilhelm).

3. Partikelaufnahme in der Hühnerlunge

In der Säugerlunge können Partikel durch $CD11c^+/CD11b^-$ -Makrophagen sowie $CD11b^+/CD11c^-$ -Granulozyten und $CD11c^+/MHC-II^+$ -DCs aufgenommen werden. Diese Zellen wandern in die regionären Lymphknoten aus, wo die Antigenpräsentation und Einleitung der Immunantwort stattfinden. Aufgrund der geringeren Verfügbarkeit an spezifischen APC- und Phagozyten-Markern und aufgrund der beim Huhn – im Vergleich zum Säuger – nicht-nachgewiesenen pulmonalen Lymphgefäße und Lymphknoten ist das Wissen über die Partikelaufnahme und den Ort der Induktion der pulmonalen Immunantwort begrenzt [1].

3.1 Partikelverteilung

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten die Ablagerung inhalierter Partikel in Abhängigkeit von ihrer Größe [167-169]. Nach Eingabe radioaktiv markierter Partikel mit einem Durchmesser von unter 1 µm bis 7 µm lokalisierten *Hayter* und *Besch* die Partikel mittels Szintillationsdetektor. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Partikel bis 3,7 µm im oberen Respirationstrakt durch Nase und Pharynx abgefangen werden, wohingegen Partikel mit einem Durchmesser von unter 1,1 µm die Lunge passieren und in den Abdominalluftsaack gelangen können. Partikel mit einer Größe von unter 0,3 µm folgten dem Luftstrom und verteilten sich in der gesamten Lunge einschließlich der kranialen Luftsäcke [167], was durch die besonderen Luftströmungsverhältnisse bei der Atmung der Vögel erklärt werden kann (s. 1.5.2). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen *Corbanie et al.*, indem sie die pulmonale Verteilung von 1–20 µm großen Partikeln an Hühnern verschiedenen Alters mithilfe einer Zerstäuberkammer untersuchten

[168]. Ein homologes Verteilungsmuster fanden auch *Tell et al.* durch eine Untersuchung an narkotisierten Tauben, bei der sie fluoreszierende Partikel mit einer Größe von 0,5–10 µm über Überdruckbeatmung in die Lunge einbrachten und deren Verteilung im Respirationstrakt anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop und (konfokalem) Scanning Laser Mikroskop darstellten. Im Gegensatz zu den anderen Untersuchern stellten sie jedoch fest, dass sich 1–3 µm große Partikel vor allem im Bereich des Primärbronchus an den Übergängen zu den Sekundärbronchien fanden [169], wo sich beim Huhn BALT findet [11]. *De Geus et al.* untersuchten zuletzt die Verteilung von immunogenen Partikeln nach intranasaler, intratrachealer und konjunktivaler Applikation. Nach Beschichtung von 1 µm durchmessenden Beads mit inaktiviertem *Newcastle-Disease-Virus* wurden diese intratracheal, intranasal oder auf das Auge appliziert und die Verteilung in den jeweils ortsansässigen APCs nach ein und sechs Stunden untersucht, indem Zellen aus den verschiedenen Geweben gewonnen, mithilfe von KUL01-, anti-MHC-II- und anti-CD40-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die höchste Anzahl von Beads nach intranasaler Applikation detektiert werden konnte. Ihr Anteil in der Lunge war insbesondere nach intranasaler Applikation am größten. Ca. 80 % der Beads⁺-Zellen ließen sich zu allen Zeitpunkten mit den oben genannten Markern anfärben, wodurch die postulierte Bedeutung des NALT bei der Einleitung der Immunantwort im oberen Respirationstrakt unterstrichen wird [135].

3.2 Zelluläre Abwehrmechanismen

3.2.1 Avian Respiratory Macrophages

Die Alveolarmakrophagen des Säugers liegen frei beweglich im Lumen der Alveolen und nehmen eine zentrale Rolle in der Phagozytose von inhalierten Antigenen ein [170, 171]. Auch beim Huhn wurden Makrophagen in der Lunge beschrieben, die als ARM – *avian respiratory macrophages* [172, 173] bzw. *free avian respiratory macrophages* (FARMS) bezeichnet werden [4]. Einige Forschungsgruppen konnten keine FARMS in der Vogellunge finden [62, 174–176]. Mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) konnten aber ortsansässige Makrophagen dargestellt werden, die an strategisch günstigen Punkten wie den Atrienwänden und Infundibula lokalisiert waren [175, 177, 178]. Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch freie Makrophagen mittels Lungenlavage nach vorheriger Immunstimulation durch Bakterien oder *Freund's Adjuvans*

gewinnen und somit die Existenz von FARMS nachweisen. So konnten *Toth und Siegel* beim Haushuhn $2,5 \times 10^5$ bzw. *Ficken et al.* bei der Pute $1,15 \times 10^6$ und *Maina und Cowley* bei der Felsentaube $1,6 \times 10^5$ Makrophagen gewinnen [173, 177, 179, 180]. Ob die beschriebenen subepithelial oder interstitiell im Bereich der Atrienwände und Infundibala lokalisierten Gewebsmakrophagen in der Lage sind, ohne inflammatorisches Milieu an die Oberfläche zu wandern, wurde ebenfalls kontrovers diskutiert. Durch aufeinander folgende Lungenlavage nach Immunstimulation konnte ein Anstieg der gewonnenen Zellzahl beobachtet werden [4]. Diese Anzahl der beim Huhn mittels Lavage gewonnenen FARMS ist verglichen mit der Anzahl gewonnener AMs bei den Kleinsäugetieren Maus, Ratte und Meerschweinchen ($0,55\text{--}1,55 \times 10^6$, $2,86\text{--}4,43 \times 10^6$ und $1,08\text{--}1,77 \times 10^7$) bis zu 71-fach kleiner ($2,5 \times 10^5$ vs. $1,77 \times 10^7$) [177]. Beim Menschen durchgeführte Bronchoalveolarlavage-Untersuchungen konnten zeigen, dass gleichaltrige Raucher eine höhere Anzahl an AM als Nichtraucher besitzen ($5,2 \times 10^7$ vs. $1,5 \times 10^7$) [181], was ebenfalls für eine Wanderung an die Oberfläche nach Immunstimulation spricht.

Die Ergebnisse beim Vogel zeigen, dass eine „allometrische Korrelation“ zwischen Körpergröße und Menge an Alveolarmakrophagen besteht, andererseits diese aber auch durch andere Faktoren wie Habitat bzw. Lebensführung (s. Mensch) beeinflusst wird [177]. Aufgrund dieser geringen Zahl bzw. dem Fehlen von FARMS [174-176] wird eine im Vergleich zum Säuger erhöhte Anfälligkeit der Vogellunge für respiratorische Infektionskrankheiten bzw. Schadstoffe aus der Luft postuliert und als ein wichtiger Faktor für die hohen Verluste durch respiratorische Infektionen beim Wirtschaftsgeflügel angesehen [173, 179]. *Maina et al.* führen an, dass die Knappheit von FARMS alleine nicht als Grund für eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Pathogenen und Schadstoffen angesehen werden kann. Dagegen sei die Komplexität der Vogellunge im Hinblick auf die Physiologie und Anatomie in Verbindung mit den Haltungsbedingungen ein wichtiger Faktor, der eine erhöhte Empfänglichkeit für Infektionen begünstigen kann [177].

3.2.2 Dendritische Zellen der Lunge

Dendritische Zellen finden sich neben einer diffusen Verteilung im Parenchym auch im FAE des BALT [1, 11]. Die Identifizierung einzelner DC-Linien bzw. die Unterscheidung zwischen Makrophagen und DCs beim Huhn gestaltet sich

schwierig, wie unter Kapitel 2.1.2 erwähnt. In jüngeren Untersuchungen gelang es, die pulmonalen APCs mithilfe einer Kombination aus Anfärbbarkeit durch Antikörper (KUL01, anti-CD11, DEC205) sowie der Verteilung und Azidität ihres Endosoms näher zu charakterisieren. Dabei konnten respiratorische DCs gefunden werden, die einen ähnlichen Phänotyp wie beim Säuger aufwiesen (MHC-II⁺, CD80⁺ und CD40⁻) und als effektive Aktivatoren von naiven T-Zellen bekannt sind. Dagegen ließ die Anfärbbarkeit von Zellen mit anti-CD11, KUL01 und anti-CD40 bei gleichzeitig vorhandenem, saurem Phagosom auf eine Makrophagenpopulation schließen. Zudem konnten Unterschiede in der Verteilung von KUL01⁺- bzw. CD11⁺- und DEC205⁺-Zellpopulation im Lungenparenchym festgestellt werden: bei allgemeiner Verteilung im interstitiellen Gewebe (Parabronchienwand und atrialen Septen) konnte eine hauptsächliche Verteilung DEC205⁺-Zellen in der Parabronchuswand festgestellt werden [1]. Um welche Zellen es sich dabei genau handelt, ist allerdings ebenso unklar wie die Wanderung dieser Population sowie Ort der Antigenpräsentation. Eine Hypothese ist die Einwanderung dieser DCs in das BALT und die dortige Präsentation lokaler Antigene. Da Erkenntnisse aus *in vitro*-Studien an aviären DCs bisher noch wenig Aufschluss über die verschiedenen DC-Subtypen in aviären lymphatischen Geweben geben [7], ist auch die Herkunft und Wanderung dieser DC-Subpopulation weiterhin wenig verstanden.

3.3 Follikelassoziertes Epithel

BALT der Hühnerlunge wird ähnlich wie das GALT durch ein follikelassoziertes lymphatisches Epithel überzogen, das keine Becherzellen besitzt, jedoch teilweise zilientragende Epithelzellen und zahlreiche Lymphozyten, u. a. Makrophagen, Heterophile und DCs enthält [11, 182]. Die Frage nach der Existenz von M-Zellen im BALT von Huhn bzw. Pute kann jedoch nicht eindeutig beantwortet werden. Bereits *Bienenstock et al.* beschrieben beim Huhn fingerartige mukosale Projektionen des Lymphoepithels über dem BALT des Huhns [157] und *Fagerland und Arp* konnten im FAE des BALT nicht-zilientragende, mit irregulären Mikrovilli ausgestattete Zellen mit morphologischem Bild einer M-Zelle finden [11]. Auch in jüngeren TEM-Untersuchungen konnten Zellen an den Übergängen von Primärbronchus zu Sekundärbronchien dargestellt werden, die morphologische Ähnlichkeit mit M-Zellen besitzen [9]. Eine Beteiligung dieser Zellen an der Antigenaufnahme konnte jedoch nicht nachgewiesen werden,

sodass dem BALT eine Rolle bei Reparaturmechanismen des Gewebes zugesprochen wurde [10, 11]. Untersuchungen mit intratrachealer bzw. intra-bronchialer Tuscheapplikation beim Kaninchen zeigten keine Aufnahme der Tusche durch das BALT-Epithel, wohl aber durch Lungenmakrophagen [157]. Im Gegensatz dazu konnte für das BALT von Ferkeln und Kälbern gezeigt werden, dass intratracheal applizierte Tusche mit zunehmender Expositionsdauer immer tiefer im BALT zu finden ist und nach 24 Stunden schließlich auch in den subepithelial gelegenen Makrophagen beobachtet werden konnte [170]. Auch andere Untersucher zeigten durch intratracheal applizierte Meerrettichperoxidase an Ratten, dass spezifische, mikrovillitragende Zellen im BALT-FAE in der Lage sind, Antigen aufzunehmen und an das BALT weiterzuleiten. Jedoch unterscheidet sich die besondere Morphologie der aufnehmenden Zellen im BALT-Epithel von den M-Zellen des GALT, weshalb eine eindeutige Charakterisierung erschwert wird [183, 184].

Beim Hausgeflügel Pute und Huhn wurde die Eingabe von Tusche an MALT-Gewebe wie z. B. dem CALT [146, 185] oder der Bursa Fabricii [186] ebenso wie am Dottersack bzw. dem MD [187] durchgeführt. Dabei zeigte sich bei lichtmikroskopischer Untersuchung, dass die Kohlenstoffpartikel aus der Tuschesuspension mit zunehmender Dauer immer tiefer im Gewebe zu finden sind. *Fix und Arp* stellten nach konjunktivaler Applikation von Ferritin, Tusche und Latex-Beads an Puten fest, dass diese Partikel nach 30 Minuten durch das LE des CALT aufgenommen werden und mit zunehmender Einwirkdauer auch in subepithelialen Makrophagen beobachtet werden können [185]. *Fagerland et al.* zeigten am Beispiel von Ferritin und *Bordetella avium*, dass auch das FAE des BALT von Puten in der Lage ist, Partikel über Endozytose aufzunehmen [188]. Kürzlich durchgeführte Versuche mit intratracheal applizierten, fluoreszierenden bzw. LPS-konjugierten Beads zeigten, dass diese im BALT wiedergefunden werden können [1]. Die Aufnahme der Antigene könnte dabei durch APCs erfolgen, die daraufhin T-Zellen aktivieren und eine Immunantwort einleiten, wie es zuletzt für den Säuger gezeigt werden konnte [189]. Die genaue Bestimmung der aufnehmenden Zellen des aviären BALT-FAE fällt beim Vogel aufgrund der erwähnten unterschiedlichen Morphologie und des Aufnahmeverhaltens im Vergleich zum FAE des CALT oder GALT schwer, sodass die Rolle des aviären BALT bei der lokalen Immunantwort der Lunge weiterhin zu klären bleibt [13, 15].

3.4 Atrienepithel

Die Atrien stellen Ausbuchtungen der Parabronchien dar, die in das Infundibulum übergehen, welches sich wiederum seinem Namen entsprechend trichterartig verjüngt und in die Luftkapillaren mündet. Die Atrien sind voneinander durch Bindegewebssepten – den atrialen Septen – getrennt, die an ihrem apikalen Ende eine Verdickung aus glatter Muskulatur aufweisen [190]. Untersuchungen der Epithelauskleidung der Atrien zeigten, dass es sich dabei um squamöse, mikrovillitragende Epithelzellen handelt. Diese werden von einer Schicht aus im Inneren der Zellen gebildeten, sogenannten trilamellären Substanz bedeckt [176, 191]. Das Epithel geht an der Atrienbasis in das flachere Epithel des Infundibulums über, das kaum noch Mikrovilli aufweist [178]. *Klika et al.* beobachteten bereits vor ca. 20 Jahren, dass das Atrienepithel Einschlüsse im Zytoplasma aufweist, die vermutlich Partikel aus der Atemluft beinhalten und diese über Vesikel an Makrophagen weiterleiten, die im Interstitium des Atrienbodens lokalisiert sind [175]. Die gleiche Beobachtung konnte auch nach Eingabe von Eisenpartikeln in die Lunge gemacht werden, die durch das Atrienepithel aufgenommen und an darunter liegende Makrophagen weitergeleitet wurden [174]. Obwohl auch andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass Fremdartigen und auch Erythrozytenextravasate durch die Atrienepithelien aufgenommen werden können [4], sind der Mechanismus der Partikelaufnahme und die Bedeutung der Atrienepithelien bei der Immunabwehr der Vogellunge bis heute weiterhin unklar. Die Tatsache, dass ca. 70 % des Oberflächenepithels der Hühnerlunge zur Phagozytose bzw. Endozytose befähigt ist, suggeriert jedoch bei gleichzeitig diskutierter Abwesenheit von Oberflächenmakrophagen (s. Kap. 3.2) im Normalzustand sowie nicht darstellbaren Lymphgefäßen eine wichtige Rolle bei der Antigenaufnahme [4]. Auch der trilamellären Substanz wird neben der stabilisierenden Funktion der Atrienräume eine wichtige Rolle beim Einfangen von Antigenen aus der Atemluft zugesprochen [174].

Anhand von lektinhistochemischen Untersuchungen am Huhn konnte gezeigt werden, dass die Atrienepithelien im Vergleich zum restlichen Lungenparenchym vermehrt zuckerhaltige Oberflächenstrukturen aufweisen, die wahrscheinlich die Adhäsion von Mikroorganismen in diesen Bereichen unterstützen soll [192]. Neuere Untersuchungen von *de Geus et al.* zur vergleichenden Verteilung und -aufnahme *Newcastle Disease Virus (NDV)*-gekoppelter und ungekoppelter Beads liefern Hinweise darauf, dass das Lungenepithel für die unspezifische Aufnahme

von Antigenen verantwortlich ist. Diese Beobachtung, gemeinsam mit der Tatsache, dass das Atrienepithel einen großen Anteil an der Gesamtoberfläche der Lunge ausmacht, könnten eine Erklärung dafür liefern, weshalb nicht-immunogene Partikel wesentlich schneller als immunogene (NDV-gekoppelte) Partikel aufgenommen werden, da letztere erst über spezifische Rezeptoren antigenpräsentierender Zellen erkannt und internalisiert werden müssen [135].

3.5 Infektionsmodelle

Um die pulmonale Immunantwort des Vogels zu untersuchen, werden häufig Infektionsmodelle angewandt, um die Verteilung des Pathogens und die lokale und systemische Immunantwort zu untersuchen [3, 13, 193]. Eines der verwendeten Mikroorganismen stellt das *Newcastle-Disease-Virus* dar, der Erreger der Atypischen Geflügelpest. Dabei handelt es sich um eine für Hühner und Puten hochkontagiöse Erkrankung, die insbesondere bei den Hühnern eine große wirtschaftliche Bedeutung besitzt und deren Bekämpfung gesetzlich reguliert wird. Es ist ein *aviäres Paramyxovirus (APMV, Serotyp 1)* und gehört als behülltes Einzelstrang-RNA-Virus zur Familie der *Paramyxoviridae* [194]. Die klinischen Symptome können je nach Virulenz des Virusstamms variieren und reichen von Apathie und abfallender Legeleistung bis hin zu neurologischen oder respiratorischen Symptomen oder zum Tod. Die NDV-Impfung ist durch die „*Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit*“ vorgeschrieben. Impfstoffe sind in Form von attenuierten, lentogenen Virusstämmen oder Inaktiv-Vakzinen möglich. Die Lebend-Vakzinen ermöglichen die Impfung des Bestandes als Spray oder über das Trinkwasser, während Inaktiv-Vakzinen subkutan oder intramuskulär injiziert werden müssen [195]. Ein bekannter Impfvirusstamm ist u. a. *APMV-1 LaSota*, der als Lebend-Vakzine eingesetzt wird und über den Kot ausgeschieden wird [2, 194]. Experimentelle NDV-Vakzinierungen kamen für die Genexpressionsanalyse im Rahmen der lokalen pulmonalen Immunabwehr beim Huhn zum Einsatz. Diese ergab 10 Tage nach konjunktivaler Impfung mit dem Lebendimpfstoff einen Anstieg der Genexpression von CD8⁺- und Bu1⁺-Zellen sowie von IgA u. a. in der Lunge [3]. Auch immunhistochemisch konnte eine sichtbare Zunahme CD4⁺-Zellen in der HG im Vergleich zu den Kontrolltieren gezeigt werden. In der Lunge war dieser Anstieg allerdings weniger deutlich und es erfolgte keine differenzierte Betrachtung des BALT bzw. Parenchyms.

Auch Infektionsversuche mit Bakterien wurden an der Vogellunge durchgeführt [158, 165, 188]. Dabei kam u. a. *Escherichia coli* (*E. coli*) zum Einsatz, ein Gram-negatives Bakterium, das sowohl gastrointestinale als auch systemische Infektionen verursacht und ebenfalls eine große, wirtschaftliche Bedeutung besitzt [196]. *Myers et al.* wiesen *E. coli* nach experimenteller Infektion bis zum Tag sieben nach Infektion in der Lunge nach und versuchten, die Persistenz durch ein ineffektives Abtöten der Bakterien durch pulmonale Phagozyten zu erklären [158]. Der Fokus lag bei diesen Untersuchungen vor allem auf den pathologischen Veränderungen der Lunge [197] oder der Reaktion des BALT und weniger auf den pulmonalen Phagozytosebereichen und der Charakterisierung der Phagozyten.

3.6 Dreidimensionale Rekonstruktionen von Gewebestrukturen

Bildgebende Untersuchungsmethoden wie die Echosonographie, Röntgen, Magnetresonanztomographie oder Computertomographie aber auch die Histologie erlauben die Untersuchung von Gewebe entlang virtuellen Schnittebenen in Form von zweidimensionalen Bildern. Das Verständnis der dreidimensionalen Struktur ist für klinische – insbesondere chirurgische – Fragestellungen wichtig, vor allem bei schwer zugänglichen oder komplexen Strukturen, wie z. B. Blutgefäßen, Gelenken, aber auch beim Nasen-Rachen-Raum [198-200]. Durch spezielle Programme kann eine auf virtuellen, zweidimensionalen Schnittbildern basierende dreidimensionale (3D) Rekonstruktion durchgeführt werden und somit z. B. chirurgische Eingriffe durch ein besseres anatomisches Verständnis erleichtern. Auch für Lehrzwecke eignen sich 3D-Rekonstruktionen, um schwer zugängliche Strukturen in ihrer anatomisch korrekten Position und ihrem Zusammenhang, wie z. B. beim Situs oder bei komplexen Gefäß- und Nervenstrukturen, zu verstehen [201, 202].

III. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Über die Abwehrmechanismen der Hühnerlunge wurde viel geforscht und einige neue Erkenntnisse wurden gewonnen. Bisher ist jedoch nach wie vor unklar, wo die Induktion der Immunantwort auf inhalierte Antigene stattfindet und wo die Effektorzellen lokalisiert sind. Angesichts der beim Huhn fehlenden Lymphknoten und bisher nicht nachweisbaren Lymphgefäßen in der Lunge sowie des unterschiedlichen Aufbaus und Aufnahmeverhaltens des follikelassoziierten Epithels des BALT fällt es schwer, die immunologischen Vorgänge in der Vogellunge zu verstehen. Die Knappheit an spezifischen und konventionell-histologisch anwendbaren monoklonalen Antikörpern erschwert die histologische Identifizierung der für die Einleitung der Immunantwort wichtigen antigen-präsentierenden Zellen. Im Verhältnis zur Gesamtoberfläche der Lunge bzw. der potentiellen Kontaktfläche mit Antigenen, macht das BALT nur einen geringen Anteil aus. Gleichzeitig sind freie Makrophagen in geringerer Zahl als beim Säuger nachzuweisen, sodass die Vermutung nahe liegt, dass auch das Atrieneithel eine wichtige Funktion bei der pulmonalen Abwehr besitzt. Bessere Kenntnisse über die Entstehung einer Immunantwort nach lokalem Antigenkontakt – insbesondere über den Ort der Antigenpräsentation in der Lunge – können zu einer Verbesserung der Impfstrategie und zu einer besseren Kontrolle von Infektionskrankheiten beim Geflügel beitragen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Partikelaufnahme und den -abtransport in den verschiedenen Kompartimenten der Hühnerlunge auf Basis eines *post mortem*-Versuchsmodells histologisch unter Verwendung unterschiedlicher Partikel darzustellen. Die phagozytierenden Zellen sollen dabei sowohl morphologisch als auch immunhistochemisch charakterisiert werden. Die antigenspezifische Immunantwort in den einzelnen Lungenkompartimenten wird dabei im Rahmen einer Impfung mithilfe von Genexpressionsanalysen näher betrachtet und in Kontext mit den histologischen Befunden gesetzt.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Tiere

Es wurden Eier der Hühnerlinien M11 (B^{2/2}-Haplotyp) aus dem Institut für Tierzucht in Mariensee und LSL (*Lohmann's Selected Leghorn*) der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven verwendet. Die Bebrütung und Aufzucht erfolgte unter Standardbedingungen in der Tierversuchshaltung des Lehrstuhls für Tierphysiologie (behördliche Genehmigung nach § 11 Tierschutzgesetz: KVR-I/221-TA008/17-Ma; Inst.-Nr. 01-17a). Die Tiere wurden in kleinen Gruppen in Volieren gehalten, erhielten kommerzielles Alleinfuttermittel und Wasser ad libitum. Die Tiere aus der Impf- bzw. Kontrollgruppe wurden in räumlich getrennten Volieren gehalten. Die Tötung wurde durch eine nach VO (EG) Nr. 1099/2009 bzw. der Tierschutz-Schlachtverordnung (TierSchlV) sachkundige Person durchgeführt, indem die Tiere gemäß der TierSchlV durch Kopfschlag betäubt und unmittelbar danach entblutet wurden.

2. Histologie

Den Tieren wurden Partikel in Form einer Suspension aus Tusche oder Latex-Beads bzw. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) nach unterschiedlicher Verdünnung bzw. Verarbeitung über die Trachea appliziert und die Lunge nach unterschiedlicher Einwirkdauer entnommen und histologisch bzw. immunhistochemisch untersucht. Die Applikation fand maximal 10 min *post mortem* (p. m.) statt, da Infektionsversuche an kultivierten Lungenscheiben zeigten, dass das Gewebe p. m. Vitalitätszeichen zeigt, die bei entsprechender Kultivierung bis zu eine Woche p. m. beobachtet werden können [193, 203]. Um zu analysieren, ob die Zellen bei dem hier angewandten Versuchsmodell zum Zeitpunkt der Partikelapplikation noch vital waren, wurde eine Lebend-Tot-Färbung mithilfe von Neutralrot durchgeführt. Dieses wird durch Phagozytose in die Lysosomen aufgenommen und ist in Form von dunkelroten Granula im Zytoplasma zu erkennen [204, 205]. Aufgrund der unterschiedlichen Partikel musste die Applikationsmethode an die jeweilige Partikelsuspension angepasst werden. Auf die Applikationsart wird daher separat bei den einzelnen Partikeln eingegangen. Für die Weiterverarbeitung und histologische Aufarbeitung der Lunge kamen je nach Fragestellung unterschiedliche Fixier- und Einbett-Techniken zum Einsatz, u. a. um die Antigenität im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen

zu erhalten. Diese Methoden werden im entsprechenden Kapitel genauer beschrieben.

2.1 Neutralrot-Färbung

2.1.1 Materialien

Für die Applikation:

- Heidelberger Verlängerung (75 cm, Luer-Lock-Anschluss)¹
- 50 ml Spritze¹
- Knopfkanüle
- Arterienklemme zum Abklemmen der Heidelberger Verlängerung
- Ständer aus Metall zum Fixieren des Tieres

Zellkulturflaschen (NuncTM EasYFlaskTM 75 cm²)²

Neutralrot-Suspension^{3,4} (für Zellkultur: 3, zum Füllen der Lunge: 4)

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2

- 8,0 g Natriumchlorid³
- 1,45 g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)³
- 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)³
- 0,2 g Kaliumchlorid (KCl)³
- ad 1000 ml Aqua dest.

Phosphatgepufferte 4%ige Formaldehydlösung⁴

Für die Herstellung von Gefrierschnitten:

- Agarose Low Melt (Roti[®]garose)⁴
- Einbettformen, rechteckig
- Tissue-Tek[®] O.C.TTM Compound⁵
- Flüssiger Stickstoff
- 2-Methylbutan⁴
- Mikrotomklingen (MX35)²
- Adhäsionsobjektträger (SuperFrost[®] Plus)²
- Kaisers Glycerin-Gelatine⁶
- Deckgläser⁴
- Klarer Nagellack

2.1.2 Applikation

Zur Überprüfung der Zellvitalität nach der Schlachtung wurde zunächst einem Tier kurze Zeit p. m. eine Neutralrotsuspension auf die gleiche Weise über die

Trachea eingegeben, wie für die spätere Applikation der verschiedenen Partikel. Dazu wurden kurz vor dem Versuch 100 mg Neutralrotpulver in 100 ml PBS gelöst, in eine 50 ml-Spritze aufgezogen und bis zur Applikation im Wärmeschrank bei 50 °C gelagert. Für die tracheale Applikation wurde die Luftröhre zunächst im kranialen Drittel nach Entfernung der Haut freigelegt und durch eine Inzision so weit eröffnet, sodass die Heidelberger Verlängerung (HV) eingeführt und vorsichtig bis knapp vor die Syrinx vorgeschoben werden konnte. Die HV wurde durch einen Ligaturfaden in Position gehalten und das Tier anschließend an den Ständern fixiert, sodass Hals und Kopf gerade nach unten zeigten. Unmittelbar vor der Applikation wurde die Spritze aus dem Wärmeschrank genommen und 50 ml der vorgewärmten Neutralrotsuspension über die in der Trachea positionierte HV unter konstantem, sanftem Druck in die Lunge appliziert. Die HV wurde in Position belassen und mithilfe einer Arterienklemme verschlossen, um einen Rückfluss der eingegebenen Flüssigkeit zu verhindern.

2.1.3 Fixierung

Nach fünfminütiger Einwirkzeit wurde die Flüssigkeit mithilfe der in Position belassenen 50 ml-Spritze zurückgewonnen und durch 50 ml 4%igen Formaldehyds ersetzt. Die HV wurde erneut mit einer Arterienklemme verschlossen, die Spritze in Position belassen und das Fixans eine Stunde im an den Ständern hängenden Tier belassen. Durch die Fixierung wurde die Aufnahme der Neutralrotsuspension gestoppt. Mit der *in situ*-Fixierung wurde die Lunge ihrer natürlichen Lage entsprechend in aufgespanntem Zustand konserviert und lieferte bei der anschließenden Schnittanfertigung und mikroskopischen Betrachtung offenstehende Atrien sowie Luftkapillarlumina und dadurch – gerade im Hinblick auf die Lage der Partikel – eine gut beurteilbare Partikelverteilung. Nach Ablauf der Fixierdauer wurde die Fixierlösung mithilfe der 50 ml-Spritze aus der Lunge und den Luftsäcken abgezogen und die HV entfernt.

2.1.4 Agaroseapplikation in die Lunge

Für die Durchführung von immunhistochemischen Färbungen wurde die Lunge statt mit dem Fixans mit 50 ml einer wie unten angegeben hergestellten Agarosesuspension *in situ* gefüllt. Indem die Agarose die Luftwege füllt und sich bis in die Luftkapillaren verteilt, wird das Kollabieren der Lunge bei der

Entnahme minimiert und sowohl die Morphologie als auch Antigenität des Lungengewebes erhalten. Diese im Folgenden beschriebene Technik wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Vorarbeit an der Hühnerlunge getestet und erfolgreich angewandt [9]. Für die Beurteilung der Lage der applizierten Partikel war ein guter morphologischer Erhalt unentbehrlich, sodass die Lunge für die Herstellung von Gefrierproben vor der Entnahme mit Agarose gefüllt wurde. Die Füllung der Lunge mit Agarose kam bei der Neutralrot-Applikation zum Einsatz, um die Kompatibilität der Methodik mit der histologischen Beurteilung der Partikelaufnahme vorab zu testen.

Die Agaroseeingabe fand über eine HV und Spritze am kopfüber hängenden Tier statt, wie unter Kapitel 2.1.2 beschrieben. Vor der Applikation der Agarose wurde die ventrale Bauchwand eröffnet und der Magen-Darm-Trakt soweit möglich herausgelagert, bis freie Sicht auf das kaudale Lungenende gewährleistet war. Die kaudale Luftsackgruppe wurde durch eine Stichinzision eröffnet, um den Überdruck während der Agaroseapplikation auszugleichen und Gewebereißungen zu verhindern. Die Vorverlagerung des Magen-Darm-Traktes beschleunigte das Abkühlen des Tierkörpers und somit das Gelieren der Agarose. Zum Einsatz kam eine Low Melt Agarose (*Roti[®]garose*), die durch ihre geringe Geliertemperatur von 24–28°C ihre Fließeigenschaft bei Körpertemperatur beibehält. In den Versuchen dieser Arbeit hat sich eine 3%ige Agarose-PBS-Suspension bewährt. Dazu wurden 3 g des Agarosepulvers abgewogen und unter Erhitzung in der Mikrowelle in 100 ml PBS gelöst. Die Agarose wurde mit einer vorgewärmten Kanüle und 50 ml Spritze aufgezogen und diese zusammen mit einer Heidelberger Verlängerung bis zum Einsatz im Wärmeschrank bei 43 °C gelagert. Je nach Tiergröße wurden 50–60 ml dieser 3%igen Agarosesuspension über die Trachea in die Lunge appliziert, bis sich ein sichtbarer Flüssigkeitsspiegel über der Lunge gebildet hatte, was über die kaudal eröffnete Körperhöhle kontrolliert wurde. Die Kanüle wurde währenddessen mithilfe eines Ligaturfadens in ihrer Position gehalten und die Trachea anschließend nach Entfernung der Kanüle mit diesem ligiert. Je nach Größe des Tieres erfolgte anschließend eine ein- bis zweistündige Kühlung über Kopf hängend bei 4 °C in einem Kühlraum, bis der Gelpunkt der Agarose erreicht war. Erst nach vollständiger Verfestigung der Agarose wurde der Brustkorb eröffnet, um ein Herausfließen der Agarose zu verhindern.

2.1.5 Probenentnahme

Für die Entnahme wurden die Rippen auf Höhe der Synchondrosis intercostalis und die Schultergürtelknochen sowie die Brustmuskulatur durchtrennt, sodass das Sternum angehoben werden konnte und die Thoraxhöhle frei zugänglich war. Nach Ligation und Durchtrennung der Hohlvenen und der Aorta bzw. des Ösophagus wurden Herz, Ösophagus sowie Leber und Magen-Darmtrakt nach kaudal verlagert, um beide Lungenhälften darzustellen. Die beiden Lungenhälften wurden zunächst vorsichtig lateral von den Rippen und medial von der thorakalen Wirbelsäule gelöst, bis die Lunge von dorsal erreichbar war und auch dort von den Rippen gelöst und herauspräpariert werden konnte. Die Lungen wurden anschließend in vier, bei großen Tieren in fünf gleichmäßige Transversalscheiben geschnitten (s. Abbildung 14). Die Sulci costales dienten dabei als Orientierung für die Unterteilung.

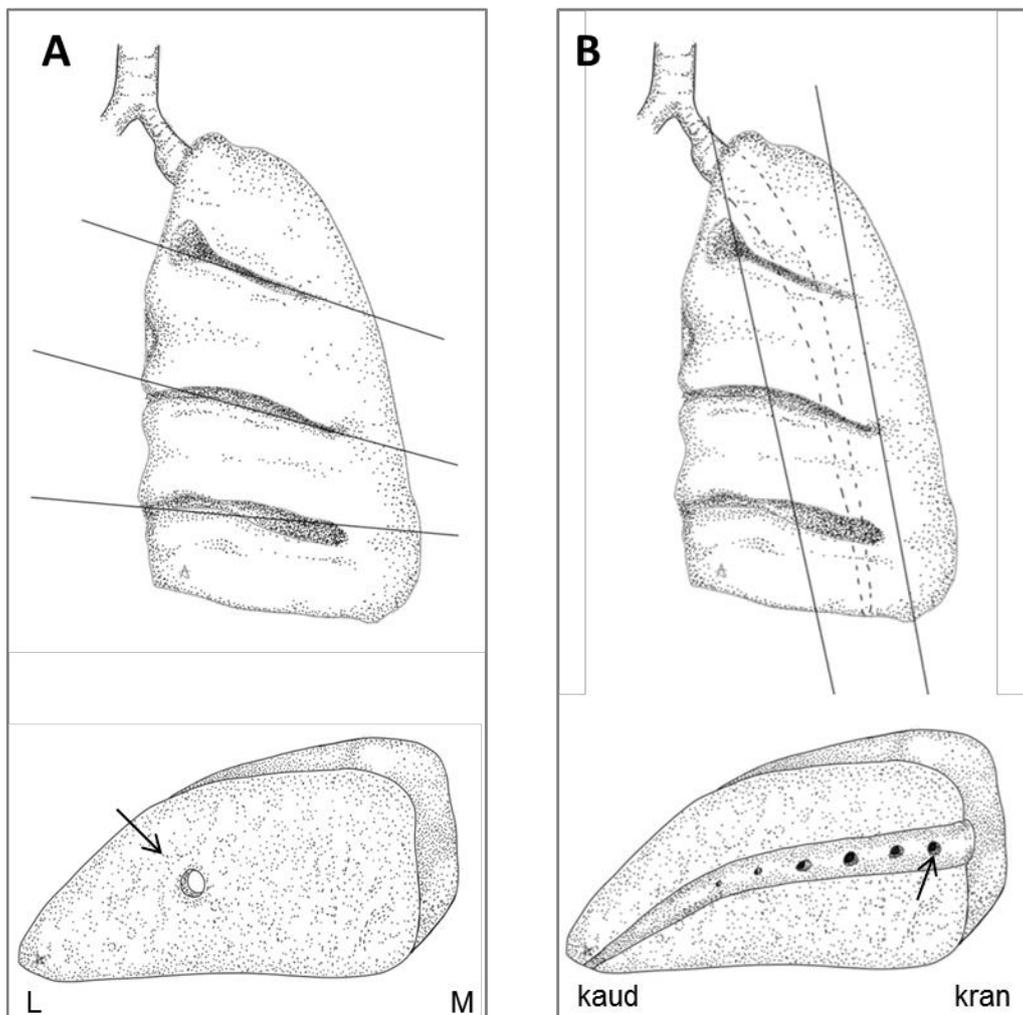


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Probenentnahme. **A:** Herstellung von Transversalscheiben, Pfeil: Primärbronchus. **B:** Herstellung von Längsscheiben, Pfeil: Sekundärbronchien-Abgänge vom Primärbronchus, M = medial, L = lateral (Abb. A. Wilhelm).

2.1.6 Einbettung der Lunge nach Agaroseapplikation

Die Lungenscheiben wurden je mit der kranialen Seite nach unten zeigend in Plastikförmchen gelegt und in Tissue-Tek[®] O. C. T. (*Optimal Cutting Temperature*) Compound eingebettet. Anschließend wurden die Proben mithilfe von 2-Methylbutan bei -80 °C eingefroren, luftdicht verpackt und bei -80 °C bzw. kurzfristig bei -20 °C gelagert.

2.1.7 Schnitthanfertigung

Die Schnitthanfertigung erfolgte mit dem CryoStar[™] NX70 Kryostat der Firma Thermo Scientific[™]. Die Boxtemperatur wurde auf -18 °C und die Objektstichtemperatur auf -16 °C eingestellt. Nach Orientierung anhand von Probeschnitten und einer Hämalaun-Färbung wurden im Bereich des BALT 20 Serienschritte mit einer Schnittdicke von je $7\text{ }\mu\text{m}$ hergestellt. Um einen Überblick über die Verteilung der Partikel im Parenchym zu gewinnen, wurden zusätzlich stichprobenartig Schnitte aus dem Parenchymbereich in unterschiedlicher Probentiefe hergestellt, indem im Abstand von jeweils ca. 1–2 mm 20 Serienschritte abgenommen wurden. Die Schnitte wurden auf Adhäsionsobjektträger aufgezogen (SuperFrost[®] Plus) und vor der Weiterverarbeitung 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie kurz in destilliertes Wasser getaucht und in noch leicht feuchtem Zustand auf einer Wärmeplatte bei 37 °C mit Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckt. Nach dem Verfestigen der Gelatine wurde das Deckgläschen mit klarem Nagellack umrandet, um die Schnittpräparate haltbarer zu machen. Die Schnitte wurden anschließend mit einer Olympus XC10-Kamera eines Olympus BX51-Mikroskops fotografisch dokumentiert. Als Positivkontrolle dienten Human Embryonic Kidney-Zellen (HEK-293T). Diese erhielten $400\text{ }\mu\text{l}$ der Neutralrotsuspension und wurden über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag 10 Minuten bei $225 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und mit PBS gewaschen. Nach erneutem Abgießen des Überstands wurden zwei Tropfen der Lösung auf einen Objektträger verbracht und fotografisch dokumentiert.

2.2 Tuscheversuche

Für die Füllung der gesamten Lunge mit der Tusche kamen verschiedene Verdünnungsstufen einer Tusche-PBS-Suspension zum Einsatz. Ziel war es, die optimale Konzentration zu ermitteln, bei der die Verteilung im Gewebe gut

untersucht werden konnte. Dazu wurden Konzentrationen von 1:10 bis 1:1000 getestet. Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Aufnahme untersucht, wie Einwirkdauer, Einsatz unterschiedlicher Tusche, das vorherige Waschen der Tusche und die Applikationslokalisation, d. h. Füllung der ganzen Lunge versus lokale Applikation im kaudalen Primärbronchus. Bei der Begutachtung der histologischen Schnittpräparate erwies es sich als sinnvoll, verschiedene Färbungen und Fixiermethoden zu testen, da die Tusche je nach Färbung und Fixierung unterschiedlich gut sichtbar war. Die untenstehende Tabelle gibt eine Übersicht über die Einzelversuche der Tusche-Applikation (Tabelle 1).

2.2.1 Material

Für die Applikation und Füllung der gesamten Lunge: s. Kap. 2.1.1

Für die lokale Applikation zusätzlich:

- DCT Absaugkatheter¹
- 1 ml-Spritze¹

Winsor & Newton black indian ink⁷

Pelikan Nr. 17 Tusche A, Drawing Ink⁸

PBS pH 7,2 (s. 2.1.1)

50 ml Falcon⁹

Tusche-PBS-Suspension

- 5 ml Tusche^{7/8}
- Ad 50 ml PBS pH 7, 2

Für die Agarose-Applikation und Gefrierschnitt-Herstellung: s. Kap. 2.1.1

Bouin-Lösung

- 150 ml gesättigte, wässrige Pikrinsäure³
- 50 ml phosphatgepufferte 40%ige Formaldehydlösung⁶
- 10 ml Essigsäure⁴

Einbettkassetten¹⁰

Aufsteigende Alkoholreihe

- 2 x 70%iges Ethanol¹¹
- 2 x 96%iges Ethanol¹¹
- 2 x Isopropanol¹¹
- 2 x Xylol¹²

- Paraffinreihe
- Paraffin Typ 1²
- Paraffin Typ 2²
- Paraffin Typ 6²
- Paraffin Typ 9²
- Paraplast^{®4}

Für Kunstharzeinbettung:

- Technovit[®] 7100-Kombipack bzw. Technovit[®] 8100-Kombipack¹³
500 ml Basislösung, 5 x 1 g Härter I, 40 g Härter II
- Anmischbecher mit kunststoffbeständiger Innenbeschichtung und Holzspatel¹³
- Einbettformen aus Teflon mit Edelstahlboden (Histoform Q)¹³
- Histobloc[®] für Einbettformen zum Einspannen in das Mikrotom¹³
- Technovit[®] 3040¹³

Färbelösungen

- Mayers Hämalaunlösung⁶
- Eosin⁶
- Kernechtrot-Aluminiumsulfat¹⁴
- Lichtgrün¹⁴

Einbett- und Eindeckzubehör

- Objektträger⁴ und Adhäsionsobjektträger (SuperFrost[®] Plus)²
- Eindeckmedium Eukitt^{®6}
- Deckgläser⁴

2.2.2 Füllung der gesamten Lunge

Bei den Tuscheversuchen war es wie bei der Applikation von Neutralrot möglich, ein großes Volumen herzustellen und die gesamte Lunge damit schnell zu füllen, sodass die Partikelaufnahme im gesamten Parenchym stichprobenartig untersucht werden konnte (s. Kap. 2.1.7). Sofern gewaschene Tusche zum Einsatz kam, wurden 5 ml der Tuschesuspension in 20 ml PBS gelöst und zweimal 30 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das entstandene Tusche pellet in 50 ml PBS resuspendiert, sodass sich eine 10%ige Lösung ergab. Bei den Applikationsversuchen ohne vorheriges Waschen, wurde die benötigte Menge Tuschesuspension mit PBS gemischt, sodass sich die jeweils gewünschte Konzentration ergab (s. Tabelle 1). Das Tusche-PBS-Gemisch wurde kurz vor

dem Versuch angemischt, im Wärmeschrank bei 50 ° C gelagert und unmittelbar vor der Applikation in ein Ultraschallbad verbracht. Mit einer bei 50°C vorgewärmten 50 ml-Spritze wurden 50 ml der Tusche-PBS-Suspension aufgezogen und kurze Zeit p. m. am kopfüber hängenden Tier über die Trachea appliziert. Die Einwirkzeit variierte jeweils in den Einzelversuchen und betrug zwischen fünf und 60 Minuten (s. Tabelle 1). Das Vorgehen bei der Applikation sowie das Aspirieren der Tuschesuspension nach Ende der Einwirkzeit erfolgte wie unter Kapitel 2.1.2 und 2.1.3 beschrieben.

2.2.3 Lokale in situ-Applikation

Diese Applikationsmethode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erarbeitet. Sie wurde zum einen für die Applikation von Latex-Beads und FITC verwendet, da von diesen Partikelsuspensionen keine großen Volumina hergestellt werden konnten. Durch die gezielte Applikation in den mittleren und kaudalen Bereich des Primärbronchus konnte die Partikelaufnahme durch das BALT und des direkt umgebenden Parenchyms gut beurteilt werden, ohne dass es zu einem Konzentrationsverlust am Zielort kam. Zum anderen war es für die Beads-Versuche notwendig, bei der Entwässerung des Gewebes keine xylohaltigen Lösungsmittel zu verwenden, um das Auflösen der Beads zu vermeiden [206]. Dafür erwies sich Technovit[®] 7100 als geeignet. Dabei handelt es sich um einen für die Histologie entwickelten, kaltpolymerisierenden Drei-Komponenten-Kunststoff zum Einbetten verschiedener glatter oder poröser Proben auf HEMA-Basis (2-Hydroxymethylacrylat), auch als Glycolmethacrylat (GMA) bekannt (Heraeus Kulzer). Es zeichnet sich durch eine sehr gute Infiltration poröser Gewebe, einen sehr guten Erhalt der Morphologie und eine gute Schneidfähigkeit aus, die eine Anfertigung von bis zu 1 µm-dünnen Schnitten ermöglicht. Dadurch sind Zellmorphologie und Zellgrenzen gut erkennbar, sodass sich die Lokalisation der Partikel gut beurteilen ließ. Da an kunstharzeingebettetem Gewebe auch immunhistochemische Färbungen beschrieben sind [207-209], die Schnitte jedoch im Vergleich zu den Gefrierschnitten einen besseren Morphologiegehalt gewährleisten, kam diese Technik auch im Rahmen der Tuscheversuche zum Einsatz. Ein Nachteil des GMA ist das verhältnismäßig aufwendige Einbett- und Schneidverfahren. Durch die sehr dünnen Schnitte ist das Aufarbeiten einer eingebetteten Lunge sehr zeitaufwendig und eignet sich daher für kleine Applikationsmengen mit umschriebener Partikellokalisierung, sodass vom zu

untersuchenden Bereich gezielt Schnitte hergestellt werden können. Die lokale *in situ*-Applikation eignete sich daher nicht nur für die Eingabe von Latex-Beads und FITC, sondern auch für die Einbettung in GMA.

Für die zielgenaue, lokale *in situ*-Applikation wurde eine Heidelberger Verlängerung im oberen Viertel mit einer kleinen Öffnung versehen und wie oben beschrieben am liegenden Tier in die Trachea eingeführt. In eine 1 ml-Spritze wurden 0,5 ml einer 1:100 verdünnten Tusche-PBS-Suspension aufgezogen und in einen dünnen Katheter appliziert. Anschließend wurde die Tusche durch weiteres Füllen des Katheters mit Luft unmittelbar an die Katheterspitze positioniert. Der Katheter wurde nun durch die Öffnung der Heidelberger Verlängerung eingeführt und vorsichtig entlang dieser als Führungsschiene bis zum kaudalen Bereich des Primärbronchus vorgeschoben (s. Abbildung 15). Die notwendige Länge des Katheters bis zum kaudalen Primärbronchus wurde vorab bei anderen Tieren gemessen und markiert. Nach Applikation der 0,5 ml Tusche am liegenden Tier wurde der Katheter in der Position belassen und die Lunge nach Ablauf der Einwirkzeit von 10 Minuten durch die Heidelberger Verlängerung mit Bouin-Lösung wie oben beschrieben gefüllt. Der Katheter wurde dabei mittels einer Klemme bis zum Eröffnen des Tieres in seiner Position belassen. Dieses Vorgehen ermöglichte die Bestimmung des exakten Applikationsortes.

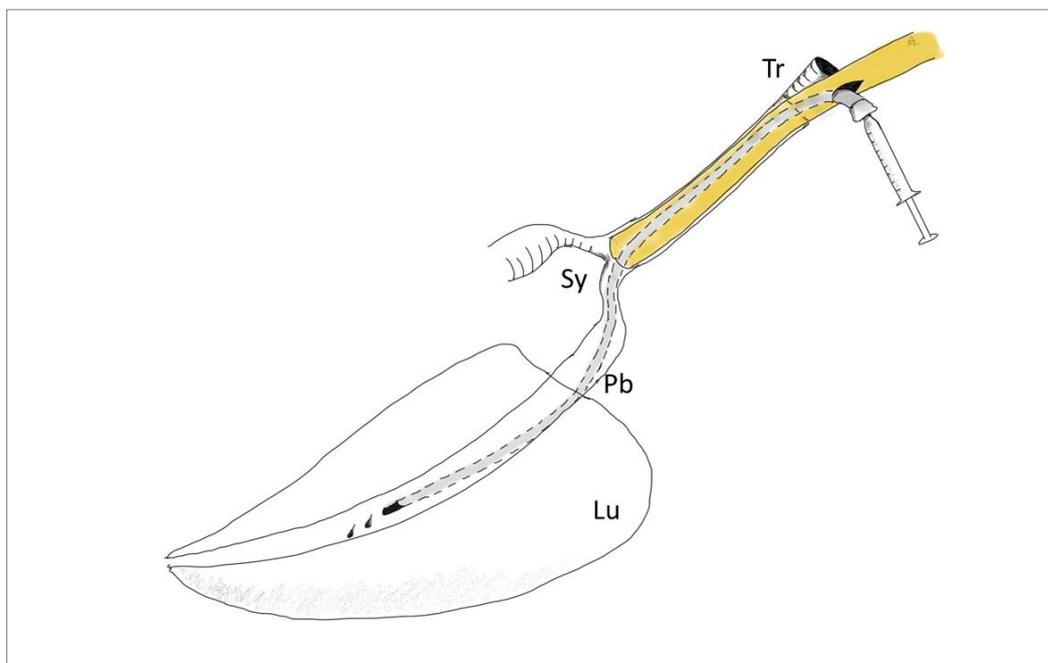


Abbildung 15: Schematische Darstellung der *in situ*-Applikation über den Primärbronchus (Pb). Gelb: Heidelberger Verlängerung, grau: Katheter, Tr: Trachea, Sy: Syrinx, Lu: Lunge (Abb. A. Wilhelm).

2.2.4 Fixierung und Probenentnahme

2.2.4.1 Nach Füllung der gesamten Lunge

Nach Ende der jeweiligen Einwirkdauer (s. Tabelle 1) wurde die Lunge entweder mit Bouin-Lösung fixiert, indem die Tuschesuspension aspiriert und die Lunge mit Fixierlösung gefüllt wurde (s. Kap. 2.1.3). Sofern das Gewebe immunhistochemisch untersucht werden sollte, wurde die Lunge nach Aspiration der Tuschesuspension mit Agarose gefüllt und weiterbehandelt, wie unter Kapitel 2.1.4 beschrieben. Nach Ablauf der Fixierdauer oder nach Verfestigung der Agarose wurde das Tier eröffnet und die Lunge wie unter Kapitel 2.1.5 beschrieben entnommen und entlang der Sulci costales in vier Transversalscheiben unterteilt. Zum Vergleich der GCs der Lunge mit denen der Milz wurde diese nach Eröffnung des Tieres vorsichtig präpariert und im Ganzen in Tissue-Tek[®] eingefroren.

2.2.4.2 Nach lokaler in situ-Applikation

Nach Ablauf der Einwirkzeit wurde das Tier zur Fixierung aufgehängt und durch die Heidelberger Verlängerung mit Bouin-Lösung gefüllt (s. Kap. 2.1.3). Der Katheter wurde dabei mithilfe einer Klemme bis zur Lungenentnahme in seiner Position belassen. Dieses Vorgehen ermöglichte die exakte Bestimmung des Applikationsortes. Nach einer Fixierdauer von zwei bis drei Stunden wurde das Tier anschließend eröffnet und die entsprechende Lungenseite mit der applizierten Tusche anhand der Katheterlage identifiziert und entnommen, wie unter Kapitel 2.1.5 beschrieben. Statt der Unterteilung in vier Transversalscheiben entlang der Sulci costales wurde das Lungengewebe mit dem enthaltenen Applikationsbereich in Form von einer Transversalscheibe entnommen.

2.2.5 Einbettung

2.2.5.1 Nach Füllen der gesamten Lunge

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die agarosegefüllten Lungenscheiben in Tissue-Tek[®] eingebettet und eingefroren (s. Kap. 2.1.6). Für die Einbettung in Paraffin wurden die präparierten Lungenscheiben in entsprechend beschriftete Einbettkassetten gelegt. Die weitere Entwässerung und Einbettung in Paraffin erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

Protokoll 1: Fixier-, Entwässerungs- und Einbettprotokoll zur Herstellung von Paraffinschnitten

Fixation	2–3 h
70%iges Ethanol	bis zur Entfärbung (Bouin-Lösung) (2 d)
96%iges Ethanol	2 x je 12 h
Isopropanol I	2 x je 12 h
Isopropanol II	2 x je 12 h
Xylol I	2 x je 12 h
Xylol II	2 x je 12 h
Paraffin Typ 1- 9	jeweils 6 h pro Paraffintyp
Ausgießen	im Paraffin Typ 9

2.2.5.2 Nach lokaler in situ-Applikation

Die entnommene Lungenscheibe mit der enthaltenen Tusche wurde anschließend in zwei ca. 10 x 10 x 5 mm große Stücke unterteilt und in beschriftete Einbettkassetten gelegt. Die Entwässerung und Einbettung wurde an ein Protokoll für die Entwässerung von GMA-Proben angelehnt [210], jedoch im Rahmen dieser Arbeit an die Hühnerlunge angepasst (s. Protokoll 2).

Protokoll 2: Entwässerungs- und Einbettprotokoll für GMA-Proben

Fixation	2–3 h
70%iges Ethanol	4–5 x je 15 min bis zur Entfärbung
96%iges Ethanol	3–4 x je 15 min
<u>Präinfiltration</u> Basislösung + 96%iges Ethanol (1: 1)	10 min Präinfiltration im Exsikkator
<u>Infiltration mit Vorbereitungslösung</u> 100 ml Basislösung + 1g Härter I	Über Nacht bei 4 °C
<u>Polymerisation</u> 1 ml Härter II je 15 ml Vorbereitungslösung	Einbetten in Histoformen Mit Polymerisationslösung bedecken Mit Parafilm [®] verschlossen Aushärtung innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur
<u>Aufblocken</u> Histobloc [®] aufsetzen Technovit [®] 3040 nach Herstelleran- weisung anmischen	Polymerisation des Technovit [®] 3040 innerhalb von 30 min s. Abbildung 16

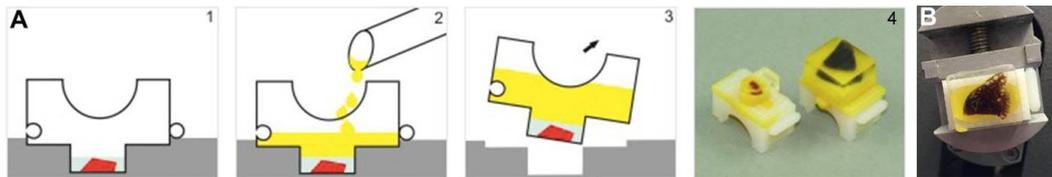


Abbildung 16: Schema des Aufblockens mithilfe von Technovit® 3040 (Polymerisationssysteme für histologische Anwendungen, S. 15, Kulzer Technik) **A:** Das ausgehärtete Technovit® 7100/8100 mit enthaltener Probe befindet sich in der Teflonform. Ein hohles Histobloc®-Element wird auf die Probe aufgesetzt (1). Dieses wird mit der nach Herstelleranweisung angemischten Technovit® 3040-Lösung gefüllt (2). Nach Aushärtung der Lösung kann der Histobloc® samt Kunstharzblock aus der Teflonform gelöst werden (3). Fertiggestellte, aufgeblockte Kunstharzblöcke mit darin enthaltener Probe (4) **B:** Im Rotationsmikrotom eingespannter Technovit® 7000-Block mit eingebetteter Lungenscheibe, GMA 1-Versuch (Abb. A. Wilhelm).

2.2.6 Schnitthanfertigung

2.2.6.1 Gefrierschnitte

Die Schnitthanfertigung der agarosegefüllten und in Tissue-Tek® eingebetteten Lungenscheiben wurde durchgeführt, wie unter Kapitel 2.1.7 beschrieben. Vor der Färbung und Entwässerung wurden die Schnitte 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.6.2 Paraffinschnitte

Von den Paraffinblöcken der jeweiligen Lungenscheibe wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Microm HM 340E, Thermo Scientific) 5 µm-dünne Schnitte abgenommen. Zum einen wurden stichprobenartig unterschiedliche Bereiche aus dem Parenchym der jeweiligen Scheiben in Form von 10–20 Serienschritten aufgearbeitet, um einen Überblick über die Aufnahme in der gesamten Lunge zu gewinnen (s. Kap. 2.1.7). Zum anderen wurden vom Primärbronchus im Bereich des BALT Serienschritte angefertigt, um das Aufnahmeverhalten des BALT-Epithels zu analysieren. Dafür wurden Probeschnitte abgenommen und mithilfe einer Hämalaun-Färbung eine Orientierung im Gewebe vorgenommen. Sobald BALT zu sehen war, wurden Serienschritte abgenommen. Die Schnitte wurden anschließend im 37 °C warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger aufgezogen, kurz auf der Wärmeplatte bei 37 °C und anschließend über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet. Die Lagerung der Schnittpräparate bis zur Färbung erfolgte in Objektträgerkästen. Das Entparaffinieren und die Rehydrierung wurden nach Protokoll 3 durchgeführt.

2.2.6.3 Kunstharzschnitte

Die Kunstharzblöcke wurden vor der Weiterverarbeitung zunächst 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie leicht schräg (ca. 15 °) in ein Rotationsmikrotom der Firma Leitz eingespannt. Mit einer Hartmetallklinge wurden 1–2 µm dicke Schnitte hergestellt und im 37 °C warmen Wasserbad gestreckt, bis keine Falten mehr sichtbar waren. Die Schnitte wurden auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost[®] Plus) aufgezogen und eine Stunde lang auf der Wärmeplatte bei 60 °C sowie anschließend weitere 72 Stunden im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet. Dieser Schritt war wichtig, um ein späteres Abschwimmen der Schnitte während der Färbung zu verhindern. Je dünner die Schnitte waren, desto besser war die Haftung am Objektträger. Für die Färbung war kein Herauslösen des Kunstharzes notwendig. Die Schnittpräparate wurden direkt in die entsprechende Färbelösung getaucht, wie unten beschrieben. Anschließend wurden sie durch die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert und mit Eukitt[®] eingedeckt.

2.2.7 Färbungen

2.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) färbt die Zellkerne blau, das Zytoplasma rosa und gewährt eine gute Differenzierung der Gewebestrukturen. Da die normalerweise kräftige Färbung die Tusche im Gewebe leicht maskiert, wurde das Protokoll entsprechend mit verkürzter Einwirkzeit angepasst. Das Entparaffinieren, Rehydrieren, Färben und Dehydrieren der Paraffinschnitte wurde wie in Protokoll 3 beschrieben durchgeführt.

Die Gefrierschnitte wurden nach einer zehnminütigen Trocknung bei Raumtemperatur in die Färbelösung getaucht und nach dem untenstehenden Protokoll gefärbt und dehydriert. Für die HE-Färbung an GMA-Schnitten wurde das Protokoll 3 verwendet, die Färbedauer wurde jedoch an die Besonderheiten der Kunstharzeinbettung angepasst. Die Schnitte wurden ohne vorherige Entplastung fünf Minuten direkt in Hämalaunlösung getaucht, kurz in destilliertem Wasser abgespült und fünf Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend folgte eine fünfminütige Färbung mit Eosin, ein kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser und das Differenzieren in 70%igem Ethanol. Das anschließende Dehydrieren erfolgte nach untenstehendem Protokoll:

Protokoll 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

2 x Xylol	je 10 min
2 x Isopropanol	je 5 min
2 x 96%iges Ethanol	je 5 min
2 x 70%iges Ethanol	je 5 min
Aqua dest.	kurz
Mayers Hämalaunlösung	3 min
Abspülen in Aqua dest.	kurz
Bläuen in fließendem Leitungswasser	3 min
Eosin	5 min
Abspülen in Aqua dest.	kurz
70%iges Ethanol	differenzieren
2 x 96%iges Ethanol	je 5 min
2 x Isopropanol	je 5 min
2 x Xylol	je 5 min

2.2.7.2 Kernechtrot-Färbung

Die Kernechtrot-Färbung färbt nur die Zellkerne rosa an und ermöglichte durch den Kontrast zum Schwarz der Tusche das schnelle Auffinden von Kohlenstoffpartikeln im Gewebe. Bei der Kernechtrot-Färbung wurden die Schnittpräparate im Falle der Paraffinschnitte zuvor entparaffiniert und rehydriert, nur kurz in 70%iges Ethanol getaucht und weiter mit verkürzten Zeiten in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, wie im folgenden Protokoll beschrieben:

Protokoll 4: Kernechtrot-Färbung

Kernechtrot-Aluminiumsulfat	10 min
Abspülen in Aqua dest.	kurz
70%iges Ethanol	30 s
96%iges Ethanol	2 min
2 x Isopropanol	2 min
2 x Xylol	5 min

2.2.7.3 Lichtgrün-Färbung

Durch die Lichtgrün-Färbung erhalten die Zellkerne ein dunkelgrünes und das Zytoplasma ein hellgrünes Erscheinungsbild, ohne die Kohlenstoffpartikel zu maskieren und sie erwies sich daher als sehr geeignet für die Beurteilung der Partikelaufnahme. Nach vorherigem Entparaffinieren und Rehydrieren im Falle der Paraffinschnitte (s. Protokoll 3) erfolgte die Färbung und Dehydrierung nach dem untenstehenden Protokoll. Nach der Färbelösung folgte ein kurzes Eintauchen in 96%iges Ethanol und die weitere Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe mit verkürzter Zeit von jeweils 2 x 2 Minuten, um das Auswaschen der Farbe zu minimieren. Sofern Lichtgrün in Kombination mit Kernechtrot verwendet wurde, wurden die Schnitte nach kurzem Abspülen des Kernechtrots (s. Protokoll 4) in destilliertem Wasser direkt in Lichtgrün getaucht und weiter nach Protokoll 5 behandelt.

Protokoll 5: Lichtgrün-Färbung

Lichtgrün	5 min
1 x 96%iges Ethanol	kurz
2 x Isopropanol	2 min
2 x Xylol	5 min

Die Schnitte wurden nach der Färbung und Dehydrierung anschließend mit Eukitt[®] und einem Deckgläschen eingedeckt. Die Schnittpräparate wurden nach Trocknung mit einem Hellfeldmikroskop (Zeiss Axiolab) ausgewertet und mit einer Olympus XC10-Kamera eines Olympus BX51-Mikroskops fotografisch dokumentiert.

Tabelle 1: Übersicht über die Einzelversuche der Tuscheversuchsreihe

Versuch	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T3/2	T3/3	GMA-I
Tieralter	3 Mo	1 Mo	> 3 Mo										
Verdünnung	1:10	1:300	1:10	1:10	1:1000	1:1000	1:100	1:100	1:10	1:100	1:10	1:10	6 Mo unverdünnt
Behandlung	2 x waschen	2 x waschen	Ultraschallbad	-	-	Ultraschallbad	Ultraschallbad	Ultraschallbad	Ultraschallbad	Ultraschallbad	Ultraschallbad	Ultraschallbad	-
Einwirkdauer	30 min	90 min	60 min	3 min	5 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	60 min	60 min	10 min
Fixierung	Bouin-Lösung	3%ige Agarose	Bouin-Lösung	Bouin-Lösung	3%ige Agarose	Karnovsky	3%ige Agarose	kollabiert, Tissue-Tek®	2%ige Agarose	Karnovsky	Bouin-Lösung	Bouin-Lösung	Bouin-Lösung
Untersuchungsmethode	HE	HE	HE	HE	HE	TEM	nativ HE Kernechtrot IHC (KUL01, CD45)	HE	HE IHC (KUL01, CD45, Bu1)	TEM	HE Kernechtrot Lichtgrün	HE Kernechtrot Lichtgrün	HE

HE = Hämatoxylin-Eosin, IHC = Immunhistochemie, TEM = Transmissionselektronenmikroskopie

2.3 Beads-Versuche

Für diesen Versuch wurden nicht-gekoppelte, schwarz gefärbte Polystyrol-Mikropartikel verwendet. Bei der Applikation der Beads kam zum einen die Methode der Füllung der gesamten Lunge mit einer Mischung aus Beads und DMEM und zum anderen die katheterbasierte, lokale *in situ*-Applikationsmethode zum Einsatz (s. Kap. 2.2.3). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Beads-Versuche.

2.3.1 Material

Für die Applikation und Füllung der gesamten Lunge: s. Kap. 2.1.1

Für die lokale Applikation zusätzlich: s. Kap. 2.2.1

Polybead[®] Polystyrene black dyed microspheres, 1,0 μm ¹⁵

PBS pH 7,2 (s. Kap. 2.1.1)

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)²

Für die Agarose-Applikation und Gefrierschnitt-Herstellung: s. Kap. 2.1.1

Phosphatgepufferte 4%ige Formaldehydlösung⁴

Einbettkassetten¹⁰

Aufsteigende Alkoholreihe: s. Kap. 2.2.1

Paraffinreihe: s. Kap. 2.2.1

Für Kunstharzeinbettung: s. Kap. 2.2.1

Färbelösungen

- Mayers Hämalaunlösung⁶
- Eosin⁶
- Kernechtrot-Aluminiumsulfat¹⁴
- Lichtgrün¹⁴
- Richardson¹⁴

Einbett- und Eindeckzubehör

- Adhäsionsobjektträger (SuperFrost[®] Plus)²
- Immersionsöl⁶
- Kaisers Glycerin-Gelatine⁶
- Deckgläser⁴
- Klarer Nagellack

2.3.2 Applikation

2.3.2.1 Füllung der gesamten Lunge

Für die Füllung der gesamten Lunge wurde eine 1:10-Verdünnung aus Beads und DMEM hergestellt. Durch Kultivierung von Lungenscheiben konnten die Zellen u. a. durch Nährmedium bis zu eine Woche p. m. am Leben erhalten werden [193, 203]. Daran anlehnend diente die Verwendung von Nährmedium statt PBS der Untersuchung, ob sich dadurch Unterschiede hinsichtlich der Vitalität der Zellen und somit der Partikelaufnahme ergäben. Für die Füllung der gesamten Lunge eines Tieres wurden aufgrund der geringeren Organgröße 2 ml der Beads-Stammlösung in 18 ml körperwarmem DMEM gelöst und über die Trachea appliziert und nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten wieder abgezogen, wie in Kapitel 2.1.2 und 2.1.3 beschrieben. Nach Vorverlagerung des Magen-Darm-Traktes wurden 30 ml der 42 °C warmen 3%igen Low Melt Agarose-DMEM-Lösung eingegeben, bis sich ein Agarosespiegel über der Lunge gebildet hatte und das Tier bis zum Gelieren der Agarose bei 4 °C gelagert (s. Kap. 2.1.4).

2.3.2.2 Lokale in situ-Applikation

Für die übrigen Beads-Versuche wurden kleinere Volumina verwendet. Dazu wurde die lokale *in situ*-Applikation mit der unverdünnten Beads-Stammsuspension durchgeführt und die Partikelaufnahme durch das BALT sowie durch das direkt umliegende Parenchym untersucht. Die Applikation wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.3 und Abbildung 15 beschrieben. Bei einem Tier wurde die Lunge kurze Zeit *post mortem* ohne vorherige Agaroseapplikation entnommen, der Primärbronchus für die lokale Applikation sondiert und der Länge nach eröffnet. Anschließend wurden 50 µl der unverdünnten Beads-Suspension unter Sichtkontakt auf das BALT aufgeträufelt. Nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten wurde der Primärbronchus vorsichtig mit PBS gespült, um ungebundene Beads zu entfernen.

2.3.3 Fixierung, Probenentnahme und Einbettung

Nach lokaler *in situ*-Applikation wurde die Lunge zur Fixierung mit 4%igem Formaldehyd gefüllt [206], wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben und zwei Stunden fixiert (s. Protokoll 2).

2.3.3.1 Nach Füllen der gesamten Lunge

Die Füllung der gesamten Lunge mit der Beads-DMEM-Suspension diente der Herstellung von Gefrierschnitten. Dazu wurde die agarosegefüllte Lunge entnommen, entlang der Sulci costales in Scheiben unterteilt und in Tissue-Tek[®] eingebettet und eingefroren, wie in Kapitel 2.1.4 bis 2.1.6 beschrieben.

2.3.3.2 Nach lokaler in situ-Applikation

Die Lunge wurde nach lokaler in situ-Applikation wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben entnommen und der Lungenbereich mit der applizierten Beads-Suspension präpariert. Die Proben wurden anschließend in beschriftete Einbettkassetten verbracht, dem Protokoll 2 entsprechend dehydriert und in Technovit[®] 7100 eingebettet.

2.3.3.3 Nach lokaler Applikation am eröffneten Primärbronchus

Da bei dieser Applikationsmethode die schnelle Applikation p. m. wichtig war, wurde die Lunge in kollabiertem Zustand entnommen, der Primärbronchus eröffnet und die Beads-Suspension aufgeträufelt. Um möglichst viel BALT-Gewebe auf einem Schnitt darzustellen, wurde das mediale und laterale Lungenparenchym entfernt, sodass eine Längsscheibe entstand, die den gesamten Primärbronchus der Länge nach enthielt (s. Abbildung 14). Der Primärbronchus wurde mit Tissue-Tek[®] gefüllt und die Lungenscheibe nach Einbettung in Tissue-Tek[®] eingefroren, wie in Kapitel 2.1.6 dargestellt.

2.3.4 Schnittanfertigung

Die Herstellung von Gefrierschnitten erfolgte entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.1.7. Die Anfertigung von Kunstharzschnitten nach Technovit[®] 7100-Einbettung wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.6.3 beschrieben.

2.3.5 Färbung

Die Gefrierschnitte wurden entweder mit HE, Lichtgrün oder Kernechtrot bzw. einer Kombination aus Lichtgrün und Kernechtrot gefärbt, wie unter 2.2.7.3 beschrieben. Die Kunstharzschnitte der Beads-Versuche wurden mit der Färbelösung nach Richardson gefärbt. Dadurch erscheinen die Zellkerne dunkelblau und das Zytoplasma hellblau, wodurch sich ein guter Kontrast zu den Beads ergab und die Detektion der Beads im Gewebe erleichtert wurde. Da Eukitt[®] zur Auflösung der Beads führt [206], konnte dieses nicht als Eindeckmedium

verwendet werden. Alternativ wurde Glycerin-Gelatine und Immersionsöl als Eindeckmedium getestet, die beide in gleichem Maße gute Ergebnisse erzielten [210]. Ein weiterer Vorteil der Richardson-Färbung war die Kompatibilität mit diesen Eindeckmedien. Die Gefrierschnitte wurden nach der Färbung mit den oben genannten Färbelösungen kurz in destilliertes Wasser getaucht und bei 37 °C auf der Wärmeplatte angetrocknet. Auf die noch leicht feuchten Schnitte wurden zwei bis drei Tropfen der erwärmten Glycerin-Gelatine getropft und die Schnitte mit einem Deckgläschen eingedeckt. Nach Verfestigung der Gelatine wurden die Deckgläschen mit durchsichtigem Nagellack umrandet, um eine längere Haltbarkeit zu gewährleisten. Sofern Immersionsöl zum Eindecken benutzt wurde, wurden die Schnitte zügig begutachtet und fotografiert.

Die Kunstharz-Schnittpräparate wurden mit einigen Tropfen der Richardson-Färbelösung bedeckt und 30 Sekunden auf einer Wärmeplatte bei 60 °C belassen. Im Anschluss folgte ein vorsichtiges Abspülen der Schnitte mit Leitungswasser mithilfe einer Pipette. Die noch leicht feuchten Schnitte wurden kurz zum Trocknen auf die Wärme gelegt und in noch leicht feuchtem Zustand mit Glycerin-Gelatine eingedeckt wie oben beschrieben. Alternativ kam Immersionsöl zum Einsatz, mit dem die Schnitte wie oben beschrieben eingedeckt wurden. Durch Reduktion der Kondensorenblendenöffnung und Erhöhung der Intensität der Lichtquelle können die Beads leichter im Gewebe dargestellt werden.

Tabelle 2: Übersicht der Einzelversuche der Beads-Applikation

Beads-Applikation	Tier 1	Tier 2 (GMA-2)	Tier 3
Applikation	gesamte Lunge	lokal in situ	lokal (Pb eröffnet)
Einwirkzeit (min)	30	30	20
Fixierung/Einbettung	Agarose /Tissue-Tek®	Formaldehyd/ Technovit®	Agarose / Tissue-Tek®

2.4 Fluoresceinisothiocyanat

Bei Fluoresceinisothiocyanat (FITC) handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der ein Absorptionsmaximum von 485 nm und ein Emissionsmaximum von 514 nm besitzt. Nach Anregung mit blauem Licht emittiert er grünes Licht, das fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden kann. Um die FITC-Aufnahme durch das Lungengewebe zu untersuchen, kamen bei diesem Versuch unterschiedliche Konzentrationen einer FITC-PBS-Suspension zum Einsatz (s. Tabelle 3).

2.4.1 Material

Für die Applikation und Füllung der gesamten Lunge: s. Kap. 2.1.1

Für die lokale Applikation zusätzlich: s. Kap. 2.2.1

Fluoresceinisothiocyanat⁶

Dimethylsulfoxid (DMSO)³

PBS pH 7,2 (s. 2.1.1)

1,5 ml-Tubes, braun⁹

Für die Gefrierschnitt-Herstellung: s. Kap. 2.1.1

Adhäsionsobjektträger (SuperFrost[®] Plus)²

2.4.2 Applikation

Wie bei den Beads-Versuchen wurden bei den FITC-Versuchen kleinere Volumina verwendet und die lokale *in situ*-Applikation angewandt. Dafür wurde die notwendige Menge des FITC-Pulvers zunächst abgewogen, in einem bis zwei Tropfen DMSO aufgelöst und mit PBS suspendiert. Die lokale *in situ*-Applikation erfolgte wie in Kapitel 2.2.3 und Abbildung 15 dargestellt. Die Einwirkzeit betrug 10, 20 oder 30 Minuten. Zusätzlich wurden verschiedene Kombinationen aus Applikation unter Sicht nach Eröffnung des Primärbronchus (s. 2.3.3.2) der Lungengegenseite getestet sowie mit und ohne anschließende Spülung mit PBS variiert, um den Einfluss dieser Faktoren auf das spätere Ergebnis zu untersuchen.

2.4.3 Einbettung

Nach Ablauf der Einwirkzeit wurden die Lungen in kollabiertem Zustand wie unter Kapitel 2.3.3.3 beschrieben als Längsscheibe präpariert, in Tissue-Tek[®] eingebettet und eingefroren (s. Kap. 2.1.6). Bei der *in situ*-Applikation wurde der Primärbronchus nach Präparation der Lunge sondiert, das laterale und mediale Lungenparenchym entfernt wie zuvor beschrieben und die Lungen-Längsscheibe mit dem enthaltenen, verschlossenen Primärbronchus in Tissue-Tek[®] eingebettet und eingefroren.

2.4.4 Schnitthanfertigung

Die Herstellung von Gefrierschnitten erfolgte wie in Kapitel 2.1.7 beschrieben. Die Schnittpräparate wurden direkt nach dem Aufziehen auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost[®] Plus) im Dunkeln aufbewahrt, ohne Eindecken zügig mit einem Fluoreszenzmikroskop DM5000 B der Firma Leica mit dem L5-Filter begutachtet und mit einer Leica DFC 3000 G Kamera fotografisch dokumentiert.

Tabelle 3: Übersicht der Einzelversuche der FITC-Applikation

FITC-Applikation	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5 (Pb eröffnet)
Alter	> 6 Mo				
Konzentration	50 mg/ml	1 mg/ml	0,2 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
Einwirkzeit	30 min	10 min	20 min	10 min	10 min
Spülen	+	+	-	+	-

2.5 Immunhistochemische Einfachfärbung

Aufgrund von eingeschränkter Funktionalität der für das Huhn verfügbaren Antikörper auf fixiertem und paraffineingebettetem Gewebe, wurden für die immunhistochemischen Färbungen Gefrierschnitte verwendet. Zusätzlich wurden für den Säuger etablierte Immunhistochemie-Protokolle auf kunstharzeingebettetem Gewebe an der Hühnerlunge getestet. Für die Färbungen wurden die in Tabelle 4 angegebenen primären Antikörper verwendet. Sofern keine Herstellerbezugsquellen in Form von Hochzahlen angegeben sind, handelt es sich um Zellkulturüberstände.

2.5.1 Material

Feuchte Kammer

Aceton 100% pro analysi⁶

PBS pH 7,2 (s. Kap. 2.1.1)

Salzsäure, 3N

- 54,7 ml Salzsäure (HCL) 20 %³
- 45,3 ml Aqua dest.

Natriumtetraborat-Lösung, 0,1M, pH 8,5

- 3,81 g Natriumtetraborat (Na₂B₄O₇)³
- ad 100 ml Aqua dest.

Bovines Serumalbumin (BSA)⁶

Magermilchpulver³

Primäre Antikörper (s. Tabelle 4)

goat-anti-mouse-HRP¹⁶

horse-anti-mouse, biotinyliert¹⁷

Hühnerserum² (Gibco[®], *chicken serum*, ChS)

Ziegenserum¹⁸

Glasküvetten

Vector[®] DAB-Kit¹⁷

Vectastain[®] ABC-Kit-PK4002¹⁷

Aqua dest.

Mayers Hämalaunlösung⁶

Aufsteigende Alkoholreihe: s. Kap. 2.2.1

Eukitt[®] Eindeckmedium⁶

Deckgläser⁴

Für GMA-Schnitte zusätzlich:

Technovit[®] 8100¹³

2%iges Paraformaldehyd (1 g Paraformaldehyd/80 ml PBS)⁴

Saccharose³

Parafilm^{®19}

Trypsin⁶

Tabelle 4: Liste der verwendeten primären Antikörper

Antikörper (Klonname)	Isotyp	Antigen	Zelltyp	Verdünnung	Referenz
(KUL01) ²⁰	IgG1	MRC1L-B	MΦ, MZ, DC	5 µg/ml	[67]
anti-Bu1 (AV-20)	IgG1	chB6	B-Zellen	1:50	[211, 212]
anti-CD45 (16-6)	IgG2a	chCD45	alle Leukozyten	1:1200	[213, 214]
(CVI-ChNL-68.1)	IgG1	unbekannt	MZ, MΦ IDCs	1:2000	[65]
anti-chIgA (K3)	IgG2a	chIgA	chIgA, BC	0,5 µg/ml	[215]
anti-BrdU (Bu-1)	IgG2a	BrdU	inkorporiertes BrdU	1:5000	[216]
(1A3a)	*	unbekannt	Endothelzellen	0,45 µg/ml	**
anti-Pan- Zytokeratin ³⁰ (AE1/AE3)	IgG1	humanes epidermales Keratin	Epithelzellen	Gewebe- überstand	[217]

MZ: Monozyten, MΦ: Makrophagen, DC: Dendritische Zellen, BC: B-Zellen, ch: chicken,

* wurde nicht bestimmt, ** persönliche Kommunikation

2.5.1.1 Durchführung an Gefrierschnitten

Aufgrund der erwähnten eingeschränkten Funktionalität der für das Huhn verfügbaren Antikörper wurden für die immunhistochemische Einfachfärbung Gefrierschnitte verwendet. Als primäre Antikörper dienten sowohl Zellkulturüberstände als auch gereinigte Antikörper. Als sekundärer Antikörper kam ein peroxidasekonjugierter *goat-anti-mouse-Antikörper* zum Einsatz. Die angegebene Verdünnung mit PBS und die Funktionalität der Antikörper aus Zellkulturüberständen wurden für die Hühnerlunge bzw. Hühnermilz im Rahmen von Vorarbeiten am Institut getestet [9, 141]. Für die immunhistochemische Färbung wurden testweise verschiedene Protokolle angewandt. Nach Auswertung der Färbungen erfolgte die Festlegung auf ein Protokoll, das bereits an der Hühnerlunge getestet wurde [218].

Die wie in Kapitel 2.1.7 hergestellten Schnittpräparate wurden zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend zwei Minuten in eiskaltem 100%igem Aceton fixiert. Sofern die Schnittpräparate nicht gleich weiter immunhistochemisch untersucht wurden, wurden sie luftdicht verpackt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Bei direkter Weiterverarbeitung wurden die Schnitte nach dem Eintauchen in Aceton nochmals 10 Minuten getrocknet und 10 Minuten in PBS rehydriert. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung nach dem folgenden Protokoll.

Protokoll 6: Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Blockieren mit Ziegen Serum (1:40 in PBS + 1% BSA)	1 h in der feuchten Kammer bei RT
In PBS verdünnte Primärantikörper 200 μl je Schnittpräparat	30 min in der feuchten Kammer bei RT
Waschen in PBS	3 x 5 min
goat-anti-mouse-HRP ²² (1: 100 in PBS pH 7,2 + 25 % ChS)	30 min in der feuchten Kammer bei RT
Waschen in PBS	3 x 5 min
Entwicklung mit DAB	5 min
Spülen mit PBS	kurz
Stoppen der Reaktion in Aqua dest.	kurz
Mayers Hämalaunlösung	1 min
Bläuen in fließendem Leitungswasser	5 min
Aufsteigende Alkoholreihe	je 5 min
Eindecken	Eukitt [®] / Kaisers Glycerin-Gelatine

Für die anti-BrdU-Färbung wurde zunächst die endogene Peroxidase blockiert, indem 3 N Salzsäure aufgetragen wurde und die Schnitte drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach Abgießen der Blockierlösung wurden die Schnitte zweimal je eine Minute mit einer 10-millimolaren Natriumtetraborat-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Blockierung der unspezifischen Bindung mit 1 % Magermilchpulver in PBS für 15 Minuten sowie anschließend eine Stunde mit Pferdeserum (1:40 in PBS pH 7,2, + 1% BSA). Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur mit dem anti-BrdU-Antikörper (s. Tabelle 4) wurden die Schnitte dreimal je fünf Minuten in PBS gewaschen und mit einem biotinylierten horse-anti-mouse-Antikörper (ABC Kit PK-4002, 1:200 in PBS) detektiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte erneut dreimal gewaschen, das Signal nach Herstellerangaben mit dem Vectastain[®] ABC-Kit verstärkt und mit einer DAB-Entwicklungslösung (3,3'-Diaminobenzidin) sichtbar gemacht (s. Protokoll 6). Die weitere Behandlung erfolgte entsprechend Protokoll 6. Im Hellfeldmikroskop (Zeiss Axiolab) erscheinen alle Kerne blau und positive Zellen nach DAB-Umsetzung braun. Als Negativkontrolle wurde PBS statt des primären Antikörpers aufgetragen und diente der Kontrolle unspezifischer Bindung des sekundären Antikörpers. Als Positivkontrolle kamen Gefrierschnitte der Milz zum Einsatz. Die Schnittpräparate wurden mit einer Olympus XC10-Kamera eines Olympus BX51-Mikroskops fotografisch dokumentiert.

2.5.1.2 Durchführung an GMA-Schnitten

Die bisherige Verarbeitung der Lungenproben führte entweder zu guter Morphologie (Paraffin) oder Erhalt der Antigenität (Gefrierproben). Da Kunstharzschnitte beim Säuger erfolgreich in immunhistochemischen Färbungen zum Einsatz kamen [207-209], wurde der Versuch unternommen, diese Fixierprotokolle für die immunhistochemische Färbung an der Hühnerlunge zu testen. Zu diesem Zweck wurde Techonvit[®] 8100 verwendet, ein HEMA-basiertes Kunstharz für die Histologie, das speziell für die Kältepolymerisation bei 4 °C entwickelt wurde und nach Herstellerangaben (Heraeus Kulzer) immunhistochemische Färbungen ermöglicht. Entsprechend den Herstellerangaben sowie in Anlehnung an publizierte Fixierprotokolle [207, 208] wurden 100%iges Aceton und 2%iges Paraformaldehyd als Fixiermedium mit unterschiedlichen Einwirkzeiten getestet (Applikation s. Kap. 2.2.4). Da die Lunge ein poröses Organ

darstellt und somit nur eine geringe Gewebsdicke infiltriert werden muss, wurde die Einwirkzeit auf ein Minimum herabgesetzt, um die Antigenität zu erhalten. Nach einer Fixierdauer von 20 Minuten bzw. einer Stunde (Vergleich) bei 4 °C wurden die Lungenproben wie unter Kapitel 2.1.5 beschrieben entnommen und über Nacht in PBS mit einem Zusatz von 6%iger Saccharose bei 4 °C nachbehandelt. Anschließend wurden die Proben eine Stunde mit eiskaltem Aceton dehydriert. Die nach Herstellerangaben hergestellte Infiltrationslösung wurde bei 4 °C gekühlt. Die Proben wurden direkt aus dem Aceton in die Infiltrationslösung verbracht und darin sechs Stunden bei 4 °C belassen. Die Polymerisationslösung wurde den Herstellerangaben entsprechend ebenfalls gekühlt hergestellt. Während der Einbettung befand sich die Teflonform auf einer Kühlplatte. Nach der Einbettung wurden die Proben mit Parafilm[®] bedeckt und bis zur vollständigen Polymerisation im Kühlschrank bei 4 °C belassen. Das Aufblocken erfolgte bei Raumtemperatur mit Histobloc[®] und Technovit[®] 3040 wie unter Protokoll 2 und Abbildung 16 beschrieben. Die Blöcke wurden innerhalb von 24 Stunden verwendet und in dieser Zeit in Parafilm[®] verpackt kühl gelagert. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -20 °C. Mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Leitz) wurden 2 µm-dicke Schnitte hergestellt, kurz zum Strecken im zimmerwarmen Wasserbad (Aqua dest.) belassen, auf Adhäsionsobjektträger aufgezogen (SuperFrost[®] Plus) und zwei Stunden bei 25 °C auf der Wärmeplatte getrocknet. Ein Herauslösen des Kunststoffes ist laut Herstellerangaben nicht möglich (Heraeus Kulzer).

Für die immunhistochemische Färbung wurden Antikörper aus Tabelle 4 verwendet und die Schnitte nach Protokoll 6 behandelt. Das Protokoll wurde zusätzlich mit vorheriger Demaskierung durch Trypsinverdau getestet. Hierzu wurde je einmal eine 0,05%ige und eine 0,5%ige Trypsin-PBS-Lösung hergestellt, auf 37 °C vorgewärmt und die Schnitte für 15 Minuten darin belassen. Nach einem dreimaligen Waschschrift wurden die Schnitte anschließend weiterbehandelt, wie in Protokoll 6 beschrieben.

2.5.2 Aufreinigung des Endothelzellantikörpers

2.5.2.1 Material

Iscove Medium Basal²

- + 1 % Penicillin-Streptomycin⁶
- + 10 % Fetales Bovines Serum (FBS)⁶

Kryovials²

Falcon-Röhrchen⁹

Zellkulturflaschen (NuncTM EasYFlaskTM 25 und 75 cm²)²

Natriumazid³

NalgeneTM Rapid-FlowTM-Filter (0,45 µm)²

Startpuffer (20 mmol Phosphatpuffer pH 7,0)

- 1,13 g Na₂HPO₄³ ad 400 ml Aqua dest.
- 1,09 g NaH₂PO₄ x 2H₂O³ ad 300 ml Aqua dest.
- Na₂HPO₄-Lösung mit NaH₂PO₄ auf pH 7,0 einstellen

Elutionspuffer (0,1 mol Glycinpuffer pH 2,5)

- 3,75 g Glycin³ ad 500 ml Aqua dest.
- mit HCl³ auf pH 2,5 einstellen

Trislösung (1M)

- 1,211 g Tris⁴
- ad 10 ml Aqua dest.

Dialysepuffer (pH 7,8)

- 1,65 g KH₂PO₄³
- 29,03 g Na₂HPO₄ x 2H₂O³
- 45,00 g NaCl³
- ad 5 L Aqua dest.

Guanidinhydrochlorid (6 M)

- 57,32 g Guanidinhydrochlorid³
- ad 100 ml Aqua dest.

20%iges unvergälltes Ethanol³

Protein G Sepharose 4 Fast Flow²¹

Dialyseschlauch⁴ (Cellulose, 0,050 mm Wandstärke, 10 mm breit)

PBS pH 7,2 (s. Kap. 2.1.1)

2.5.2.2 Gewinnung des 1A3a-Zellkulturüberstandes

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Maus-Hybridomzellen wurden in Kryovials im Wasserbad aufgetaut, in Falcon-Röhrchen verbracht und langsam mit Iscove Medium mit Zusatz von Penicillin-Streptomycin kalt gewaschen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei $225 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 K15C, Sigma) wurde das Medium abgekippt, die Zellen in 10 ml neuem Medium resuspendiert, in Zellkulturflaschen überführt und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank mit Zusatz von 5 % CO_2 inkubiert. Die Vitalitätskontrolle per Zählkammer (Karl Hecht) erfolgte täglich, das Medium wurde gewechselt, sobald es verstoffwechselt wurde. Bei gutem Zellwuchs wurden die Zellen geteilt, in größere Flaschen (30 ml) verbracht und weiterhin täglich kontrolliert. Sobald genug Überstand gebildet wurde, wurde dieser abgenommen, mit 0,1%igem Natriumazid versetzt und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5.2.3 Aufreinigung des gewonnenen Zellkulturüberstandes

Zunächst wurden 500 ml des gewonnenen Zellkulturüberstandes über einen Filter (NalgeneTM Rapid-FlowTM, 0,45) filtriert. Die Reinigung fand mithilfe des Niederdruck-Chromatographie-Systems BioLogic LP der Firma Bio-Rad statt. Nachdem die Schläuche mit 30 ml Startpuffer (1 ml/min) gewaschen wurden, wurde der Zellkulturüberstand mittels Pumpe auf die Säule aufgetragen und die Säule mit Startpuffer gespült, bis eine konstante Basislinie erreicht wurde. Anschließend wurde zum Elutionspuffer gewechselt. Das Eluat wurde mithilfe eines Fraktionssammlers (Model 2110, Biorad) aufgefangen und sofort mit einer vorgelegten einmolaren Tris-Lösung neutralisiert. Die Fraktionen wurden spektrophotometrisch (NanoDrop[®], peqlab, VWR) gemessen. Die Fraktionen mit dem enthaltenen IgG wurden im Anschluss gepoolt und in einen Dialyseschlauch umgefüllt. Die Umpufferung im Dialysepuffer (2000-fache Menge) erfolgte über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter konstantem Rühren. Die Antikörperkonzentration wurde erneut spektrophotometrisch gemessen (NanoDrop[®], peqlab, VWR), mit PBS auf eine Konzentration von 0,45 mg/ml eingestellt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5.2.4 Immunhistochemische Färbung am Lymphherz

Das Lymphherz wurde entsprechend der Lokalisationsbeschreibung einer anatomischen Arbeit [219] aufgesucht und beidseits samt umliegendem Gewebe als Kubus entnommen. Die Einbettung erfolgte analog der Lungenproben-einbettung in Tissue-Tek[®] (s. Kap. 2.1.6) und die weitere Aufarbeitung des

Kryoblocks wie unter Kapitel 2.1.7 beschrieben. Die immunhistochemische Färbung erfolgte gemäß Protokoll 6 mit einer 1:100 Verdünnung des Endothelzell-Antikörpers mit PBS (s. Tabelle 4).

2.6 Immunfluoreszenz

2.6.1 Material

Feuchte Kammer

Glasküvetten

Aceton 100% pro analysi⁶

PBS pH 7,2 (s. Kap. 2.1.1)

Bovines Serum Albumin (BSA)⁶

Ziegenserum¹⁸

Primärer Antikörper (KUL01, s. Tabelle 4)

Sekundäre Antikörper

- goat-anti-mouse IgG1,biotinyliert²² oder Alexa568-konjugiert¹⁶

Streptavidin-TRITC¹⁶

DAPI³

Vectashield[®] HardSet Mounting Medium¹⁷

Deckgläser⁴

Tabelle 5: Für die Immunfluoreszenz verwendete Sekundär-Antikörper

Tierart	Antigen	Konjugat	Verdünnung
Ziege	Maus IgG1	Alexa 568	1:200
Ziege	Maus IgG1	Biotin	1:200

2.6.2 Durchführung

Im Rahmen der FITC-Versuche (s. Kap. 2.4) wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Da hierbei die Aufnahme durch APCs untersucht wurde, kam ein monoklonaler KUL01-IgG1-Antikörper der Firma Biorad als primärer Antikörper zur Anwendung (s. Tabelle 4). Die wie unter Kapitel 2.1.7 angefertigten Gefrierschnitte wurden lichtgeschützt 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend in PBS rehydriert. Die Weiterverarbeitung erfolgte entsprechend Protokoll 6. Alle Schritte wurden dabei lichtgeschützt durchgeführt. Als Kernfärbung wurde DAPI (100 µg/ml) verwendet und gemeinsam mit dem sekundären Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als sekundärer Antikörper kam zum einen ein Alexa568-konjugierter goat-anti-mouse-IgG1-

Antikörper oder ein biotinylierter goat-anti-mouse-IgG1-Antikörper zum Einsatz, der in einem weiteren einstündigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur mit TRITC-konjugiertem Streptavidin detektiert wurde. Diese zwei Varianten wurden getestet, um das geeignetere Fluoreszenzspektrum für die Dokumentation der FITC-Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskop zu ermitteln. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit Vectashield[®] HardSet Mounting Medium eingedeckt und die Färbung sofort beurteilt. DAPI-gefärbte Zellkerne stellen sich blau dar, FITC fluoresziert grün und antikörperpositiv markierte Kerne erscheinen rot. Das Emissionsspektrum von TRITC erwies sich als die geeignetere Färbung für die Beurteilung mittels der verwendeten Filter. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop DM5000 B der Firma Leica und den Filtern A4 (DAPI), L5 (FITC) sowie Y3 (TRITC/Alexa568).

2.7 Transmissionselektronenmikroskopie

2.7.1 Material

2,0 ml-Safe-Lock Tubes⁹

Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch nach Karnovsky (1:1 verdünnt)

- 2 g Paraformaldehyd⁴ in 25 ml Aqua bidest. lösen
- 10 ml 25%iges Glutaraldehyd⁶
- 25 mg CaCl₂³
- ad 100 ml 0,2 M Kakodylatpuffer⁴ (s. u.)

0,2 M Kakodylatpuffer pH 7,4

- 17,12 g Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat⁴
- ad 500 ml Aqua dest.
- auf pH 7,4 einstellen (Lagerung bei 4 °C)

Osmiumtetroxid-Kaliumferrocyanid-Lösung (1:1-Gemisch)

- 2%ige OsO₄ Stammlösung³
- 3%iges Kaliumferrocyanid³

Alkoholreihe, unvergällt

- 50%iges Ethanol³
- 70%iges Ethanol³
- 90%iges Ethanol³
- 96%iges Ethanol³
- 100%iges Ethanol³

Propylenoxid¹⁵

Epoxydharz (PolyBed[®] 812-BDMA Embedding Kit)¹⁵

Uranylacetat²³

- 7,7 g Uranylacetat ad 100 ml Aqua bidest.

Bleicitrat

- 1,33 g Bleinitrat²⁴
- 1,76 g Natriumcitrat²⁴
- + 30 ml Aqua bidest.
- + 8 ml 1nNaOH³
- ad 50 ml Aqua bidest.

2.7.2 Fixierung, Organentnahme und Einbettung

Die Lungen wurden für die Herstellung von Ultradünnschnitten für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit einem Gemisch aus Glutaraldehyd und Formaldehyd nach Karnovsky fixiert. Nach Eingabe der Fixierlösung (s. Kapitel 2.1.3) und Entnahme der Lungen (s. Kapitel 2.1.5) wurden die Proben für weitere zwei Stunden nachfixiert. Die Lunge wurde entlang des Primärbronchus eröffnet und Proben aus seinen Abgängen zu den Sekundärbronchien genommen. Des Weiteren wurden Proben aus den Bereichen des Übergangs von Sekundärbronchien zu Parabronchien und von den Parabronchien selbst genommen (maximale Größe 2 x 2 x 5 mm). Anschließend wurden sie in 2,0 ml-Tubes verbracht und mit 0,2 M Kakodylatpuffer zweimal je 15 Minuten gewaschen. Die Einbettung der Proben für die TEM erfolgte nach dem untenstehenden Protokoll.

Protokoll 7: Probenverarbeitung für die Transmissionselektronenmikroskopie

Fixation mit Karnovsky-Fixans	3 h bei 4 °C
Spülen mit Kakodylatpuffer	3 x je 5 min
Kontrastierung mit Osmiumtetroxid-Kaliumferrocyanid	4 h
Spülen in Kakodylatpuffer	3 x je 5 min
Dehydrieren durch aufsteigende Alkoholreihe und Propylenoxid	2-3 x je 15 min
<u>Infiltration</u>	
Propylenoxid-Epoxyharz (2:1)	1 h
Propylenoxid-Epoxyharz (1:1)	über Nacht
Propylenoxid-Epoxyharz (2:1)	12 h
Epon (rein)	1 h

2.7.3 Trimmen und Schneiden

Die eingebetteten Proben wurden mit einer Trimmvorrichtung angeschnitten und anschließend mit einem Ultramikrotom (Ultracut E Reichert-Jung) Semidünnschnitte von 1 µm Dicke hergestellt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und mit einigen Tropfen Richardson wie unter Kapitel 2.3.5 beschrieben gefärbt, entwässert und mit Eukitt[®] eingedeckt. Nach Beurteilung der Semidünnschnitte wurde der zu untersuchende Bereich näher eingegrenzt und die eingebettete Probe auf diesen Bereich getrimmt. Im Anschluss wurden von diesem Bereich Ultradünnschnitte von 60 nm hergestellt und auf Kupfernetzen positioniert. Die Proben wurden daraufhin 10 Minuten in Uranylacetat kontrastiert, mit Aqua bidest. gewaschen und ein bis zwei Minuten mit Bleicitrat kontrastiert sowie erneut mit Aqua bidest. gewaschen. Für das Betrachten der Schnitte wurde das Transmissionselektronenmikroskop EM902[®] der Firma Zeiss verwendet. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einer 2K-CCD-Kamera der Firma TRS.

3. Dreidimensionale Rekonstruktion eines Keimzentrums

3.1 Material

In Technovit[®] 7100 eingebettete Lunge (s. Kap. 2.2.5.2)

Serien-Kunstharzschnitte eines kompletten germinalen Zentrums.

Kamera zur fotografischen Dokumentierung

Bildbearbeitungssoftware

Amira 3D Software²

3.2 Durchführung

Von einer wie unter Kapitel 2.2.5.2 in Technovit[®] 7100 eingebetteten Lunge wurden 3 µm-dünne, HE-gefärbte Serienschnitte angefertigt (s. Kap. 2.2.6.3) und mittels eines Hellfeldmikroskops (Zeiss Axiolab) begutachtet. Es wurden die Schnittpräparate gewählt, die das Verfolgen eines gesamten GCs im Parenchym ermöglichten. Diese 42 ausgewählten Schnittpräparate wurden mit der Olympus XC10-Kamera eines Olympus BX51-Mikroskops fotografiert. Die Bildausschnitte des GCs (500 x 500 Pixel) wurden als Stapel in die Bildbearbeitungssoftware Adobe[®] Photoshop geladen. Nach Freistellung und einheitlicher Ausrichtung wurden die Bilder als Stapel in die Amira[®]-3D Software geladen. Die Bounding Box-Abmessungen (Begrenzungskasten) wurden an die Schnittpräparatdicke und -breite bzw. -länge angepasst und ein Schwellenwertbereich für den zu re-

konstruierenden Bereich bestimmt. Nach anschließendem Volume-Rendering wurde ein dreidimensionales Konstrukt des Keimzentrums erkennbar. Virtuelle Schnitte konnten entlang der drei Orthoschnittebenen durchgeführt und angezeigt werden. Zusätzlich konnten virtuelle Größenmessungen des 3D-Konstrukts durchgeführt werden.

4. Tracheale Infektion mit aviären pathogenen *E. coli*

Im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin wurden uns Proben aus einem Infektionsversuch (genehmigt durch das „Landesamt für Gesundheit und Soziales“, Berlin, G 0220/06) zur histologischen Begutachtung übersandt [197]. Es wurden acht SPF-Hühner (*Lohmann Selected Leghorn*) mit einem Alter von fünf Wochen intratracheal mit 0,5 ml einer PBS-Suspension mit 10^9 koloniebildenden Einheiten von *aviären pathogenen E. coli* (APEC, Stämme MT78, IMT5155, UEL17) infiziert. Für die TEM-Untersuchung wurden jeweils zwei der Tiere nach 1, 5, 10 bzw. 30 Minuten nach Infektion euthanasiert. Zwei Tiere dienten als Kontrolle und erhielten eine intratracheale Applikation von PBS. Die Fixierung, Organentnahme und Weiterverarbeitung der Proben für die TEM-Untersuchung erfolgte, wie im Kapitel 2.7 beschrieben.

5. Vakzinierung gegen Newcastle Disease Virus

5.1 Versuchsaufbau

Für den NDV-Versuch wurden 28 Hühner im Alter von 12 Wochen in zwei gleich große Gruppen unterteilt. Eine dieser Gruppen stellte die Impfgruppe, die andere die Kontrollgruppe dar. Jede dieser zwei Gruppen wurde nochmals in eine Prime- (einfache Impfung) und Boost-Gruppe (zweifache Impfung) mit je sieben Tieren eingeteilt. Die Prime-Impfgruppe erhielt eine einfache Impfung per Augentropfmethode mit dem NDV-Lebend-Impfstoff AviPro[®] ND C131 der Firma Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG. Die Boost-Impfgruppe erhielt 14 Tage später eine konjunktivale Zweitimpfung. Den Prime- und Boost-Kontrolltieren wurde konjunktival PBS statt Impfstoff nach dem gleichen Zeitschema appliziert. Die Kontrolltiere wurden in einem separaten Stallraum gehalten, um Kontakt mit dem ausgeschiedenen NDV-Impfvirus zu verhindern. Die Probennahme folgte jeweils sieben Tage nach der letzten Impfung. Von den sieben Tieren pro Gruppe wurden fünf Tiere für die Genexpressionsanalyse und histologische Untersuchung

verwendet. Dabei wurde die linke Lunge für die Genexpressionsanalyse und die rechte Lunge für die Histologie verwendet. Zwei der sieben Tiere wurden für die Fixierung mit Bouin-Lösung und anschließender Anfertigung von Paraffinproben verwendet (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Gruppeneinteilung der Tiere

Gruppe/Behandlung		Gruppe 1 (Prime)	Gruppe 2 (Boost)
Impfgruppe	RNA-Extraktion linke Lunge	5	5
	Histologie Kryo rechte Lunge	5	5
	Histologie Paraffin	2	2
	Gesamt	7	7
Kontrollgruppe	RNA-Extraktion	5	5
	Histologie Kryo rechte Lunge	5	5
	Histologie Paraffin	2	2
	Gesamt	7	7
Total		14	14

5.2 Probennahme

5.2.1 Material

Für RNA-Isolierung:

10%ige SDS-Lösung

- 10 g SDS³ ad 100 ml Aqua dest.

Biopsiestanzen (4 mm Durchmesser)²⁵

1,5 ml-Eppendorf Safe-Lock Tubes, RNase-frei⁹

RNase Zap⁶

RNAlater⁶

Für Histologie: s. Kap. 2.1.1 und 2.2.1

Paraplast^{®4}

5.2.2 Probennahme für die Genexpressionsanalyse

Die Körperhöhle wurde zügig eröffnet wie unter Kapitel 2.1.5 beschrieben. Anschließend wurde der Primärbronchus der linken Lunge mit einem sterilen Katheter sondiert und die linke Lungenseite entnommen. Mit einer 4 mm-

Biopsiestanze wurden zwei Stanzzyylinder jeweils medial und lateral des Primärbronchus aus dem kaudalen Parenchymbereich der Lunge entnommen. Hier wurde in einer Vorarbeit an der Hühnerlunge immer wieder das Auftreten germinaler Zentren im Gewebe beobachtet [9]. Der Primärbronchus wurde mit einer Skalpellklinge seiner Länge nach als Schlauch präpariert und möglichst vollständig von umgebendem Parenchym befreit. Dabei diente die Sondierung als Orientierungshilfe. Zusätzlich wurde eine Probe der Trachea unmittelbar vor der Syring entnommen (ca. 5 mm). Von den ersten drei Tieren der Boost-Gruppe und Boost-Kontrollgruppe wurde zur Untersuchung einer systemischen Reaktion ein Teil der Milz entnommen. Die Proben wurden in Tubes mit je 1 ml RNAlater verbracht und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die anschließende Lagerung der Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei –80 °C.

5.2.3 Probennahme für die Histologie

Von jedem Tier, das die für die Genexpressionsanalyse beprobt wurde, wurde die rechte Lunge zur Entnahme von Kryoproben verwendet. Zusätzlich wurden von zwei Tieren jeder Gruppe beide Lungen mit Bouin-Lösung fixiert (s. Tabelle 6). Das Vorgehen bei der Fixierung der Lunge mit Bouin-Lösung und Herstellung von Paraffinschnitten bzw. die Herstellung von Gefrierproben ist unter Kapitel 2.1.6 und 2.2.4.1 beschrieben. Neben Lunge, Trachea und Milz wurden von jedem Tier auch die Unterlider einschließlich des CALT entnommen, in Tissue-Tek[®] eingebettet und eingefroren. Die rechte Lunge wurde in kollabiertem Zustand in eine Längsscheibe geschnitten, die den Primärbronchus in seiner gesamten Länge enthielt und in Tissue-Tek[®] eingebettet und eingefroren, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben. Die Trachea wurde unmittelbar vor der Syring beprobt und ebenfalls in Tissue-Tek[®] eingebettet. Die Milz wurde wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben entnommen und gleichfalls in Tissue-Tek[®] eingebettet. Für die Herstellung von Paraffinproben wurde eine der Bouin-fixierten Lungen in vier bis fünf Transversalscheiben unterteilt (s. Kap. 2.1.6) und die andere als Primärbronchus-Längsscheibe präpariert. Zusätzlich wurde auch hier die fixierte Trachea unmittelbar vor der Syring beprobt. Aufgrund der Probenmenge wurden die Proben mit dem Einbettautomaten Microm STP 120 der Firma Thermo Scientific dehydriert und in Paraplast[®] eingebettet.

5.3 Probenverarbeitung für die Genexpressionsanalyse

5.3.1 Material

Gewebehomogenisierung und RNA-Isolierung

- Homogenisiergefäße 2 ml⁹
- Keramikkügelchen²⁶
- Trizol²⁶
- nukleasefreie 2 ml-Tubes⁹
- Chloroform³
- Isopropanol pro analysi³
- nukleasefreies Wasser²⁷
- 75%iges Ethanol (30 ml 100%iges Ethanol³ ad 40 ml Aqua dest.)

Agilent RNA 600 Nano Kit²⁸

DNase-Verdau und cDNA-Synthese

- DNase I, RNase-frei²
- 10 x reaction buffer²⁷
- EDTA²⁷
- GoScript™ Reverse Transcription System²⁷
- PCR Nucleotide Mix²⁷
- Rekombinantes RNasin Ribonuklease²⁷
- MgCl²⁷
- nukleasefreies Wasser²⁷
- 0,5 ml-Tubes, nukleasefrei⁹

Quantitative Real-Time PCR:

- nukleasefreies Wasser²⁷
- 1,5–2,0 ml-Tubes, nukleasefrei⁹

qPCR-Primer²⁹: s. Tabelle 7

Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer

Gen	forward-Sequenz	reverse-Sequenz
18 S	CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA
chB6	GATCGCCTGCCCTCCAAT	TGGCTTCCACGTCAGCTATC
AID	CGTCTGAAACCCAGCAAGAGT	TGTCCATGTCAGCTGGGTTCT

- SYBR-Green Master Mix (Promega GoTaq qPCR Master Mix)²⁷
- 98-well-qPCR-Platte³⁰
- Abdicht-Folie³⁰
- Spatel zur Folienfixierung³⁰

5.3.2 RNA-Isolation

Alle Arbeiten wurden mit RNase-freiem Einwegmaterial durchgeführt. Sämtliche Arbeitsmaterialien sowie die Arbeitsflächen wurden mit einer 10%igen SDS-Lösung (*Natriumlaurylsulfat*, *sodium lauryl sulfate*) behandelt. Für die Homogenisierung wurden die Röhren mit jeweils 1 g Keramikkügelchen befüllt. Es wurden jeweils 100 mg Gewebe pro Probe verwendet, das entsprach beiden Parenchymstanzen, der Hälfte der Trachea-Probe, von der jeweils die kaudale Hälfte genommen wurde, und den kaudalen zwei Dritteln des Primärbronchus. Die Homogenisiergefäße wurden mit 1 ml Trizol befüllt und die abgewogenen Proben in die Gefäße verbracht. Die Parenchym- und Milzproben wurden in einem zweimaligen Homogenisierungsschritt für je 10 Sekunden bei 6000 rcf und die Trachea- und Primärbronchusproben je einmal für 20 Sekunden bei 6500 rcf sowie anschließend einmal 10 Sekunden bei 6000 rcf in einem Precellys[®] 24 Homogenisator (Peqlab, VWR) aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Homogenisierungsschritten wurden die Proben sofort auf Eis verbracht und fünf Minuten gekühlt.

Zu den homogenisierten Gewebeproben wurden daraufhin jeweils 200 µl Chloroform zugegeben, 15 Sekunden geschüttelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) bei 12000 x g für 15 Minuten bei 6 °C. Vom entstandenen wässrigen Überstand wurden 600 µl abgenommen und 500 µl davon in Isopropanol überführt, geschwenkt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation bei 12000 x g für 10 Minuten bei 6 °C wurde der entstandene Überstand vom RNA-Pellet abgenommen und die Tubes kurz umgedreht auf ein sauberes Papiertuch zum Abtropfen gestellt. Dann wurde 1 ml 75%iges Ethanol zugegeben und erneut bei 7500 x g für fünf Minuten bei 6 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands und erneuter, kurzer Zentrifugation wurde der Ethanolrest möglichst vollständig abpipettiert und die Tubes zum Trocknen der Pellets 30 Minuten offen unter der PCR Arbeitsstation (peqlab, VWR) belassen. Durch Zugabe von 100 µl nukleasefreiem Wasser

wurde das RNA-Pellet resuspendiert und die Tubes für 10 Minuten zum Lösen der RNA bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die RNA im Thermoblock (Eppendorf) unter leichtem Schütteln bei 300 rpm und 58 °C inkubiert. Die RNA-Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei –80 °C gelagert.

5.3.3 Reinheitsbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentration wurde zum Ausschluss von Kontaminationen durch Phenole oder Trizol spektrophotometrisch im NanoDrop[®]-1000 (peqlab, VWR) bestimmt und mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von maximal 1000 ng/µl eingestellt. Reine RNA hat ein Absorptionsmaximum von 260 nm. Als Richtwerte für möglichst reine RNA gibt der Hersteller einen 260/280 nm-Wert von 2.0 bzw. einen 260/230 nm-Wert von 2.0 bis 2.2 an. Bei 260/280 nm-Werten von unter 1.9 bzw. 260/230 nm-Werten von unter 2.0 wurden die Proben erneut gefällt. Dazu wurde ein Volumen RNA-Lösung mit einem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen Natriumacetat gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch erneut 10 Minuten bei 12000 x g bei 6 °C zentrifugiert und die oben beschriebenen Schritte wiederholt.

Die RNA-Integritätswerte wurden mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies) bestimmt. Der Integritätswert der RNA wird als RIN (*RNA integrity number*) bezeichnet. Er gibt eine Aussage über den Grad der Fragmentierung der RNA. Ein RIN-Wert von 10 zeichnet eine qualitativ hochwertige, intakte und nicht-degradierte RNA aus. Je geringer der RIN-Wert ist, desto schlechter ist die RNA-Qualität und desto stärker die Degradierung [220]. Die Proben wurden für die Messung mithilfe von nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration 100 ng/µl eingestellt und mittels eines Agilent RNA 600 Nano Kits (Agilent Technologies) entsprechend den Herstellerangaben getestet.

Alle RNA-Proben besaßen nach Abschluss der Kontrolle durchschnittliche 260/280 nm-Werte von 2,05 und 260/230 nm-Werte von 2,08. Es wurden RIN-Werte von mindestens 7 vorausgesetzt, der durchschnittliche RIN-Wert lag bei 8.

5.3.4 cDNA-Synthese

In diesem Schritt wird die gewonnene RNA mithilfe einer Reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA, *complementary deoxyribonucleic acid*) umgeschrieben. Zunächst wurden die in den Proben enthaltenen DNasen verdaut,

um genomische DNA zu entfernen. Alle Arbeiten wurden unter einer PCR Arbeitsstation (pequalab, VWR) durchgeführt, die mit 10%iger SDS-Lösung gereinigt und durch ultraviolettes Licht dekontaminiert wurde. Dazu wurde pro Probe ein Reaktionsansatz aus 1 µg der wie oben beschrieben gewonnenen RNA und 1 µl 10 x reaction buffer mit MgCl angesetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 9 µl aufgefüllt und dann 1 µl RNase-freier DNase (1 U/µl) hinzugegeben. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 37 °C im PCR Thermocycler (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad) wurde der Reaktionsansatz sofort auf Eis gestellt, dann 1 µl 25 mM EDTA hinzugefügt und erneut für 10 Minuten bei 65 °C im PCR Thermocycler inkubiert. Für die cDNA-Synthese wurden 4,4 µl dieser DNase verdauten RNA-Lösung (entspricht 400 ng verdauter RNA) zusammen mit 1 µl Random Hexamer Primern in einem RNase-freien Reaktionsgefäß angesetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl Reaktionslösung aufgefüllt. Anschließend folgte die Inkubation im Thermocycler bei 70 °C für fünf Minuten. Der Ansatz wurde danach fünf Minuten auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Zu der RNA-Primer-Lösung wurden 10 µl eines Master Mix aus den Komponenten in Tabelle 8 hinzugefügt. Nach kurzem Mischen und Zentrifugation folgte eine 25-minütige Inkubation im Thermocycler bei 25 °C, anschließend 60 Minuten bei 42 °C und 15 Minuten bei 70 °C. Die Proben wurden danach fünf Minuten auf Eis gekühlt, kurz zentrifugiert und die cDNA bis zum Einsetzen in die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) bei -20 °C gelagert

Tabelle 8: Master Mix für je einen Ansatz zur cDNA-Synthese

GoScript TM 5 x Reaction Buffer	4 µl
MgCl (25 mM)	2 µl
PCR Nucleotide Mix	1 µl (Endkonzentration: 0,5 mM)
Rekombinantes RNasin Ribonuklease-Inhibitor (1 U/ µl Reaktionsansatzvol.)	0,5 µl
GoScript TM Reverse Transkriptase	1 µl
Nukleasefreies Wasser	Ad 10 µl

5.4 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Bei der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) werden während der Reaktion amplifizierte PCR-Produkte mittels Fluoreszenzfarbstoffdetektion in Echtzeit nach jedem Zyklus gemessen. Die Intensität nimmt durch die Amplifizierung in jedem Zyklus proportional zur Menge des PCR-Produkts zu,

sodass anhand des Fluoreszenzsignals die Konzentration der cDNA eines bestimmten Gens bestimmt werden kann. In der durchgeführten qRT-PCR kam ein Taqman-basiertes Detektionssystem zum Einsatz, das mit der Taq-Polymerase zusammenwirkt. Als Reporter Dye diente SYBR-Green, Carboxy-X-Rhodamin (CXR) als Reference Dye. Alle Arbeiten wurden unter einer PCR Arbeitsstation (pequlab, VWR) durchgeführt, die mit 10%iger SDS-Lösung gereinigt und durch Ultraviolettlicht dekontaminiert wurde. Bei den unter Kapitel 5.3.1 genannten Primer handelt es sich um selbst zusammengestellte Primer mit einer Länge von ca. 20 Nukleotiden, die durch die Firma MWG, Ebersberg synthetisiert wurden. Sie weisen eine Annealing-Temperatur von 59 °C und eine Amplikonlänge von ca. 150 Nukleotiden auf und wurden auf die Bildung von Selbst- oder Kreuz-Dimeren bzw. von Sekundärstrukturen getestet. Die Bindungseffizienz wurde in einer Standardkurve bestimmt und die Spezifität durch Sequenzierung des Amplifikats durch die Firma GATC, Konstanz überprüft. Die unter Kap. 5.3.1 genannten Primer wurden mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 5 pmol/µl verdünnt. Als Housekeeping-Gen diente 18 S rRNA. Die wie oben beschrieben hergestellte cDNA wurde 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Mithilfe des Promega qPCR-Kits wurde ein Master Mix aus unten aufgeführten Komponenten (s. Tabelle 9) angesetzt. Je 20 µl dieses Master Mix wurden in die Wells einer 96-Well-qPCR-Platte pipettiert und im Anschluss jeweils 5 µl der verdünnten cDNA in die Wells hinzugegeben. Jede Probe wurde im Duplikat angesetzt und analysiert. Die Platte wurde mit einer Folie luftblasenfrei verschlossen, kurz zentrifugiert, in das qPCR-Gerät (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems) zur Quantifizierung des gesuchten Gens eingesetzt und mit dem folgenden Temperaturprotokoll durchgeführt.

Tabelle 9: Master Mix für qRT-PCR für eine Probe

Primer sense/antisense	Je 1,5 µl (5pmol/µl), Endkonzentration 0,3 pmol/µl)
Nukleasefreies Wasser	4,25 µl
GoTaq Master Mix	12,5 µl
100 X CXR Reference Dye	0,25 µl

Tabelle 10: Temperaturprotokoll für qRT-PCR

Phase		Temperatur	Wiederholung	Zeit
Initiale Aktivierung		95 °C	1 mal	2 min
Amplifizierung	Denaturierung	95 °C	40 mal	15 s
	Annealing	59 °C		30 s
	Extension	72 °C		30 s
Schmelzkurve		95 °C	1 mal	15 s
		57 °C		30 s
		95 °C		15 s

5.5 Statistische Auswertung der Proben

Bei der qRT-PCR-Analyse wird der Zyklus angegeben, ab dem die Amplifizierung des gesuchten Gens exponentiell ansteigt. Dieser Wert wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) für jede Probe angegeben. Da jede Probe im Duplikat angesetzt wurde, wurde zunächst der Mittelwert der beiden Ct-Werte des untersuchten Gens und des Housekeeping-Gens (18 S rRNA) gebildet. Anschließend wurde der Ct-Wert des Zielgens durch Subtraktion des Ct-Wertes des Housekeeping-Gens normalisiert, wodurch sich der dCt-Wert (*delta Ct-Wert*) ergab. Es wurden jeweils Parenchym, Primärbronchus, Trachea und Milz der Impftiere (Prime und Boost) mit denen der Kontrolltiere bzw. die Prime- und Boost-Tiere miteinander verglichen. Dazu wurden die dCt-Werte aller Tiere einer Gruppe jeweils nach Gewebe zusammengefasst und der Medianwert gebildet. Dieser Wert wurde von der maximalen Zykluszahl ($40 - dCt$) abgezogen, um der Expression proportional entsprechende Werte zu erhalten. Um die Genexpressionsänderung zwischen der Prime und Boost-Gruppe untersuchen, wurden die dCt-Werte der Prime-Gruppe mit denen der Boost-Gruppe verglichen. Die statistische Auswertung und Erstellung der Grafiken erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 24.0 und dem *Mann-Whitney-U-Test*. Da untersucht werden sollte, wie hoch der Anstieg der Genexpression von Bu1 und AID bei den geimpften Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren ausfällt und somit nur in eine Richtung untersucht wurde, wurde ein einseitiger Test durchgeführt. Ein Genexpressionsanstieg von mind. 20 % wurde als relevant eingestuft. Ergebnisse mit einer einseitigen Signifikanz von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

5.6 Immunhistochemische Färbung der Proben

5.6.1 Material

Siehe Kapitel 2.5.1.

Esenserum¹⁸

rabbit-anti-NDV(La Sota)-Antiserum (*persönliche Kommunikation*)

donkey-anti-rabbit, Peroxidase-konjugiert¹⁶

5.6.2 Durchführung

Die Gefrierschnitte wurden wie unter Kapitel 2.1.7 beschrieben angefertigt und nach dem Protokoll 6 immunhistochemisch gefärbt. Nach der Blockierung mit Esenserum wurden 200 µl der nach Herstellerangaben hergestellten Impflösung (s. Kap. 5.1) 1:100 in PBS verdünnt, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal je fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden daraufhin mit dem Kaninchen-Antiserum (1:10 in PBS) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte durch einen donkey-anti-rabbit Peroxidase-konjugierten Antikörper, mit dem die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Das weitere Vorgehen entsprach dem Protokoll 6. Als Negativkontrolle – zur Kontrolle unspezifischer Bindung des Antiserums – wurde auf einen Schnitt PBS statt NDV-Impfstoff aufgetragen. Als Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindung durch den sekundären Antikörper wurde ein Schnitt mit PBS statt Antiserum – ohne NDV-Impfstoff – inkubiert und ein Schnitt zum Ausschluss unspezifischer Bindung durch den sekundären Antikörper mit NDV-Impfstoff ohne Antiserum inkubiert. Die immunhistochemische anti-Pan-Zytokeratin-Färbung wurde mit dem Dako Autostainer Link 48 der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Nach Demaskierung der Schnittpräparate mit der EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) bei 97 °C für 20 Minuten wurden die Schnitte auf 65 °C abgekühlt, mit dem EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) gewaschen und mithilfe des Programms EnVision™ FLEX High pH visualisiert sowie mit EnVision™ Hematoxylin gegengefärbt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter Kapitel 2.5.1.1 beschrieben.

V. ERGEBNISSE

1. Vitalitätskontrolle

Um die Vitalität des Lungengewebes im Rahmen des Versuchsdesigns zu überprüfen, wurde eine Vitalitätsfärbung mit Neutralrot durchgeführt. Dieses wird in die Lysosomen aufgenommen und markiert somit vitale Zellen. Die Neutralrot-Suspension wurde ca. 10 Minuten *post mortem* intratracheal appliziert und die Proben verarbeitet, wie unter Kapitel 2.1 beschrieben. Die Zellen der Zellkultur wurden nach Inkubation der Neutralrotsuspension über Nacht wie unter Kapitel 2.1 beschrieben gewaschen und die Neutralrotaufnahme ausgewertet. Die Atrienepthelien und die Luftkapillaren zeigen eine deutliche Rotfärbung. Im Bereich der Parabronchuswand sind subepithelial Zellen mit Zytoplasmafortsätzen und einer Vielzahl intrazellulärer, dunkelroter Granula zu erkennen. Auch die kultivierten Zellen zeigen eine Aufnahme von Neutralrot in die Lysosomen, wie in Form von intrazellulären dunkelroten Granula zu erkennen ist (Abbildung 17).

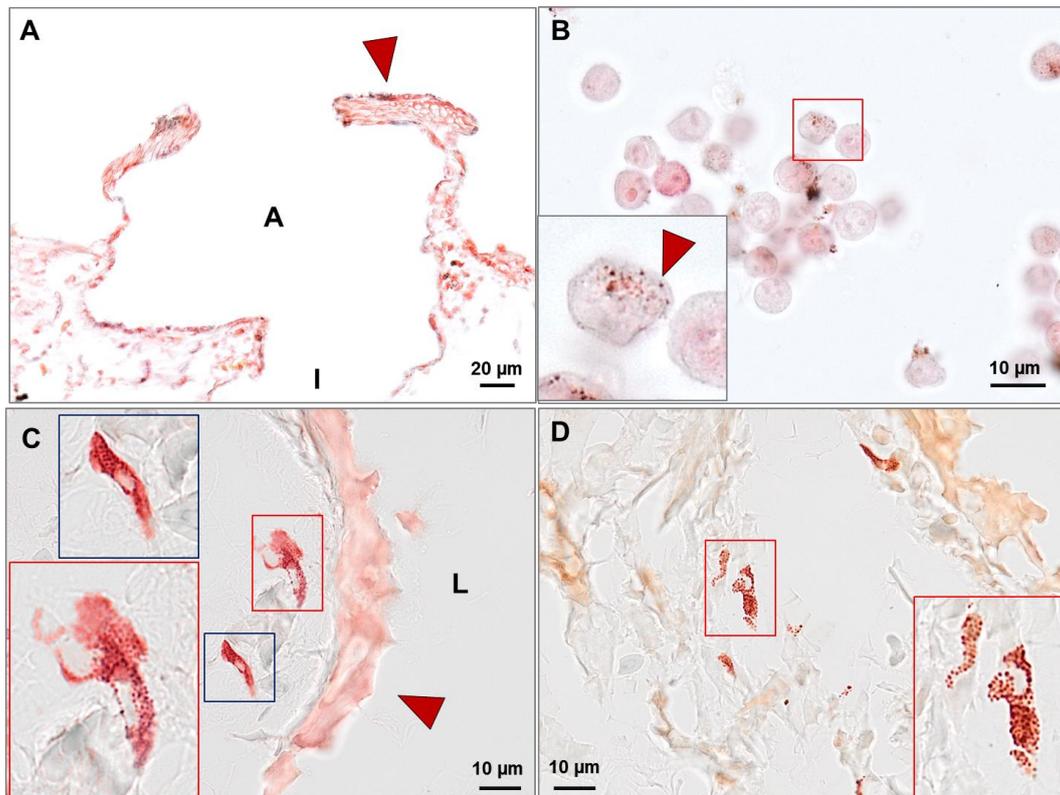


Abbildung 17: Neutralrot-Färbung. **A:** Das Atrienepithel und die darunter gelegenen Luftkapillaren sind Neutralrot⁺. Im apikalen Bereich haften dem Epithel dunkelrote Farbstoffpartikel an (Pfeil). A: Atrium, I: Infundibulum. **B:** Kultivierte Nierenzellen mit aufgenommenem Neutralrot in den Lysosomen (Pfeil im Inlay). **C:** Parabronchuswand mit Neutralrot⁺-Atrienepithel (Pfeil) und subepithelial gelegenen Zellen mit Zytoplasmafortsätzen, die Neutralrot in die Lysosomen aufgenommen haben (Inlay). **D:** Gleichartige, Neutralrot⁺-Zellen im Interstitium der Parabronchuswand (Inlay).

2. Tuscheversuche

Die verschiedenen Ansätze der Tuscheaufarbeitung und -verdünnung zeigten, dass sich die Tusche nach Anwendung des Ultraschallbades besser im Gewebe verteilte als ohne Ultraschallbad, da sie dadurch weniger zur Verklumpung neigte. Hinsichtlich der Verteilung in den luftleitenden Wegen bzw. der Aufnahme der Partikel ließen sich keine Unterschiede zwischen beiden verwendeten Tuschepräparaten finden. Das Waschen der Tusche mit PBS führte zu einer verminderten Suspension und stärkeren Verklumpung mit anschließend schlechterer Verteilung der Kohlenstoffpartikel in den luftleitenden Wegen. Hinsichtlich der Probenfixation und -einbettung lieferten die Paraffin- und GMA-eingebetteten Präparate den besten morphologischen Erhalt, jedoch fiel die immunhistochemische Färbung in Kombination mit der GMA-Einbettung negativ aus. Im Rahmen der Schnittfärbungen erwiesen sich die Färbungen mit Lichtgrün und Kernechtrot durch den Kontrast zur schwarzen Tusche im Vergleich zur HE-Färbung als besser geeignet, die Tusche im Gewebe aufzufinden. In den Versuchen mit sechzigminütiger Einwirkzeit fanden sich die Kohlenstoffpartikel aus der Tusche vermehrt im Bindegewebe zwischen den Parabronchien, die im Folgenden als interparabronchiale Septen angesprochen werden, sowie in der Nähe germinaler Zentren (GC) des Parenchyms. Auf die Verteilung der Tusche im Bereich der Atrien und des BALT hatte die Einwirkdauer keinen wesentlichen Einfluss. Im Weiteren werden die Ergebnisse aus den Tuscheversuchen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Lunge erläutert.

2.1 Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe

Es lassen sich große Ansammlungen von Kohlenstoffpartikeln im Bereich des follikelassoziierten Epithels des BALT darstellen. Der Großteil dieser Partikel haftet oberflächlich dem Epithel an, fokal finden sich aber auch intraepithelial bzw. subepithelial gelegene Kohlenstoffpartikel (Abbildung 18 C, Abbildung 19 B, Abbildung 20 C). Das nicht-BALT-assoziierte Epithel des Primärbronchus zeigt ebenfalls eine Anhaftung von Kohlenstoffpartikeln, jedoch konnten sie hier nicht in subepithelialer Lage nachgewiesen werden (Abbildung 20 D). Vereinzelt lassen sich die Partikel auch in tieferen Gewebsschichten des BALT darstellen (Abbildung 18 B, Abbildung 19 und Abbildung 20 B, C). In der Peripherie der BALT-GCs lassen sich ebenfalls kleine Kohlenstoffpartikelansammlungen darstellen, die sich insbesondere im Bereich der Bindegewebskapsel (Abbildung

18 und Abbildung 19) oder innerhalb des GCs (Abbildung 20 B) befinden. In der Nähe dieser Partikelansammlungen finden sich nach immunhistochemischer Färbung vor allem KUL01⁺-Zellen (Abbildung 21).

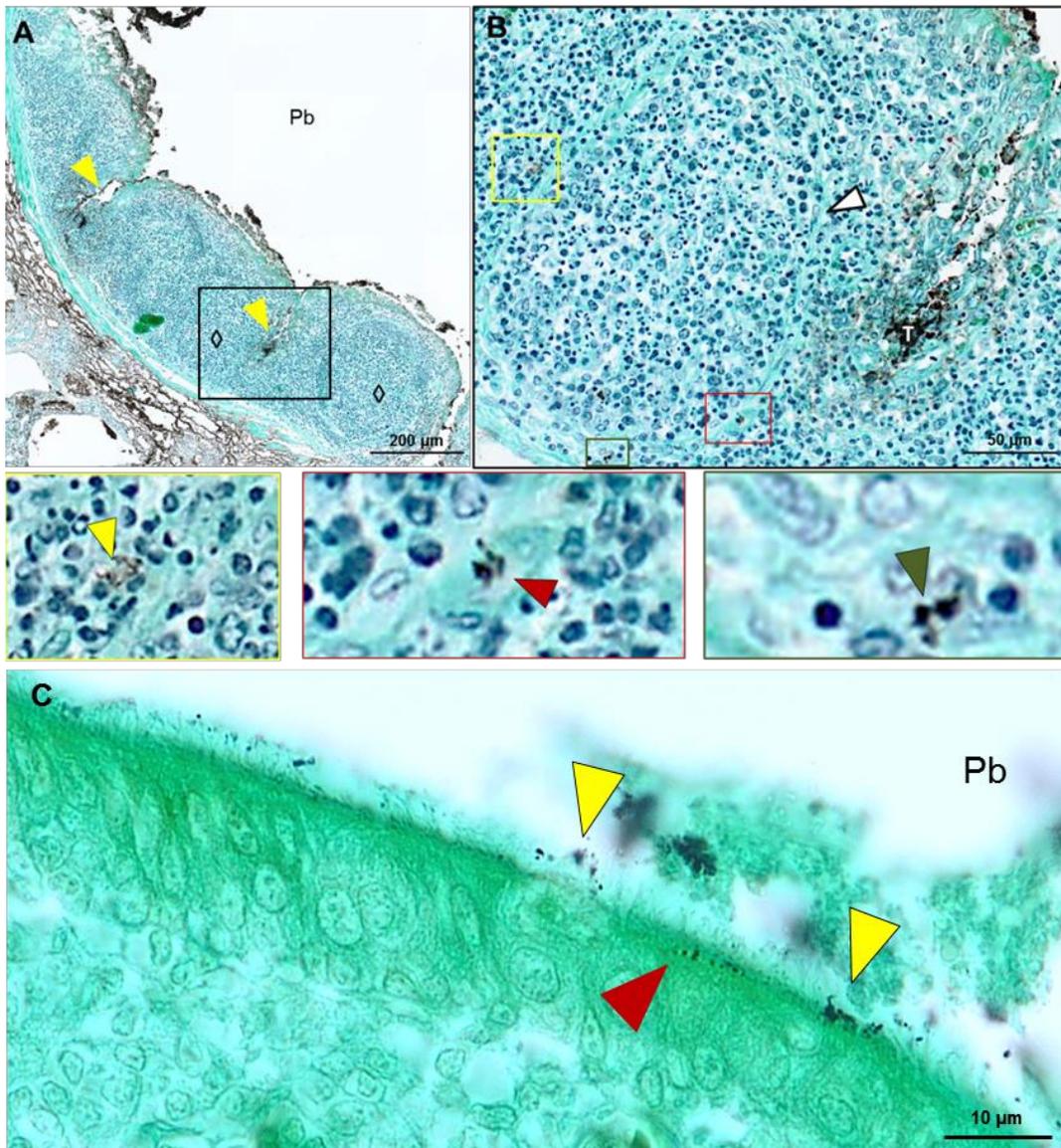


Abbildung 18: BALT-Serienschnitt aus T3/3, Bereich wie Abbildung 19. **A:** BALT-Region mit GCs (◇). Die Tusche haftet der BALT-Epitheloberfläche an und ist auch in der Schleimhaut-einfaltung sichtbar (Pfeile). **B:** Vergrößerung aus A (schwarzes Rechteck). Die Kohlenstoffpartikel befinden sich lumenseitig am Boden der Falte (T) sowie in unterschiedlicher Tiefe innerhalb des BALT. Einzelne Kohlenstoffpartikel erreichen die Bindegewebskapsel (weißer Pfeil) des GCs (s. Vergrößerungen der markierten Rechtecke). **C:** BALT, Kohlenstoffpartikel haften dem FAE an (gelbe Pfeile) und befinden sich intraepithelial (roter Pfeil). Pb: Primärbronchus, Lichtgrün-Färbung, T3/3 (A, B) und T3/2 (C), jeweils 60 min p. a.

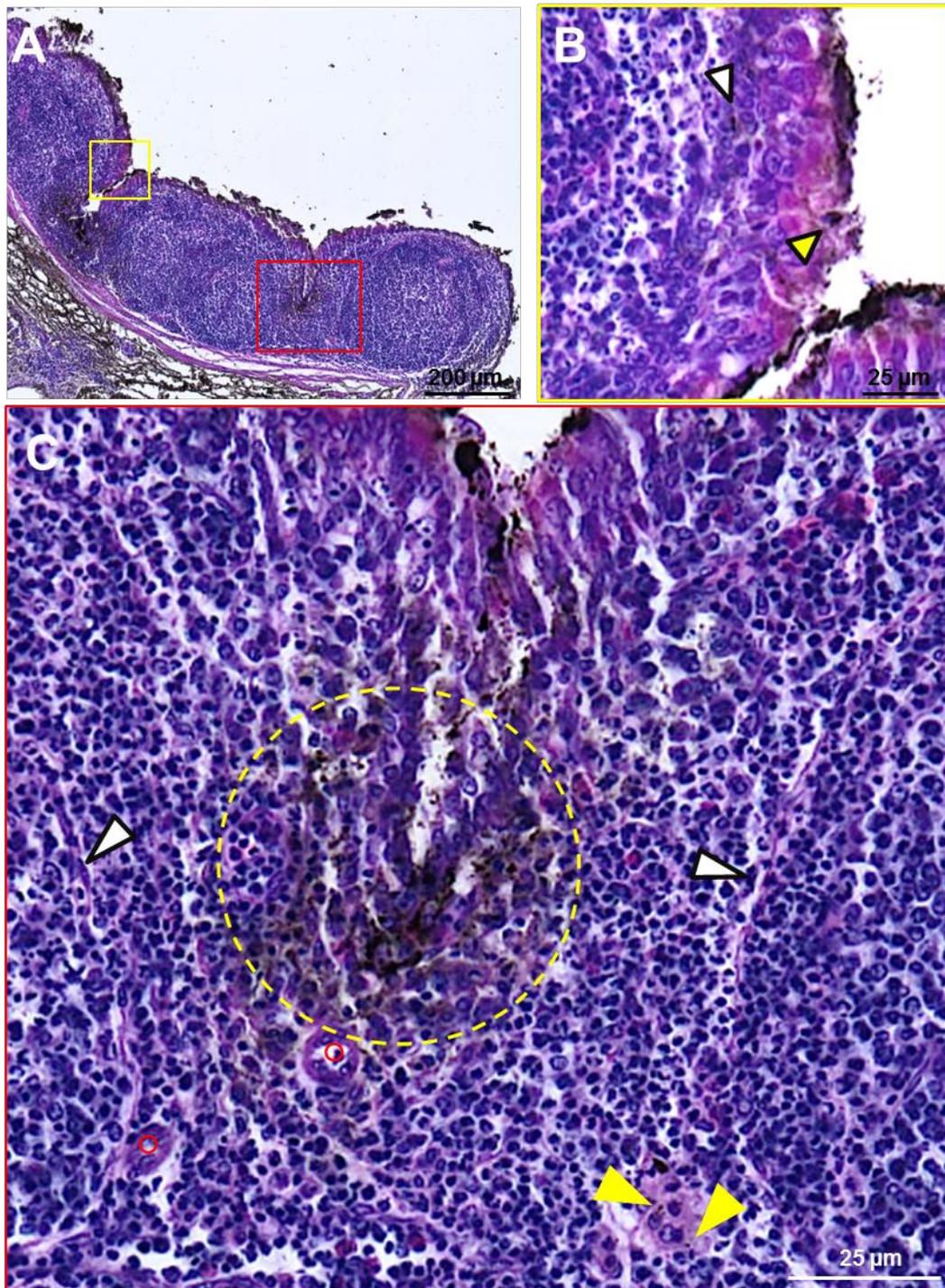


Abbildung 19: Primärbronchus mit BALT im Querschnitt (A) mit Schleimhautfalten des FAE (gelbe und rote Rechtecke). B: Vergrößerung aus A (gelbes Rechteck). Kohlenstoffpartikel liegen dem Epithel auf, einzelne Partikel finden sich intraepithelial (gelber Pfeil) und subepithelial (weißer Pfeil). C: Vergrößerung aus A (rotes Rechteck). Das Epithel weist entlang der Schleimhautfalte eine deutliche Tuschaufnahme auf. Die Kohlenstoffpartikel befinden sich sowohl extrazellulär als auch intrazellulär (gestrichelter Kreis). In unmittelbare Nähe zum GC sind Zellen mit breitem Zytoplasmasaum zu erkennen, die Tusche enthalten (gelbe Pfeile). Weiße Pfeile: Bindegewebskapsel der benachbarten GCs, ○: kleine Blutkapillaren, HE, T3/3, 60 min p.a.

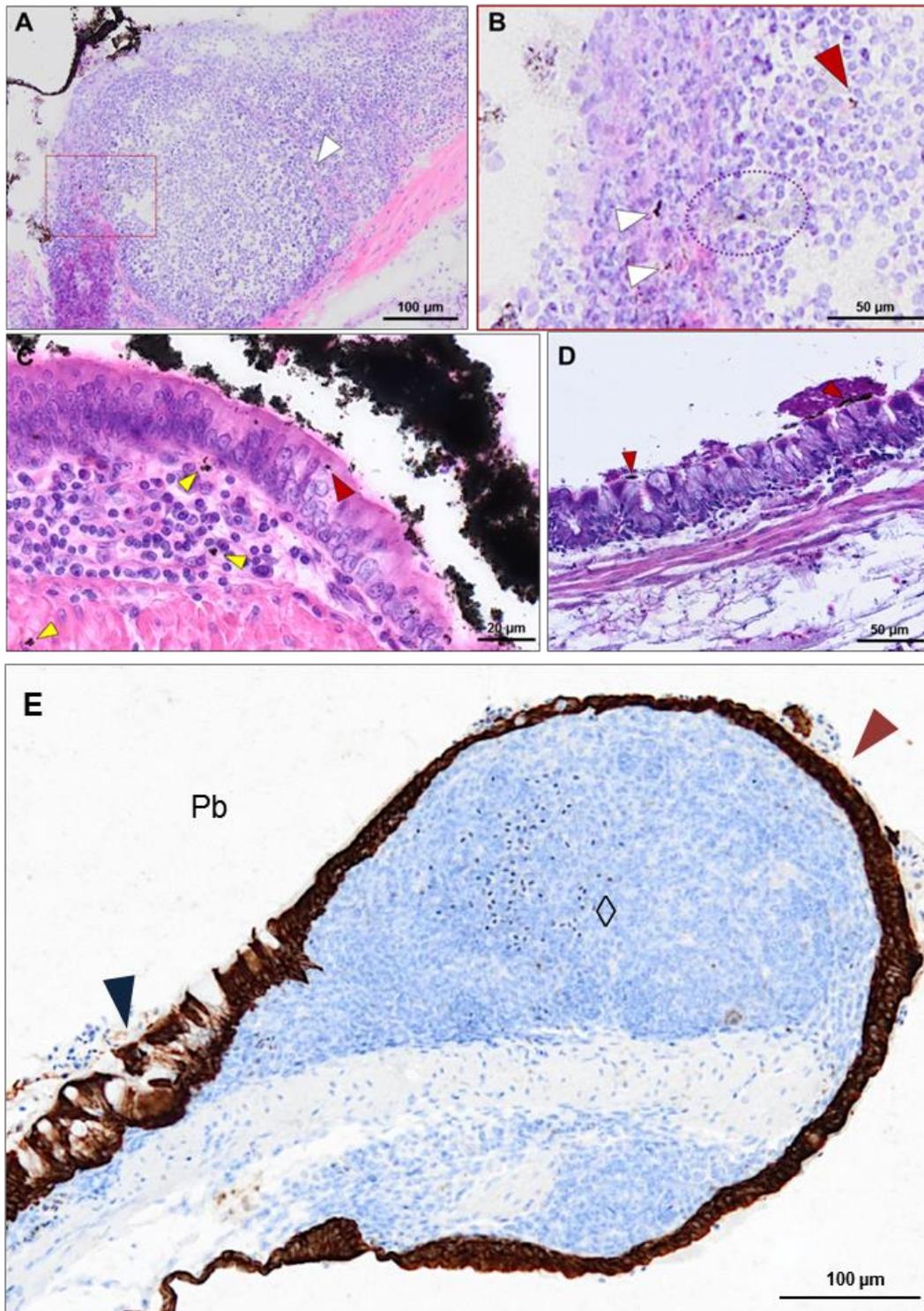


Abbildung 20: Primärbronchus mit BALT. **A:** BALT-GC mit angedeuteter Bindegewebskapsel (Pfeil). **B:** Vergrößerung aus A. Die Kohlenstoffpartikel liegen sowohl außerhalb der GC-Kapsel (weiße Pfeile) als auch innerhalb des GCs (roter Pfeil). Nahe der Kapsel findet sich innerhalb des GCs ein unscharf begrenzter Bereich mit feinen dunklen Partikeln (gestrichelter Kreis). **C:** Im Randbereich angeschnittenes BALT mit hochprismatischem Flimmerepithel. Im Lumen finden sich große Ansammlungen von Tusche. Einzelne Kohlenstoffpartikel befinden sich intraepithelial (roter Pfeil) und auch in tieferen Gewebsschichten (gelbe Pfeile). **D:** Becherzellentragendes und muzinproduzierendes Epithel des Primärbronchus in einiger Entfernung des BALT. Die Tusche ist teilweise von Muzin bedeckt (rote Pfeile) und liegt der Oberfläche auf. Kohlenstoffpartikel in tieferen Gewebsschichten sind nicht darstellbar. **E:** Das respiratorische Epithel (blauer Pfeil) und das FAE (roter Pfeil) des BALT (◇) sind anti-Pan-Zytokeratin⁺. HE, T9, 10 min p. a. (A), T3, 60 min p. a. (C). T3/2, 60 min p.a. (D), Boost-Tier des NDV-Versuchs (E).

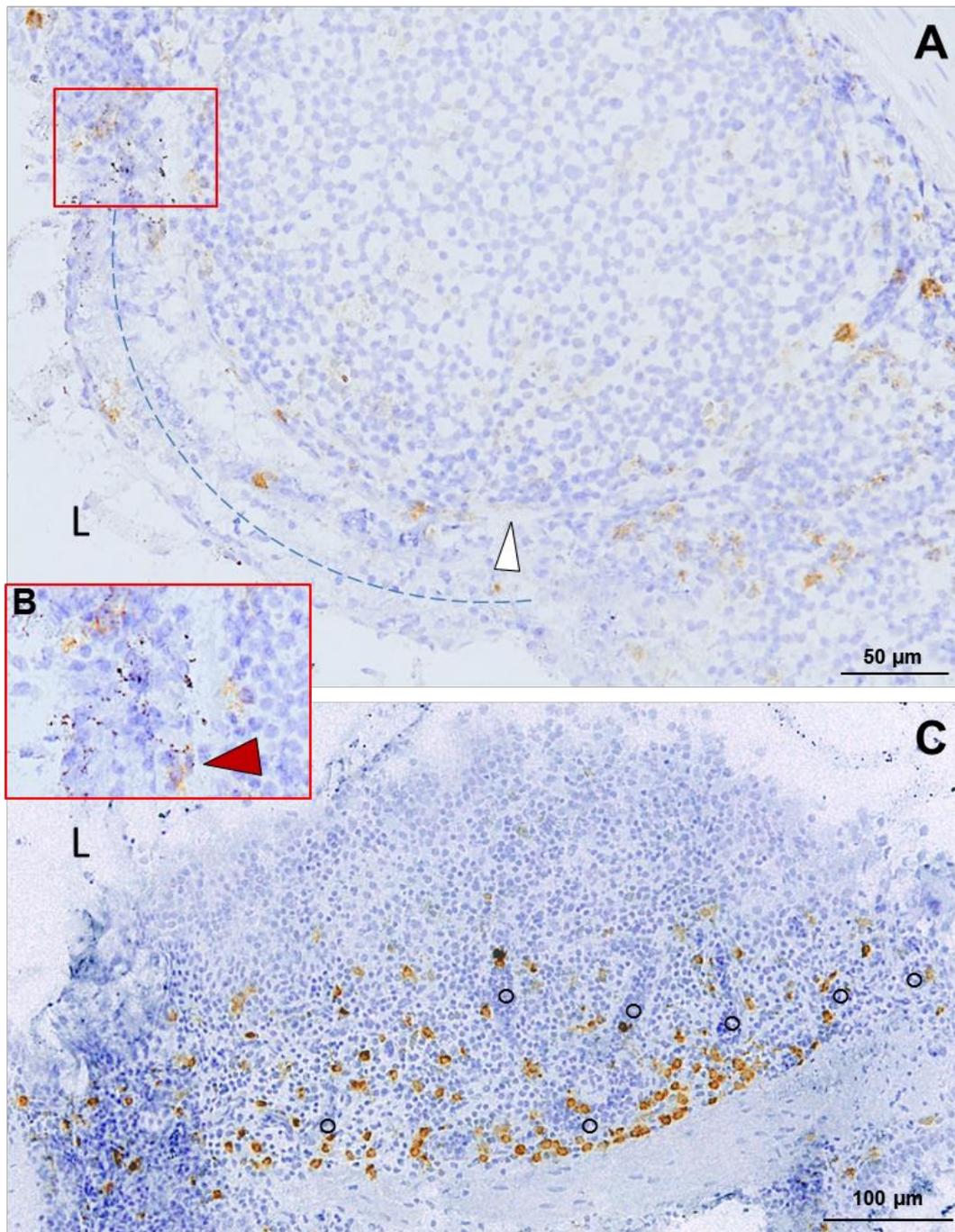


Abbildung 21: BALT-Querschnitt, KUL01-Färbung. **A:** Keimzentrum des BALT mit deutlicher Kapsel (weißer Pfeil). In der Peripherie des GCs finden sich braun gefärbte, KUL01⁺-Zellen in lockerer Verteilung. Fokal lassen sich Kohlenstoffpartikel erkennen, die sowohl auf dem Epithel (gestrichelte Linie) als auch intrapithelial lokalisiert sind und teilweise bis an die Kapsel des GCs reichen (rotes Rechteck). **B:** Vergrößerung aus A. In der unmittelbaren Umgebung der Kohlenstoffpartikel finden sich KUL01⁺-Zellen (roter Pfeil). **C:** BALT im Querschnitt ohne erkennbares Keimzentrum. Die Dichte der KUL01⁺-Zellen ist im Bereich der kleinen Blutgefäße (○) des BALT am größten und nimmt zum Lumen (L) hin ab. T9 (C), T7 (A, B), 10 min p. a.

2.2 Extrabronchiales Gewebe

Das extrabronchiale Gewebe umfasst die Parabronchienwand mit den Atrien und Infundibula, des Weiteren die Luftkapillaren, die interparabronchialen Septen und Zwickel (Berührungspunkt dreier benachbarter Parabronchien) sowie die Blutgefäße. Im Bereich der Atrien werden dabei der apikale Bereich des Atrienseptums mit glatter Muskulatur und die Atrienbasis (basaler Abschnitt des Atrienseptums) unterschieden. Die Ergebnisse aus den Versuchen werden im Folgenden entsprechend dieser Reihenfolge besprochen. In diesem Zusammenhang werden auch die GCs besprochen, die vor allem in der Parabronchuswand und in den Zwickeln gefunden werden können.

2.2.1 Atrien

Sowohl in den Gefrier-, Paraffin- als auch GMA-Schnittpräparaten finden sich regelmäßig Tuscheartikel, die an der Oberfläche der Atriensepten und Atrienbasis anhaften. Das Atrienepithel stellt sich bei mehreren Tieren in den tuschepositiven Bereichen insgesamt als sehr reaktiv dar, insbesondere am basalen Rand des Atrienseptums sind Zellen mit breitem, aufgehelltem Zytoplasmasaum darstellbar. Bei näherer Betrachtung dieses Bereichs können Kohlenstoffpartikel auch in intrazellulärer Lage beobachtet werden (Abbildung 22). Die Anhaftung der Partikel nimmt zum Infundibulum hin stets ab. Kohlenstoffpartikelansammlungen lassen sich auch subepithelial im Bereich der Basis der Atriensepten darstellen, wie im Querschnitt deutlich zu erkennen ist (Abbildung 23 C, D). In der immunhistochemischen Färbung mit KUL01, einem Makrophagen- und dendritische Zellen-Marker, finden sich sowohl unter dem Epithel im Bereich des Infundibulums als auch in den atrialen Septen lokalisierte, positive Zellen. Diese zeigen immer wieder eine Kolo-kalisation mit den Kohlenstoffpartikeln, einige dieser KUL01⁺-Zellen zeigen mit Tusche angefüllte Phago-lisosomen (Abbildung 24 A). Auch subepithelial im Bereich der Atrienbasis sowie im interparabronchialen Bindegewebe finden sich KUL01⁺-Zellen, die Tuscheartikel aufgenommen haben (Abbildung 23 E, F, Abbildung 24).

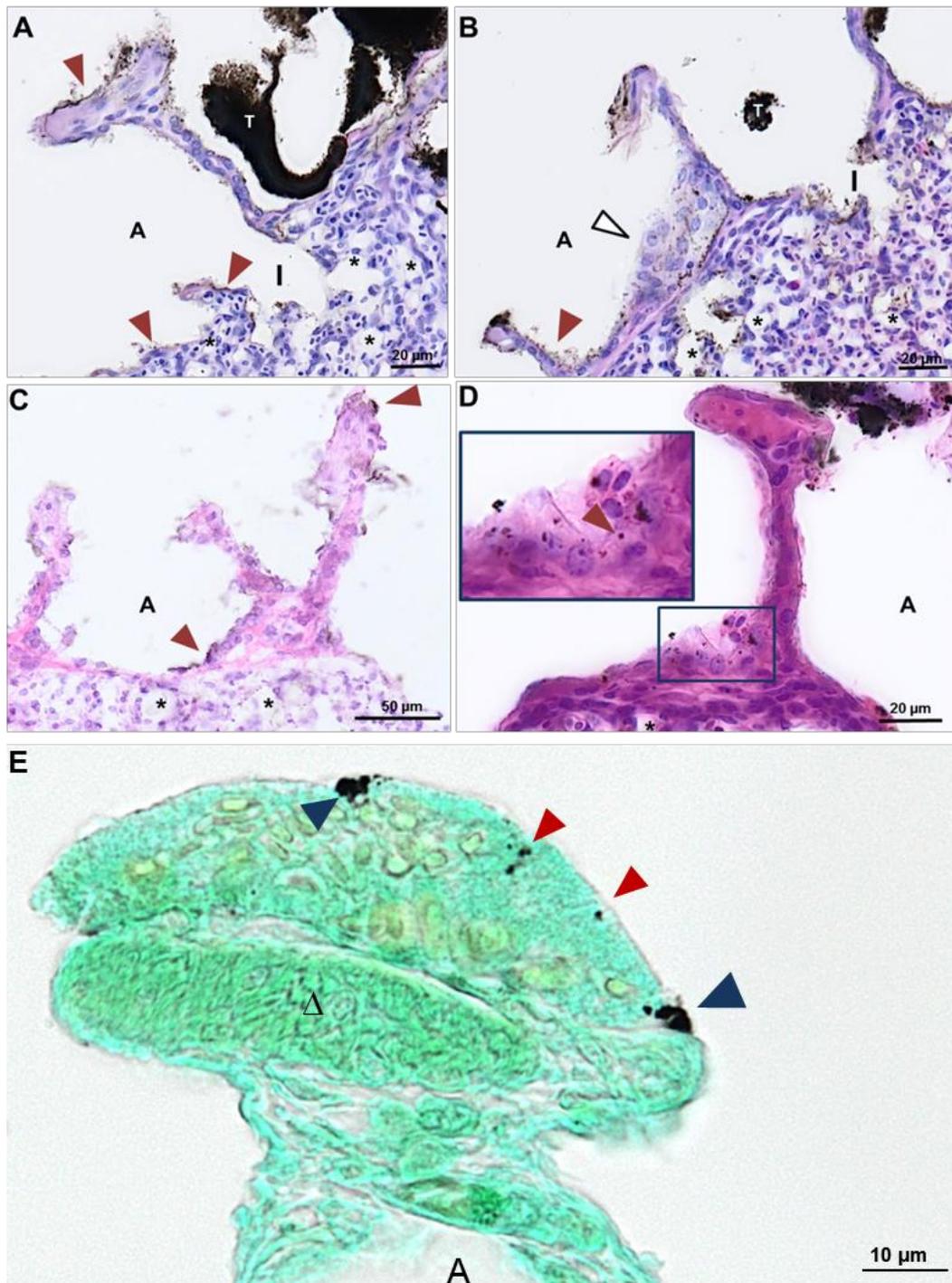


Abbildung 22: Atrienbereich aus drei verschiedenen Tuscheversuchen. **A:** Tuscheanhaftung (Pfeile) im Bereich des Atrien- und Infundibularepithels (I). **B:** Anderer Ausschnitt aus demselben Versuch (T4). Auch hier haften die Kohlenstoffpartikel dem Atrien- und Infundibulumepithel an (roter Pfeil). An der Atrienbasis finden sich hochreaktive Zellen mit breitem, hellem Zytoplasmasaum (weißer Pfeil). Im Zellinneren sind Kohlenstoffpartikel sichtbar. **C:** Kohlenstoffpartikel der Tusche haften dem Epithel der Atriensepten und -basis an (Pfeile). **D:** Auch hier finden sich nahe dem Atrienseptum Zellen mit breitem, hellem Zytoplasmasaum mit einzelnen, intrazellulären Kohlenstoffpartikeln (Inlay, Pfeil). **A–D:** HE. **E:** Apikaler Bereich des Atrienseptums. Kohlenstoffpartikel haften dem Atrienepithel an (blaue Pfeile) und wurden fokal aufgenommen (rote Pfeile), Lichtgrün. *: Luftkapillaren, A: Atrium, I: Infundibulum, Δ : glatte Muskulatur, T: Tusche im Lumen, HE. T4, 3 min p. a. (A, B), T7, 10 min p. a. (C), T3, 60 min p. a. (D), T3/3, 60 min p. a. (E)

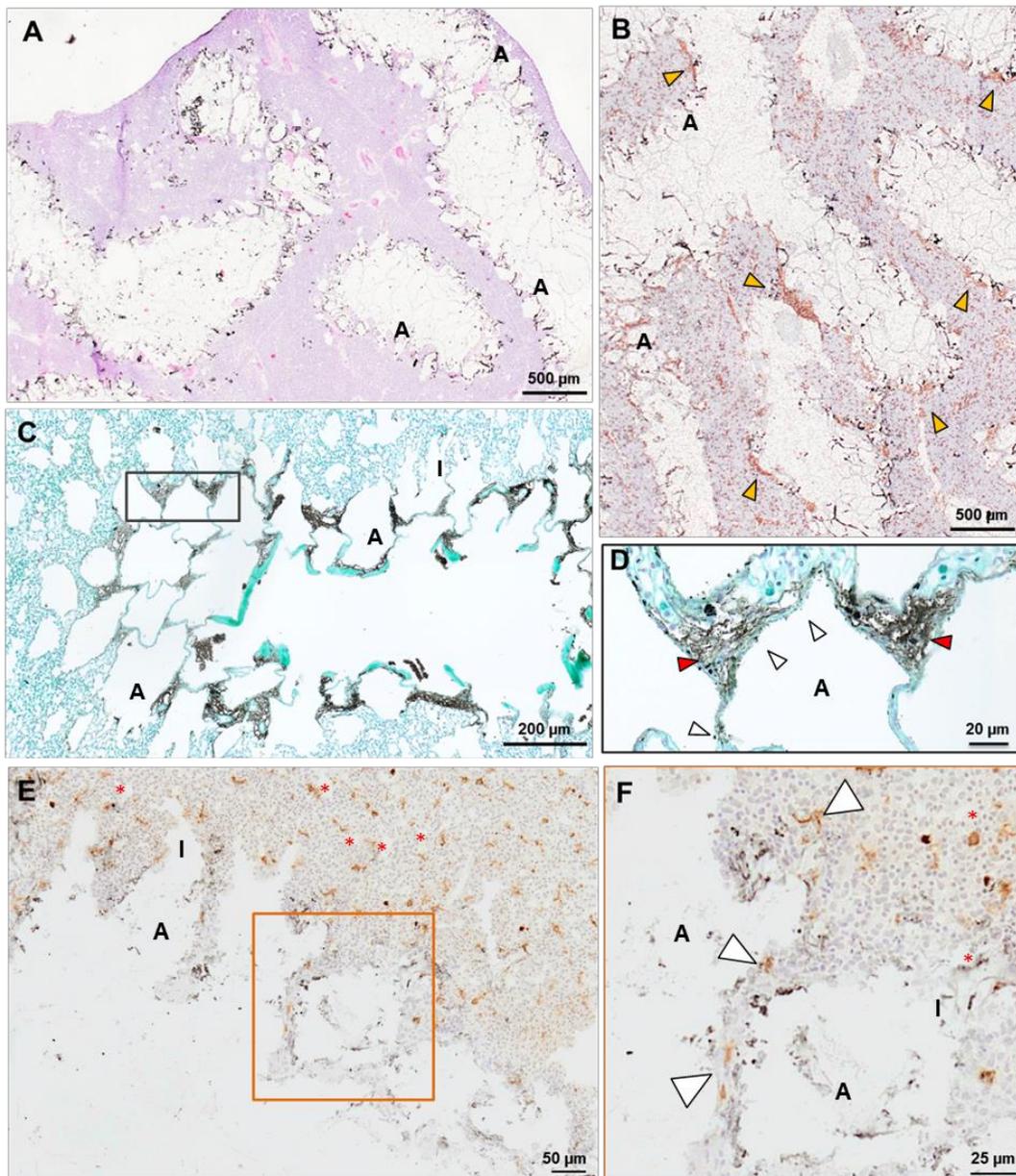


Abbildung 23: Parabronchien, Übersicht und Vergrößerung. **A:** Deutliche Tuscheansammlung im Bereich der Atrien (A). Das Lumen ist mit Agarose gefüllt, HE. **B:** Im subepithelialen Bereich der Atrien (A) finden sich vermehrt Leukozyten (Pfeile), anti-CD45-Färbung. **C:** Queranschnitt eines Parabronchus. Die Kohlenstoffpartikel aus der Tuschesuspension finden sich vor allem innerhalb der Atriensepten im Bereich der Atrienbasis (schwarzes Rechteck), während im Lumen nur wenig freie Tusche sichtbar ist, Lichtgrün. **D:** Ausschnitt aus C (schwarzes Rechteck). Deutliche Anreicherung der Kohlenstoffpartikel innerhalb der Atriensepten im Bereich der Atrienbasis (rote Pfeile) sowie Anhaftung am Atrienepithel (weiße Pfeile). **E:** KUL01⁺-Zellen im Bereich der Atrien und Luftkapillaren (*). **F:** Ausschnitt aus E (orangenes Rechteck). Die Tusche haftet dem Atrienepithel an und befindet sich subepithelial. Die weißen Pfeile markieren KUL01⁺-Zellen mit engem Kontakt zu den Kohlenstoffpartikeln. A: Atrium, I: Infundibulum. T9, 10 min p. a. (A, B), T3/3, 60 min p. a. (C, D). T7, 10 min p. a. (E, F).

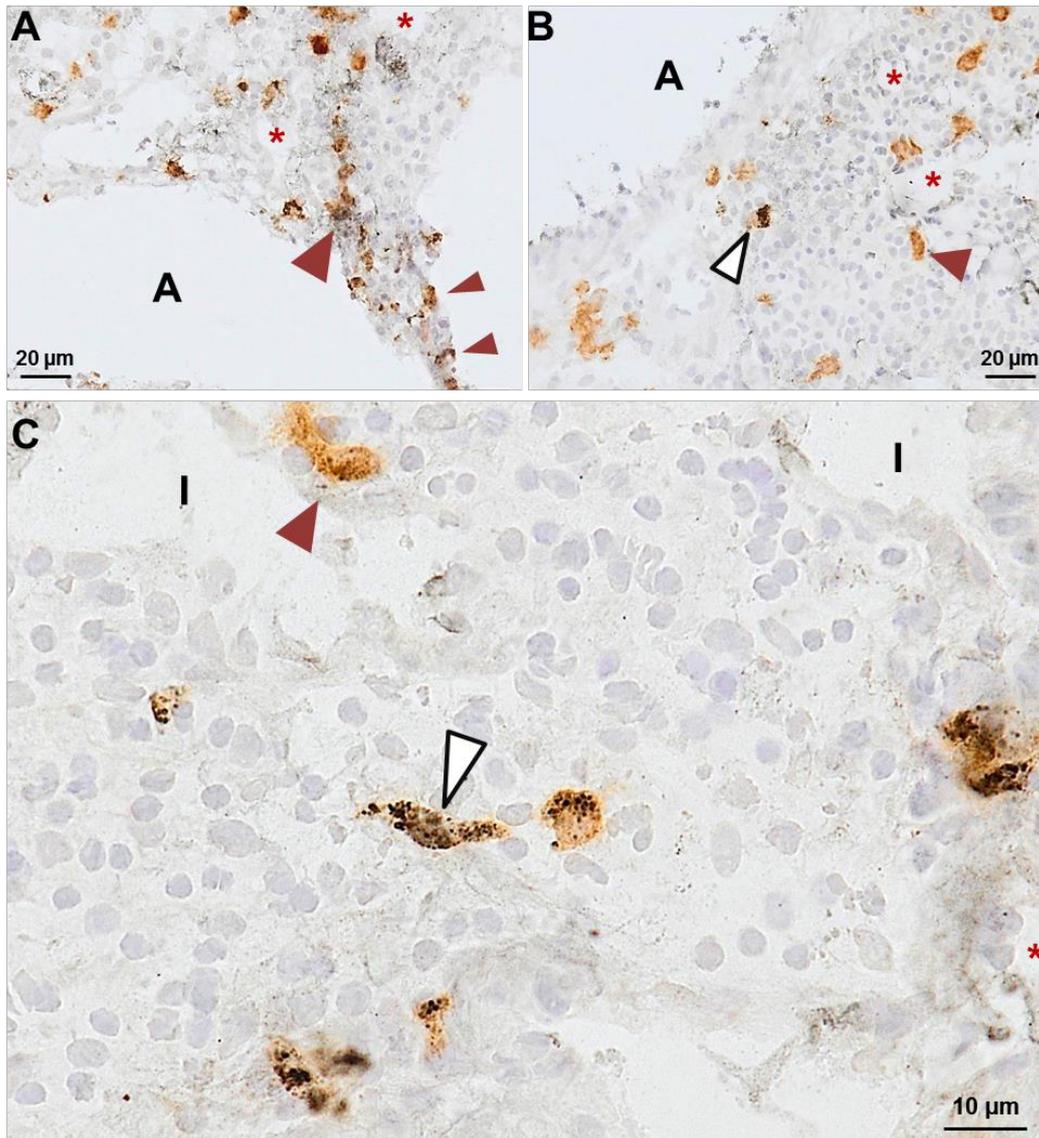


Abbildung 24: Immunhistochemische KUL01-Färbung. **A:** Im Atrienseptum und im Bereich der Luftkapillaren (*) sind KUL01⁺-Zellen dargestellt, deren Zytoplasma Kohlenstoffpartikel enthält (großer Pfeil). Einige der KUL01⁺-Zellen befinden sich unmittelbar unter der Epitheloberfläche (kleine Pfeile). **B:** Verteilung der KUL01⁺-Zellen im Bereich der Parabronchuswand. Der weiße Pfeil kennzeichnet eine KUL01⁺-Zelle mit deutlich phagozytierten Kohlenstoffpartikeln. Roter Pfeil: KUL01⁺-Zelle ohne Kohlenstoffpartikel. **C:** Parabronchuswand mit angeschnittenen Infundibula (I). Die KUL01⁺-Zellen enthalten große Mengen von Kohlenstoffpartikeln und lassen deutliche Fortsätze erkennen, die typisch für Makrophagen und DCs (dendritische Zellen) sind (weißer Pfeil). In der Nähe ist eine KUL01⁺-Zelle ohne schwarze Partikel zu sehen (roter Pfeil). A: Atrium, T7, 10 min p. a.

2.2.2 Interparabronchiale Septen und Zwickel

Die Kohlenstoffpartikel lassen sich sowohl in den Gefrierschnitten als auch Paraffinschnitten in den interparabronchialen Septen (IPBS) wiederfinden und zeigen insbesondere in den Versuchen mit längerer Tuscheverweildauer eine straßenartige Verteilung entlang der IPBS. Die Septen sind je nach Einwirkdauer unterschiedlich stark beladen und zeigen nach 60 Minuten die stärkste Tuscheanreicherung. Am deutlichsten wird diese Verteilung in den Lichtgrün- und Kernechtrot-gefärbten Schnittpräparaten. In den Zwickeln, den Berührungspunkten dreier benachbarter Parabronchien, lässt sich eine vermehrte Ansammlung um die dort befindlichen Blutgefäße feststellen (Abbildung 25 A, Abbildung 26 A und C).

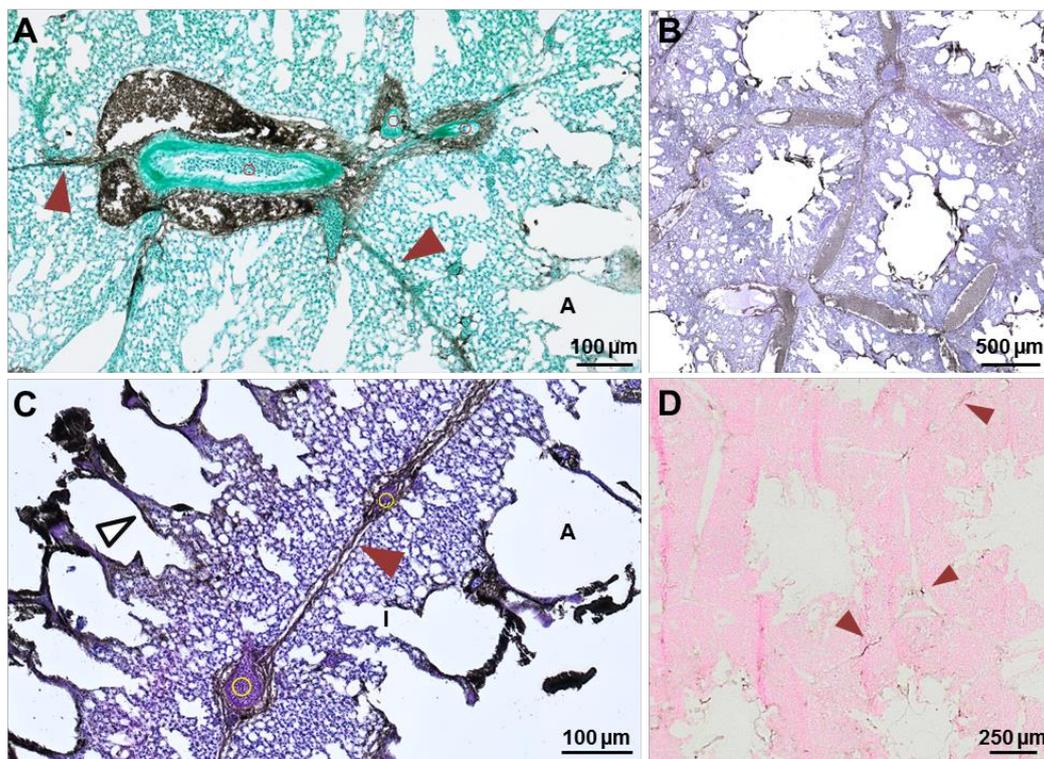


Abbildung 25: Interparabronchiale Septen und Zwickel. **A:** Zwickelbereich, die Kohlenstoffpartikel befinden sich v. a. in den IPBS (rote Pfeile) und reichern sich besonders um die Blutgefäße (○) an, Lichtgrün. **B:** Starke Ansammlung der Tusche in den IPBS, HE. **C:** Dem Atrium- und Infundibularepithel (I) haftet Tusche an und lässt sich in den IPBS (roter Pfeil) sowie um Blutgefäße (○) darstellen, HE. **D:** Auch nach 10 Minuten finden sich in den Gefrierschnitten der agarosegefüllten Lunge Kohlenstoffpartikel im Bereich der IPBS (Pfeile), Kernechtrot. A: Atrium, T3/3, 60 min p. a. (A–C). T7, 10 min p. a. (D).

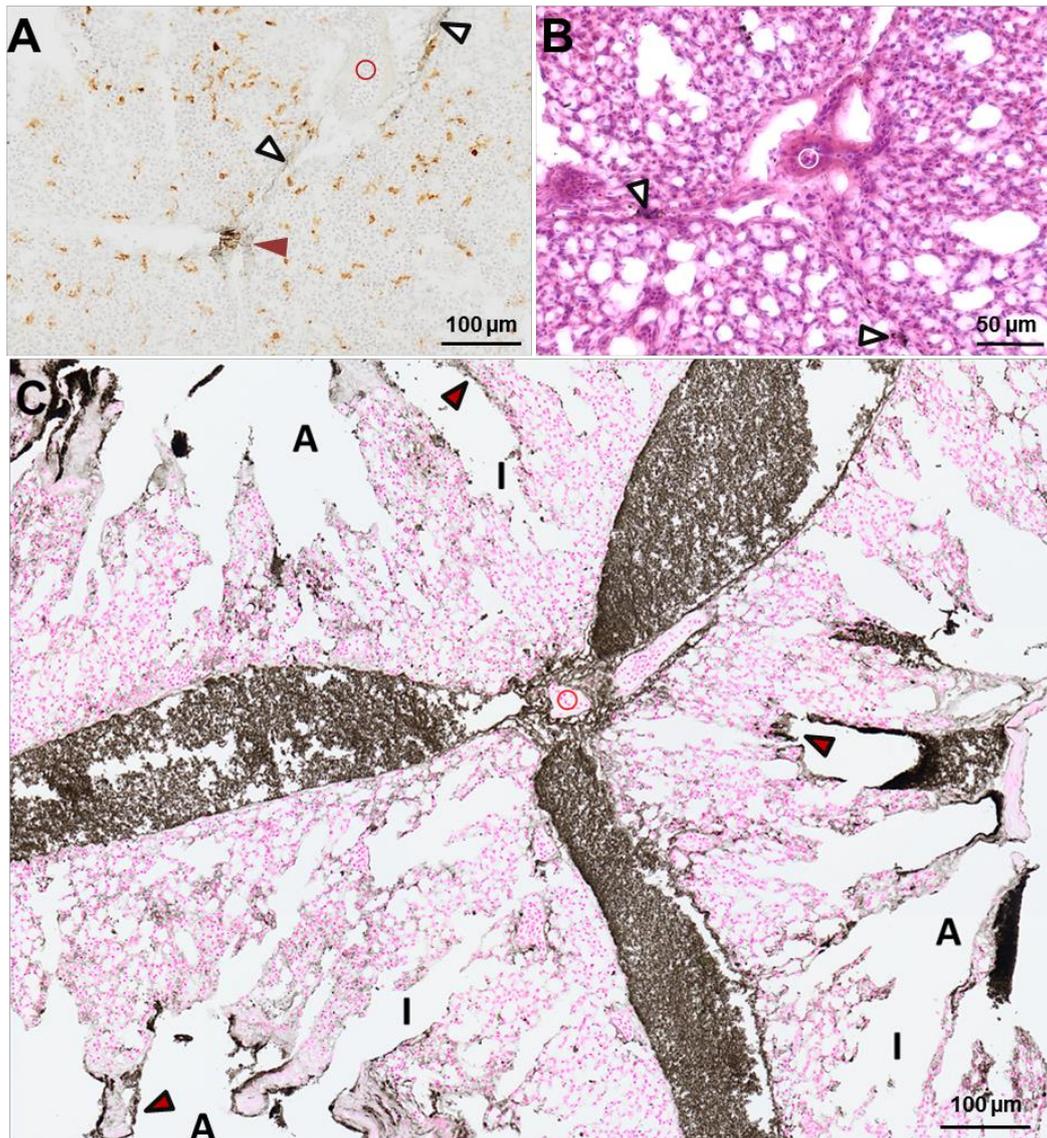


Abbildung 26: Zwickelbereich. **A:** Kleine Ansammlung von Kohlenstoffpartikeln, in deren unmittelbarer Nähe sich auch KUL01⁺-Zellen befinden (roter Pfeil). Im geweiteten Septum ist ein Blutgefäß (○) dargestellt. Am Rand des Septums befinden sich Kohlenstoffpartikel (weiße Pfeile), KUL01-Färbung. **B:** Zwickelbereich mit zentralem, kleinem Blutgefäß (○) und einzelnen Kohlenstoffpartikelansammlungen innerhalb der IPBS (Pfeile), HE. **C:** Tusche haftet dem Atrien- und Infundibularepithel an (Pfeile) und große Mengen der Kohlenstoffpartikel befinden sich in den IPBS, Kernechtrot. A: Atrium, I: Infundibulum. T7, 10 min p. a. (A), T3, 60 min p. a. (B), T3/3, 60 min p. a. (C).

2.2.3 Blutgefäße

Kohlenstoffpartikel können in geringer Menge in den kleinen Blutgefäßen im Bereich der Zwickel und IPBS (Abbildung 27 A, B, E) sowie in den größeren Venen gefunden werden (Abbildung 27 C, D, F). Die Partikel besitzen dabei meist Endothelkontakt, vereinzelt befinden sie sich auch innerhalb der Blutgefäßwand oder sie liegen dieser unmittelbar auf. Die beschriebenen Lokalisationen waren vor allem in den Versuchen mit längerer Einwirkzeit zu finden, sie konnten aber auch bei kürzerer Einwirkdauer beobachtet werden.

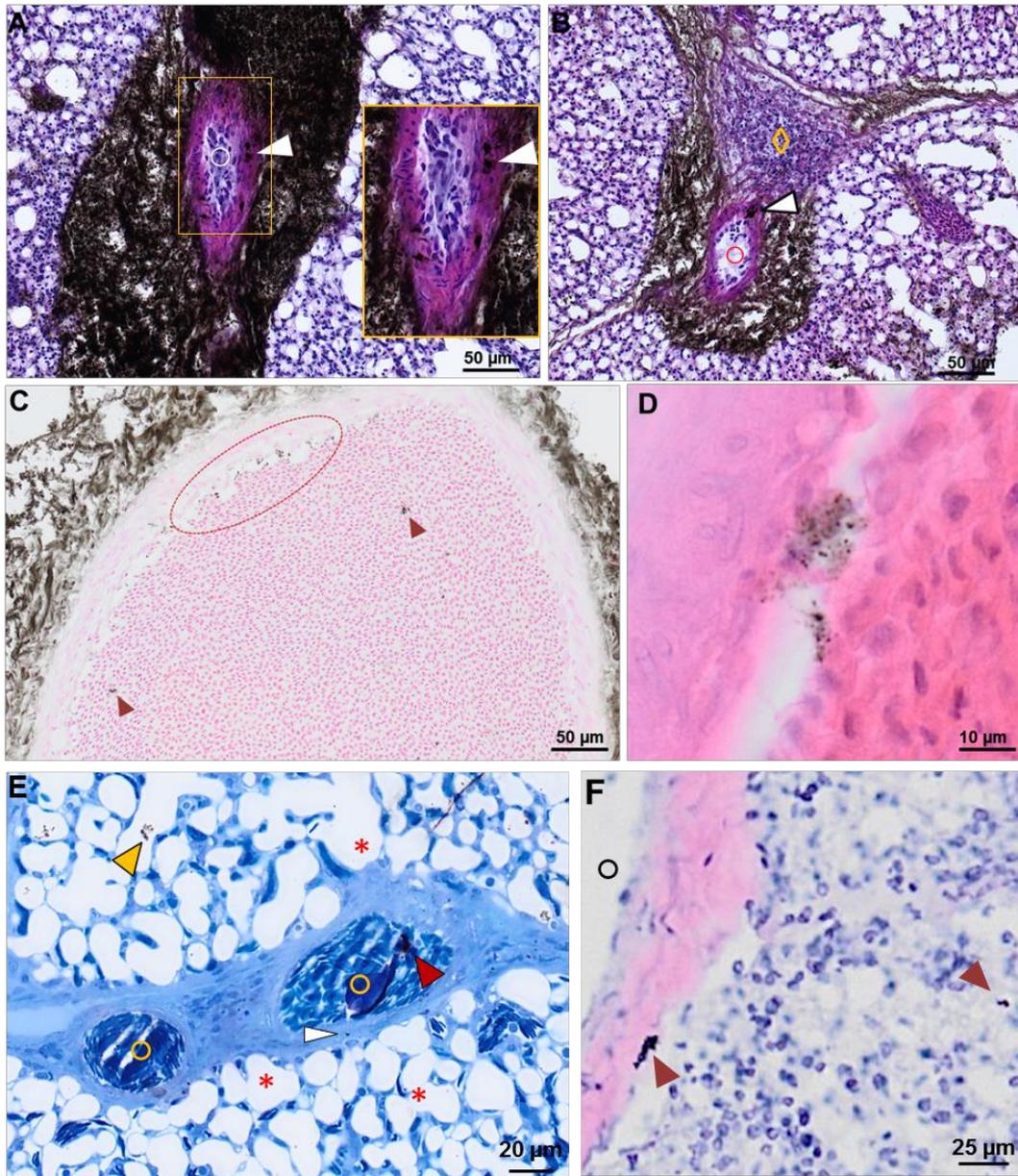


Abbildung 27: Extrabronchiale Blutgefäße, Zwickel und IPBS. **A:** Dilatiertes IPBS mit kleinem Blutgefäß (○). Die Kohlenstoffpartikel reichern sich in großen Mengen im IPBS an und sind auch innerhalb der Blutgefäßwand zu finden (Inlay, Pfeil), HE **B:** Zwickelbereich mit Lymphozyten-Infiltrat (◇) in unmittelbarer Nähe des Blutgefäßes. Die Septen sind mit Kohlenstoffpartikeln gefüllt. Fokal sind diese auch innerhalb der Blutgefäßwand (Pfeil) zu finden, HE. **C:** Tusche befindet sich im IPBS sowie im Lumen (Pfeile) und besitzt herdförmig engen Endothelkontakt (ovale Markierung), Kernechtrot. **D:** Kohlenstoffpartikel sind in einer größeren Vene zwischen Endothel (links) und Erythrozyten (rechts) nachweisbar, HE. **E:** IPBS mit zwei kleinen Blutgefäßen (○) und benachbartem gasaustauschendem Gewebe (*). Tuschepartikel liegen in mehreren Luftkapillaren (*, gelber Pfeil) und sind sowohl im IPBS (weißer Pfeil) als auch im Lumen des Blutgefäßes (roter Pfeil) nachweisbar, Richardson. **F:** Kohlenstoffpartikel befinden sich innerhalb der Blutgefäßwand (linker Pfeil) und sind im Parenchym darstellbar (rechter Pfeil), HE. T3/3, 60 min p. a. (A, B, C), GMA-1, 10 min p. a. (D), T10, 5 min p. a. (E), T5, 5 min p. a. (F).

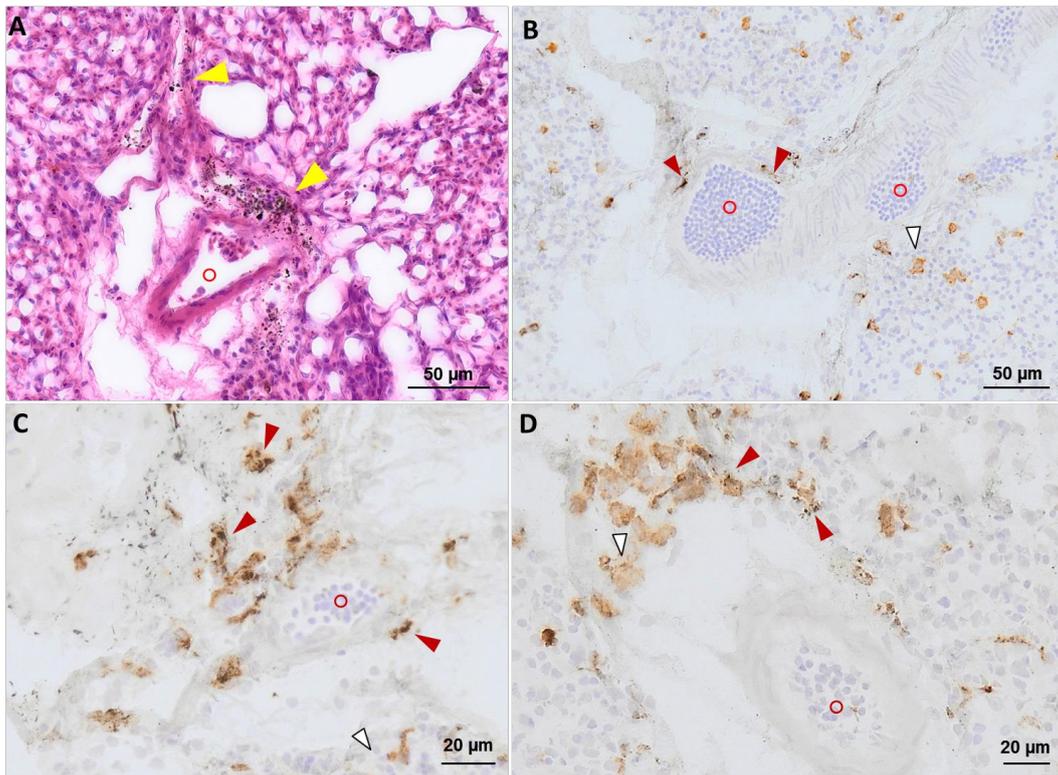


Abbildung 28: Zwickel und IPBS. **A:** Die Kohlenstoffpartikel sind in den IPBS zu finden (Pfeile) und sammeln sich im Bereich des Blutgefäßes an (\circ), HE. **B-D:** KUL01-Färbung. Dargestellt sind jeweils IPBS bzw. Zwickel mit Kohlenstoffpartikeln und KUL01⁺-Zellen. Einige der KUL01⁺-Zellen enthalten Kohlenstoffpartikel und liegen entweder der Blutgefäßwand unmittelbar auf oder darin (rote Pfeile). Daneben finden sich auch KUL01⁺-Zellen ohne phagozytierte Tusche (weiße Pfeile). T3, 60 min p. a. (A), T7, 10 min p. a. (B-D).

2.2.4 Germinale Zentren der Parabronchien

Kohlenstoffpartikel sind im Randbereich und selten auch innerhalb der GCs zu finden (Abbildung 29 A). Bei stärkerer Vergrößerung sind in diesen Bereichen einzelne Zellen identifizierbar, deren Zytoplasma mit großen Mengen schwarzer Partikel gefüllt ist (Abbildung 29 D). Bei einem Tier konnte im Bereich des Parenchyms eine Ansammlung lymphoider Follikel bzw. GCs in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gefunden werden. Bei stärkerer Vergrößerung sind mehrkernige Zellen mit breitem Zytoplasma zu erkennen, die morphologische Ähnlichkeit mit mehrkernigen Riesenzellen besitzen. Im Randbereich dieser Zellgruppe sind intrazellulär Kohlenstoffpartikel sichtbar (s. Abbildung 29 A).

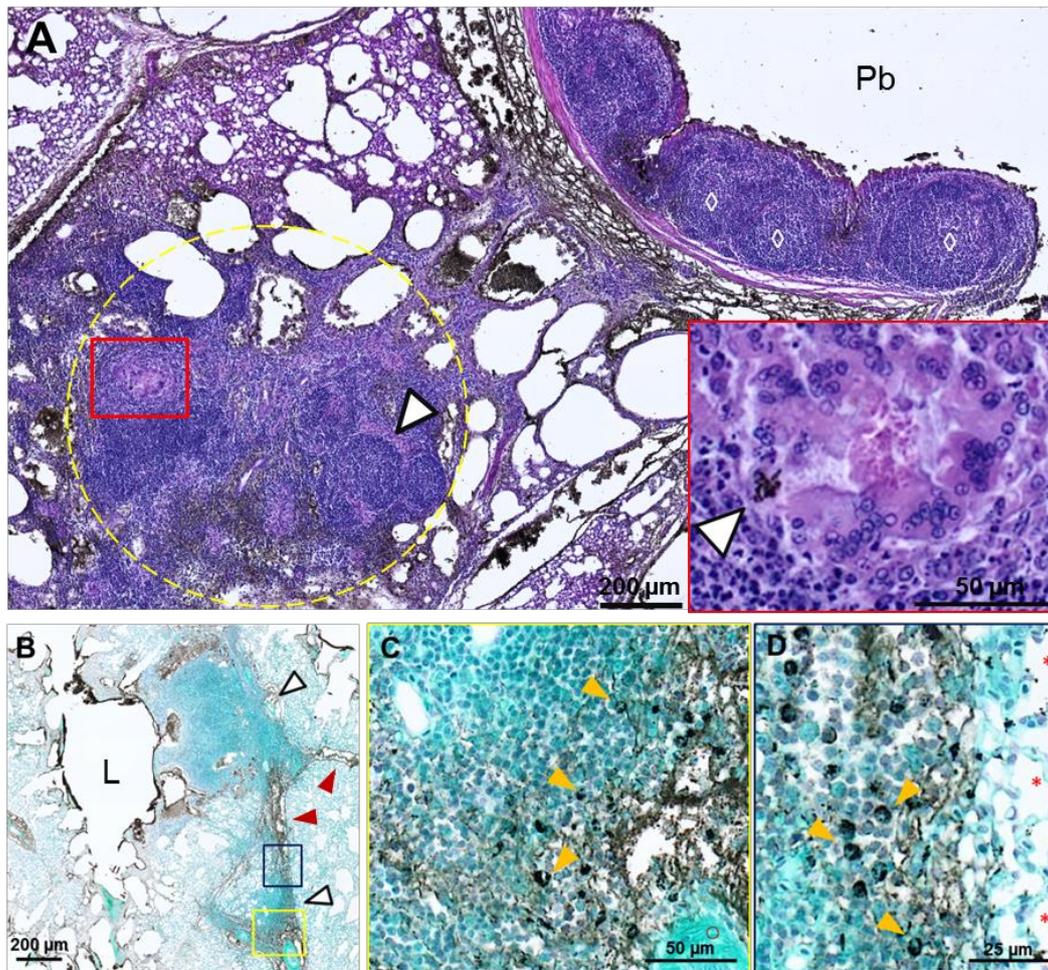


Abbildung 29: Extrabronchiale lymphoide Follikel. **A:** Querschnitt des Primärbronchus mit BALT (◇) und lymphoiden Follikeln in der Parabronchuswand (gestrichelter Kreis), das GCs mit unterschiedlich stark ausgeprägter Bindegewebskapsel enthält (weißer Pfeil) und zum unteren Bildrand hin von Kohlenstoffpartikeln umgeben ist. **Inlay:** Vergrößerung aus A (rotes Rechteck). Zentral sind große, mehrkernige Zellen mit breitem, eosinophilem Zytoplasma zu erkennen, die morphologisch mehrkernigen Riesenzellen ähneln. Im Randbereich der Riesenzellansammlung finden sich intrazellulär Kohlenstoffpartikel, HE. **B:** Zwei abgrenzbare lymphoide Follikel (weiße Pfeile). Die obere Ansammlung nimmt auf einer Seite die gesamte Parabronchuswand ein. Der eigentliche Wandaufbau aus Atrien und Luftkapillaren ist an dieser Stelle nicht mehr zu erkennen. Die untere, auf diesem Serienschnitt nicht mehr vollständig erfasste Ansammlung liegt innerhalb eines Zwickels. Die interparabronchialen Septen und Zwickel sind mit Kohlenstoffpartikeln gefüllt (rote Pfeile). **C:** Vergrößerung aus B (gelbes Rechteck). **D:** Vergrößerung aus B (blaues Rechteck). **C und D:** Bei den schwarzgefärbten Zellen im Randbereich der des lymphoiden Follikels handelt es sich um Zellen mit großen Mengen phagozytierter Kohlenstoffpartikel (gelbe Pfeile). Pb: Primärbronchus, L: Parabronchuslumen, ○: kleine Blutgefäße, *: Luftkapillaren, Lichtgrün, T3/3, 60 min p. a.

2.3 Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbungen

Insgesamt lässt sich regelmäßig in den immunhistochemischen Färbungen der Tuscheversuche eine Kolokalisation der Kohlenstoffpartikel aus der Tuschesuspension mit KUL01⁺-Zellen im Bereich der Atrien und der interparabronchialen Septen darstellen. In der CD45-Färbung wird eine deutliche Assoziation von Leukozyten mit einer Ansammlung von Kohlenstoffpartikeln im Zwickelbereich sichtbar (Abbildung 31 A). Im Bereich der Parabronchien lassen

sich vereinzelt dem Epithel aufliegende Zellen mit breitem Zytoplasma erkennen. Eine dieser Zellen enthält Kohlenstoffpartikel und ist in Abbildung 31 B dargestellt. Das Atrienepithel zeigt eine deutliche Aufnahme der Tusche, im FAE ist dagegen geringere, fokale Tuscheaufnahme darstellbar. In der CD45- und KUL01-Färbung reagieren Zellen im Bereich der Atriensepten und Atrienbasis positiv und einzelne KUL01⁺-Zellen erreichen auch das Atrienlumen. Das Atrienepithel selbst zeigt jedoch keine Reaktion mit dem anti-CD45- und KUL01-Antikörper (Abbildung 31 C und D). Allerdings lässt sich mit anti-Pan-Zytokeratin eine positive Färbung des respiratorischen und des follikelassoziierten Epithels sowie des Atrien- und Luftkapillarepithels darstellen (Abbildung 30). Die Auskleidung der mit Tusche gefüllten Spalträume in den interparabronchialen Septen ist anti-Pan-Zytokeratin-negativ.

Die immunhistochemische Färbung mit den für das Huhn verfügbaren Antikörpern auf Technovit[®] 8100-eingebetteten Schnittpräparaten fiel sowohl mit Paraformaldehyd- als auch Aceton-Fixierung negativ aus.

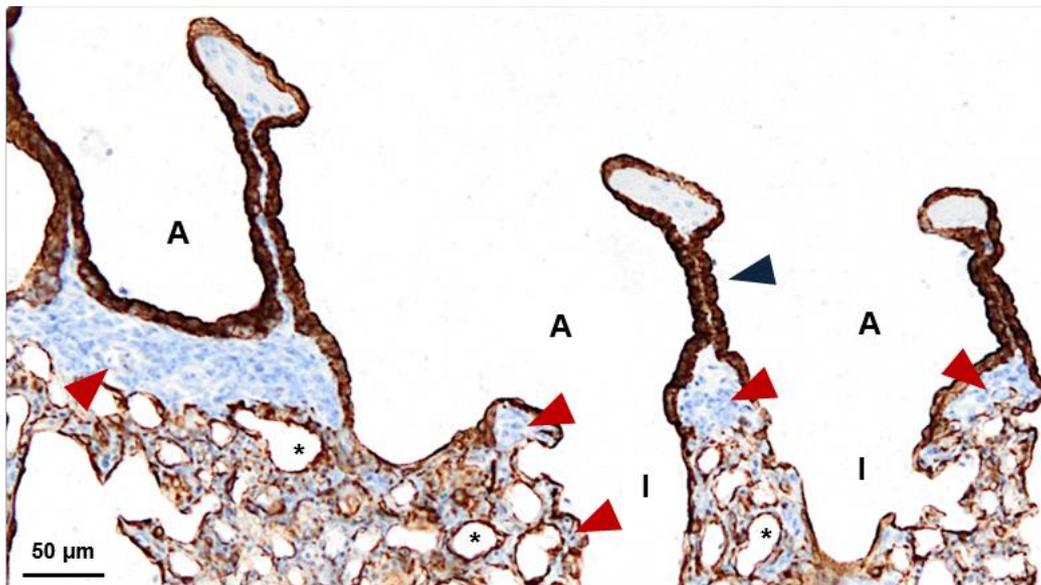


Abbildung 30: Immunhistochemische anti-Pan-Zytokeratin-Färbung der Atrien. Die Epithelien der Atrien (blauer Pfeil) und der Luftkapillaren zeigen eine positive Reaktion mit anti-Pan-Zytokeratin, bei Negativität des Bindegewebes (rote Pfeile). A: Atrium, I: Infundibulum, *: Luftkapillaren. Boost-Tier, NDV-Versuch.

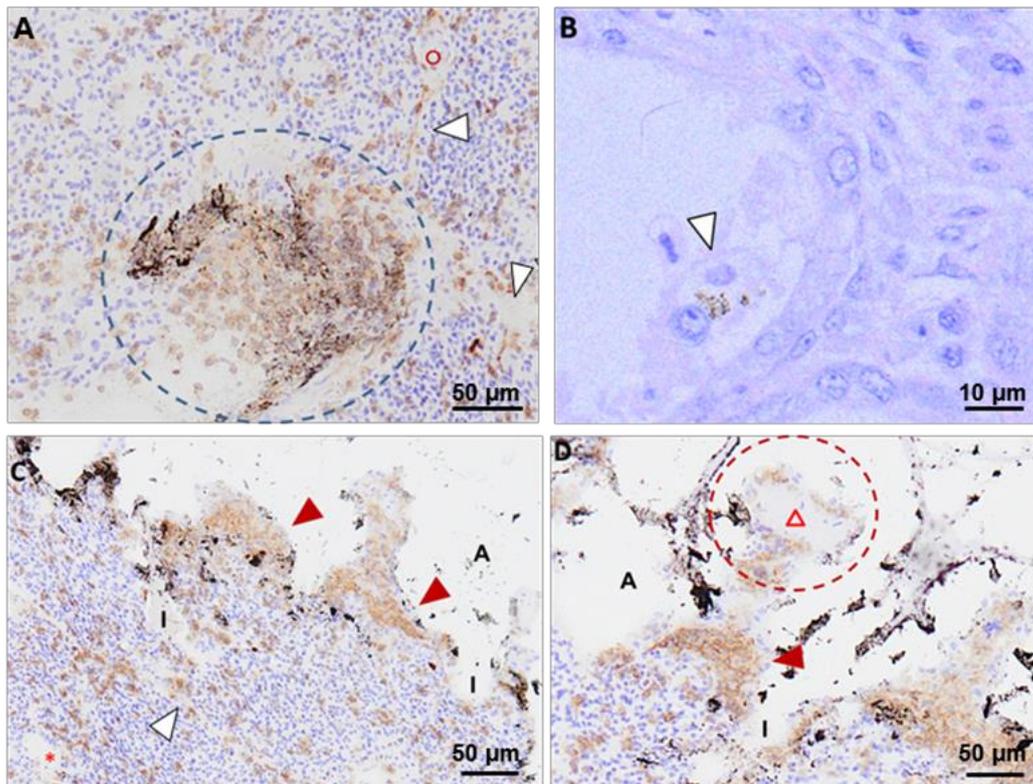


Abbildung 31: Atrien und IPBS. **A, B und C:** anti-CD45-Färbung. **A:** Zwickel (IPBS s. Pfeile) mit einer Ansammlung von Kohlenstoffpartikeln. Um diese Ansammlung ist ein Infiltrat von CD45⁺-Zellen dargestellt (gestrichelter Kreis). **B:** Schnitt durch das Atrium. Im Lumen ist eine Zelle mit intrazellulären Kohlenstoffpartikeln (Pfeil) zu erkennen, HE. **C und D:** Das Lumen der Parabronchien ist mit Agarose und daran anhaftender Tusche gefüllt. Die Kohlenstoffpartikel haften dem Atrien- und Infundibularepithel an. Im IPBS (weißer Pfeil) und im Bereich der Luftkapillaren (*) sind sowohl vereinzelt CD45⁺-Zellen als auch Ansammlungen dieser Zellen zu finden (braun). Die Basis und die Septen der Atrien weisen ebenfalls Infiltrate von CD45⁺-Zellen auf. Der apikale Bereich des Atrienseptums (gestrichelter Kreis) zeigt glatte Atrienmuskulatur und (Δ) und CD45⁺-Zellen. Das Atrienepithel selbst zeigt keine Reaktion mit dem anti-CD45-Antikörper (rote Pfeile). A: Atrium, I: Infundibulum, *: Luftkapillaren. T9, 10 min p. a. (A, C, D), GMA-1, 10 min p.a. (B).

2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Begutachtung der Präparate aus den Tuscheversuchen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigt elektronendichte Kohlenstoffpartikel, die sich frei im Lumen der Luftkapillaren, dem Endothel aufliegend oder stellenweise innerhalb von Endothelzellen befinden. Darüber hinaus sind Kohlenstoffpartikel intrazellulär zu sehen. Die Epithelzellen der Atrien zeigen fingerartige Fortsätze (Abbildung 32 A, B) sowie zahlreiche Mitochondrien und Zelleinschlüsse, die mit lamellärem Material gefüllt sind, das auf Mukus hindeutet. Die Einschlüsse öffnen sich stellenweise in Richtung Lumen (Abbildung 32 C). Kleine, herdförmige Ansammlung von Kohlenstoffpartikeln finden sich unmittelbar unter dem Atrienepithel (Abbildung 32 A). Im Bereich der Blutkapillaren und größeren Blutgefäße sowie an der Oberfläche der Luftkapillaren sind Makrophagen mit

fingerartigen Zytoplasmafortsätzen anzutreffen (Abbildung 33). Ihr Zytoplasma beinhaltet zahlreiche Vakuolen, die in Abbildung 33 A mit schwarzen Partikeln gefüllt sind.

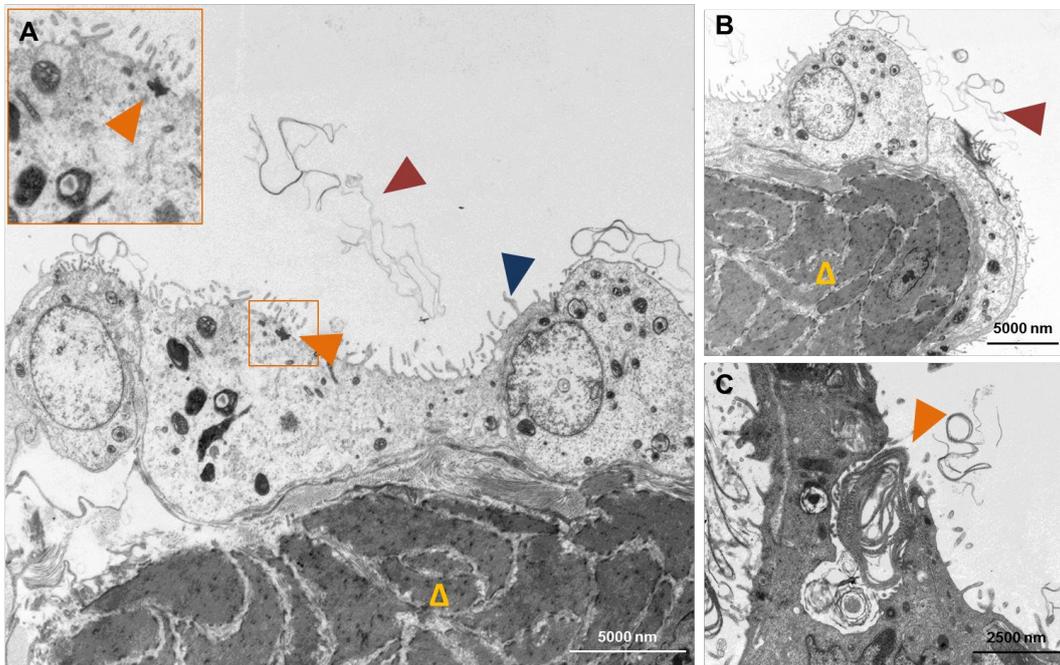


Abbildung 32: Apikaler Bereich des Atrienseptums, TEM. **A und B:** Glatte Muskulatur (Δ) und Atrienepithel mit fingerartigen Zytoplasmafortsätzen (blauer Pfeil). Fokal finden sich aufgenommene Kohlenstoffpartikel (Inlay, orangener Pfeil). Im Lumen sind lamelläre Strukturen zu sehen, die Surfactant aus Lamellenkörperchen beim Säuger entsprechen können (roter Pfeil). **C:** Basaler Bereich des Atrienseptums. Eine Vakuole mit fädenähnlichem Inhalt steht in Kontakt mit dem Lumen. T10, 5 min p. a.

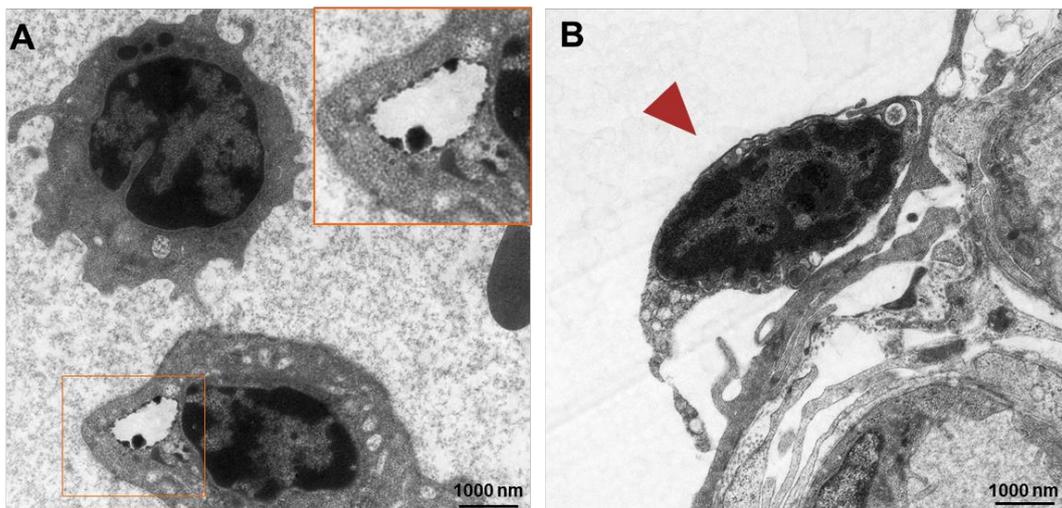


Abbildung 33: Lungen-Makrophagen, TEM. **A:** Zwei Makrophagen innerhalb eines Blutgefäßes. Einer der Makrophagen beinhaltet schwarze Partikel in einer Zellvakuole (Inlay). **B:** Ein Makrophage mit engem Kontakt zum Epithel einer Luftkapillare (Pfeil). T10, 5 min p. a.

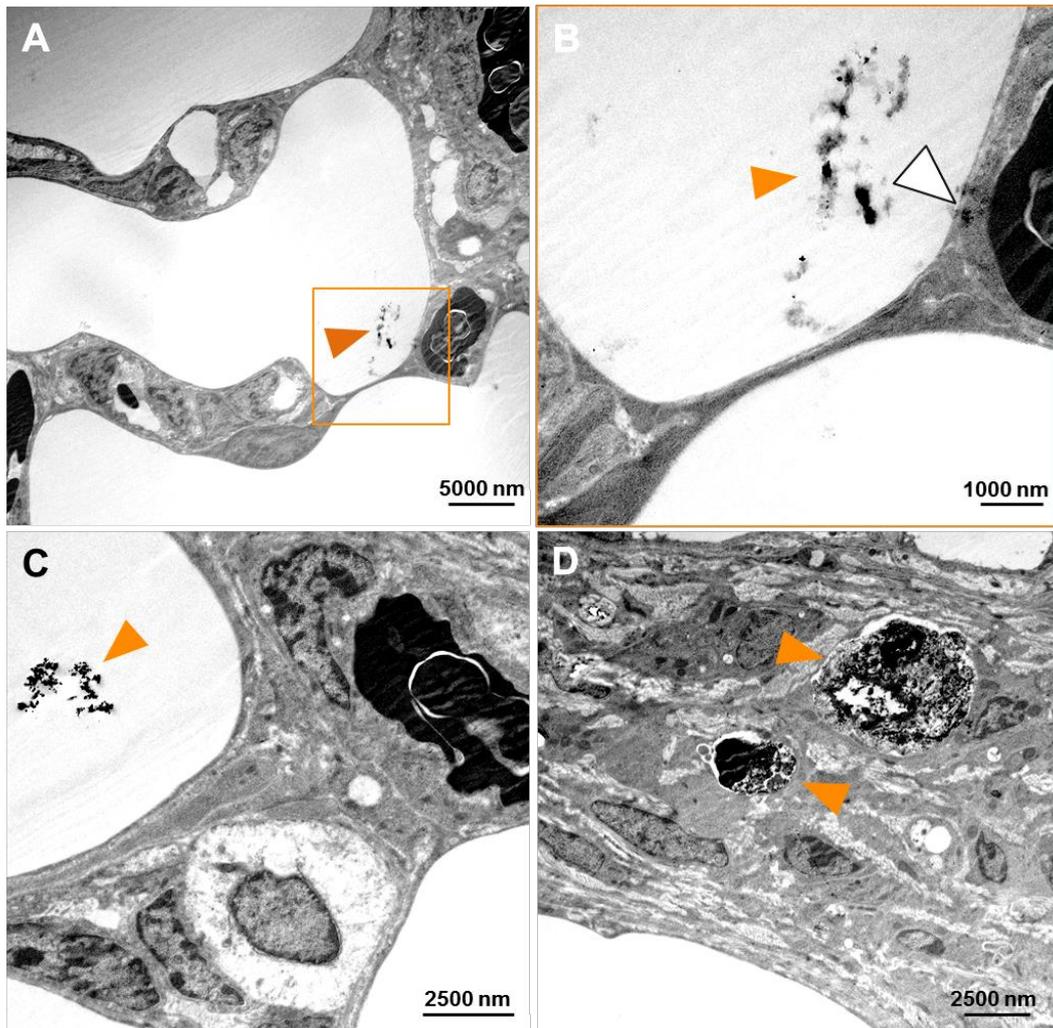


Abbildung 34: Luftkapillaren und Atrienseptum, TEM. **A:** Kohlenstoffpartikel liegen frei in den Luftkapillaren (orangener Pfeil). **B:** Vergrößerung aus A (orangenes Rechteck). Kohlenstoffpartikel haften dem Epithel an und befinden sich intraepithelial (weißer Pfeil). **C:** Kohlenstoffpartikel in den Luftkapillaren (orangener Pfeil). **D:** Zelleinschlüsse mit großen Mengen von Kohlenstoffpartikeln, T10, 5 min p. a.

3. Beads-Versuche

Der Fokus lag bei dieser Versuchsreihe auf dem BALT und dem unmittelbar angrenzenden Parenchym. Dafür wurden wenige Tropfen der unverdünnten Latex-Beads-Lösung in situ in den Primärbronchus appliziert und deren Verteilung im BALT sowie dem angrenzenden parabronchialen Gewebe lichtmikroskopisch beurteilt. Je nach Fokusebene sind die Beads lichtmikroskopisch als hell leuchtende bzw. schwarze Punkte erkennbar. Insgesamt lassen sich die Beads lichtmikroskopisch weniger deutlich als die Kohlenstoffpartikel aus der Tusche darstellen. Hinsichtlich des Zellerhalts ließen sich bei der Verwendung von DMEM und Agarose keine Unterschiede im Vergleich zu PBS und Agarose feststellen.

Auch hier werden die Ergebnisse analog zu den Tuscheergebnissen in die

Lokalisationen BALT und extrabronchiales Gewebe unterteilt. Das extrabronchiale Gewebe wird im Folgenden in der unter Kapitel 2 angegebenen Reihenfolge besprochen.

3.1 Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe

Die Beads haften zum Großteil dem follikelassoziierten Epithel des BALT an, vereinzelt sind sie aber auch in tieferen Schichten des FAE sowie im BALT selbst darstellbar. An zuletzt beschriebener Stelle lässt sich in der immunhistochemischen Färbung mit KUL01 eine Kolo-kalisation von KUL01⁺-Zellen und den Beads im Bereich des BALT feststellen (Abbildung 35). Auf einem Schnittpräparat des BALT zeigt sich eine artifiziell aus dem Zellverband des BALT gelöste Zelle, an der Beads entlang ihrer Zellmembran anhaften (Abbildung 38 B).

3.2 Extrabronchiales Gewebe

Die Ergebnisse der Aufnahme im extrabronchialen Gewebe werden den verschiedenen Lokalisationen nach besprochen (s. Kapitel 2).

3.2.1 Atrien

Auch bei den Beads-Versuchen zeigt sich ein ähnliches Verteilungsmuster im Bereich der Atrien und Blutgefäße, wie es bereits für die Tuscheversuche beschrieben wurde. Die Beads haften dem Atrienepithel entweder an oder liegen unmittelbar unter dem Epithel (Abbildung 36 A, Abbildung 37 B, Abbildung 38). Die Vergrößerung aus dem Bereich des Atrienepithels zeigt, dass sich die Beads teilweise auch intraepithelial befinden (Abbildung 37 B). In dem Technovit[®] 7100-eingebetteten Lungenpräparat lassen sich im Bereich der Atrien Zellen mit breitem und hellem Zytoplasmasaum wiederfinden, wie sie bereits bei den Tuscheversuchen beobachtet wurden (Abbildung 38 A). Einige Beads finden sich analog zur Tusche innerhalb von Blutgefäßen wieder (Abbildung 37A).

3.2.2 Interparabronchiale Septen

Beads lassen sich ebenfalls in den interparabronchialen Septen und in der Nähe darin befindlicher, kleiner Blutgefäße darstellen (Abbildung 39). In der immunhistochemischen Färbung mit KUL01 zeigt sich eine Kolo-kalisation antikörperpositiver Zellen und der Beads-Ansammlungen in der Nähe eines kleinen Blutgefäßes (Abbildung 39 D).

3.2.3 Blutgefäße

In der Kernechtrot-Lichtgrün-Färbung ist zu erkennen, dass die Beads vereinzelt, analog zu den Tuscheversuchen, in den Blutgefäßen liegen (Abbildung 37 A). Sie konnten auch ähnlich wie die Tusche in der Nähe kleiner Blutgefäße in den IPBS dargestellt werden (Abbildung 39 D). Die mehrfach in den Tuscheversuchen beobachtete Nähe der Partikel zur Blutgefäßwand konnte in diesen Versuchen allerdings nicht beobachtet werden.

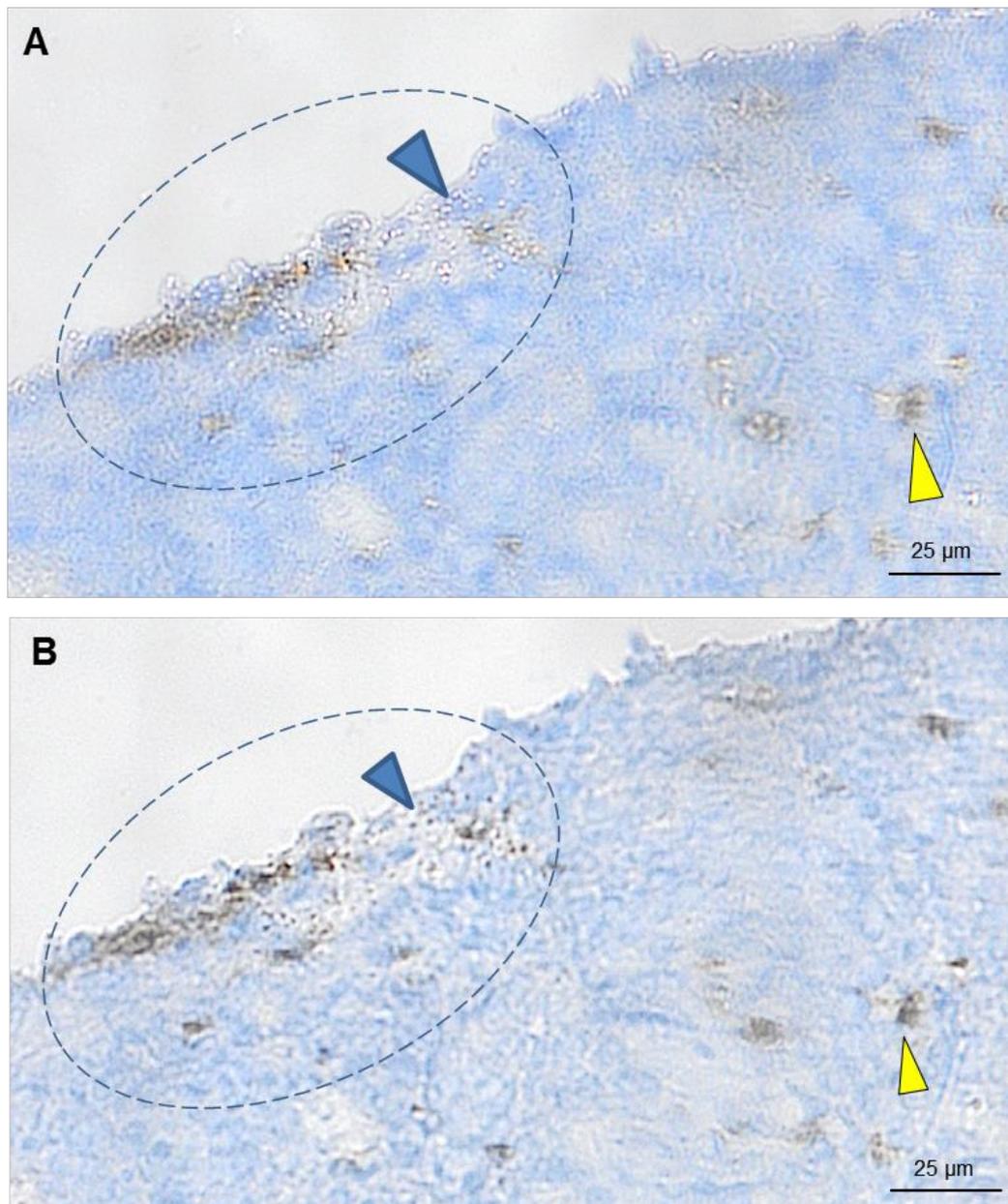


Abbildung 35: BALT, KUL01-Färbung. **A und B:** KUL01⁺-Zellen im BALT-Stroma (gelbe Pfeile). Eine Ansammlung von KUL01⁺-Zellen zeigt eine Kolokalisation mit Beads (gestrichelte Kreise). Die Beads erscheinen in der Fokusebene in A hell-leuchtend und in B schwarz (blauer Pfeil). Die Besonderheiten bei der histologischen Darstellung der Beads sind im Kapitel 2.3.5. erläutert. Beads-Versuch 3, 20 min p. a.

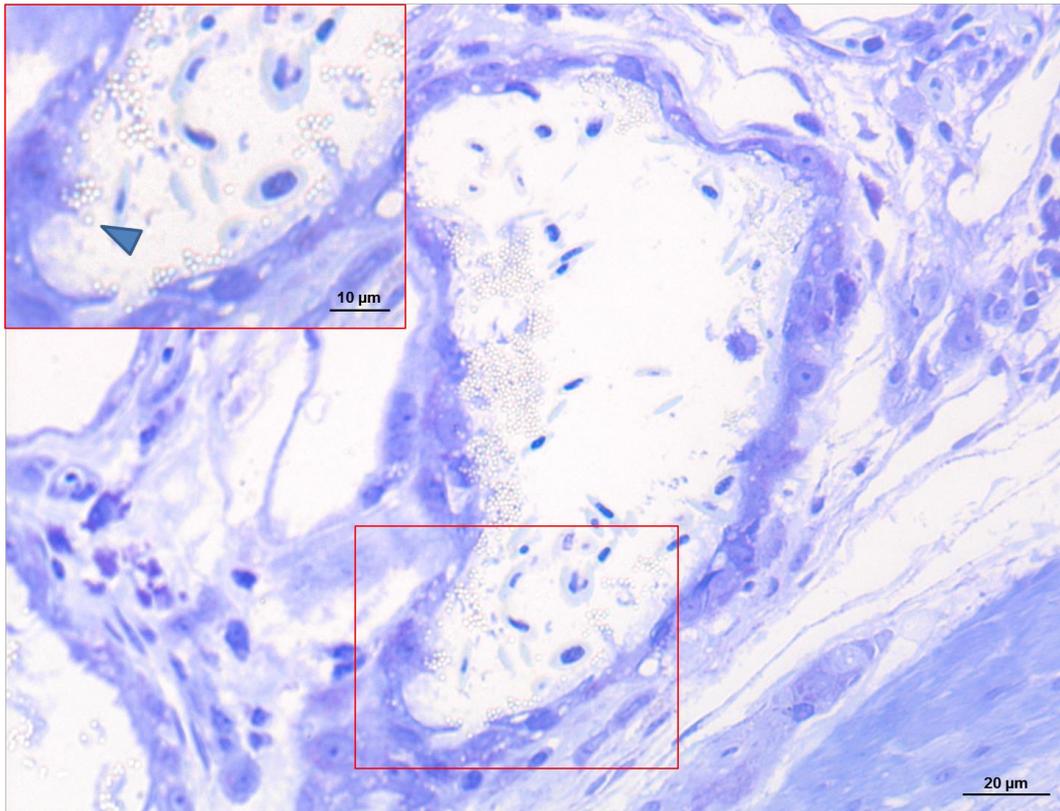


Abbildung 36: Querschnitt eines Atriums. Die Beads liegen dem Atrienepithel auf und sind in dieser Fokus-Einstellung als leuchtende Kreise sichtbar (Pfeil, Inlay). Des Weiteren sind Erythrozyten und Granulozyten im Lumen erkennbar. Richardson. GMA-2, 30 min p. a.

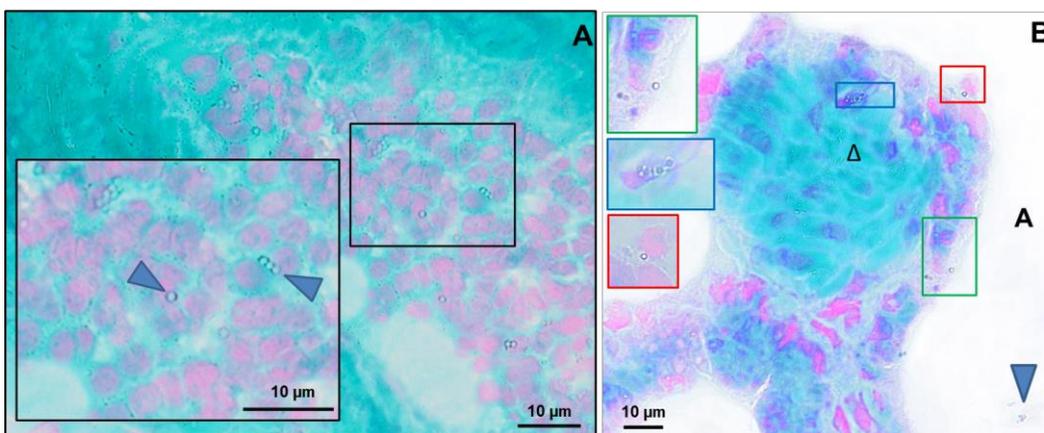


Abbildung 37: Blutgefäß und Atrium. **A:** Blutgefäß mit Erythrozyten (Kerne rosa, Zytoplasma und Blutgefäßwand grün). Im Lumen sind Beads erkennbar (Inlay, Pfeile), Kernechtrot-Lichtgrün. **B:** Apikaler Bereich des Atrienseptums mit glatter Muskulatur (Δ) und Atrienepithel. Die Beads liegen frei im Atrienlumen (Pfeil) und sind sowohl an der Epitheloberfläche als auch intra- und subepithelial zu finden (Inlays). A: Atrium, Kernechtrot-Lichtgrün, Beads-Versuch 3, 20 min p. a.

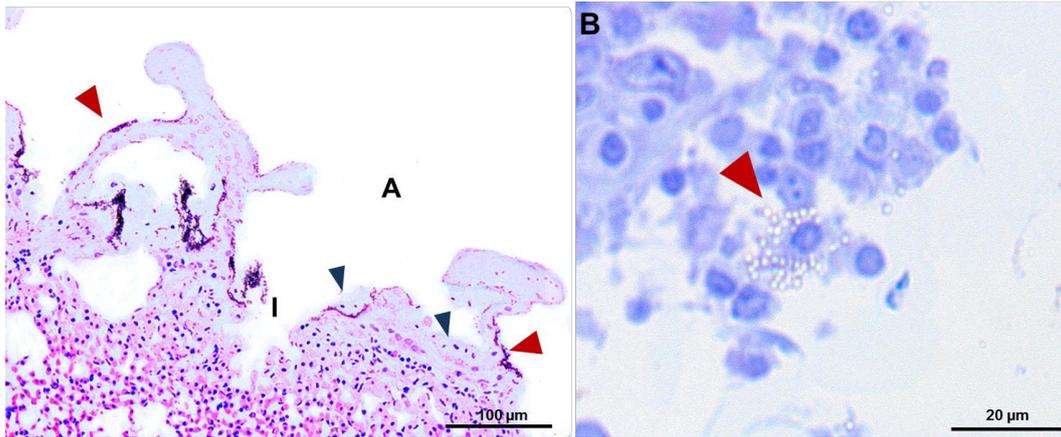


Abbildung 38: Atrien und BALT. **A:** Atrien (A) mit Infundibulum (I). Beads (in dieser Fokusebene schwarz) haften dem Atrienepithel an (rote Pfeile). An einigen Stellen sind Zellen mit hellem und breitem Zytoplasmasaum erkennbar (blaue Pfeile). HE. **B:** Artifiziiell aus dem Verband herausgelöste BALT-Stromazelle (Pfeil), an deren Oberfläche zahlreiche Beads (in dieser Fokusebene hell leuchtend) anhaften. Richardson, GMA-2, 30 min p. a.

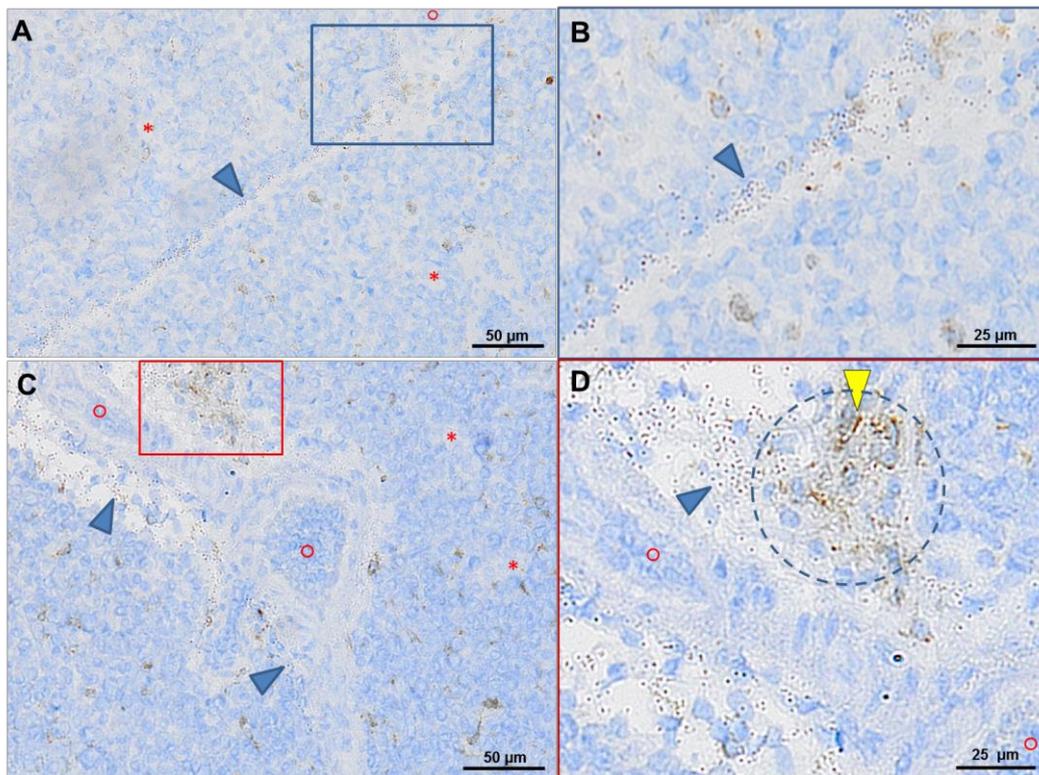


Abbildung 39: Interparabronchiale Septen, KUL01-Färbung. **A:** Das IPBS enthält Beads (Pfeil). \circ : Blutgefäß im IPBS. **B:** Vergrößerung aus A (blaues Rechteck). Die Beads stellen sich in dieser Fokusebene als kleine schwarze Punkte dar (Pfeil). Sowohl innerhalb des IPBS als auch um die Luftkapillaren sind KUL01⁺-Zellen zu erkennen. **C:** Beads im IPBS (Pfeile). Am oberen Bildrand lässt sich eine Ansammlung von Beads und KUL01⁺-Zellen erkennen (rotes Rechteck). **D:** Vergrößerung der Beads-Ansammlung aus C (rotes Rechteck). Die KUL01⁺-Zellen zeigen eine Kolokalisation mit den Beads. Beads-Versuch 3, 20 min p. a.

4. FITC-Versuche

Die Ergebnisse aus den FITC-Versuchen werden analog zu den Tusche- und Beads-Versuchen entsprechend den Lokalisationen BALT und extrabronchiales Gewebe erläutert (s. Kapitel 2). Bei der Auswertung aller fünf Tiere zeigte sich das gleiche Verteilungsmuster des Fluoreszenzfarbstoffes. Die Konzentration von 50 mg/ml mit dreißigminütiger Einwirkzeit erzielte die besten Ergebnisse. Der Fluoreszenzfarbstoff färbt vor allem die Epithelien der Atrien und des Infundibulums an. Im Bereich des Primärbronchus stellt sich das Epithel ebenfalls leuchtend dar, das BALT selbst zeigt keine Fluoreszenz. Die Leukozyten-Ansammlungen sowie die GCs der Parabronchien und auch die interparabronchialen Septen stellten sich als FITC-negativ dar.

4.1 Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe

Bei allen Tieren der Versuchsreihe zeigt sich eine Färbung des follikelassoziierten Epithels, während sich das darunter gelegene BALT-Parenchym als FITC-negativ darstellt. Bei stärkerer Vergrößerung des FAE ist deutlich erkennbar, dass einige Zellen des Epithels von der Färbung ausgespart bleiben (Abbildung 41). Diese Zellen konnten anhand eines HE-gefärbten Vergleichsbildes als Becherzellen identifiziert werden, die im Gegensatz zu den Epithelzellen des FAE keine Zilien tragen (Abbildung 40 C).

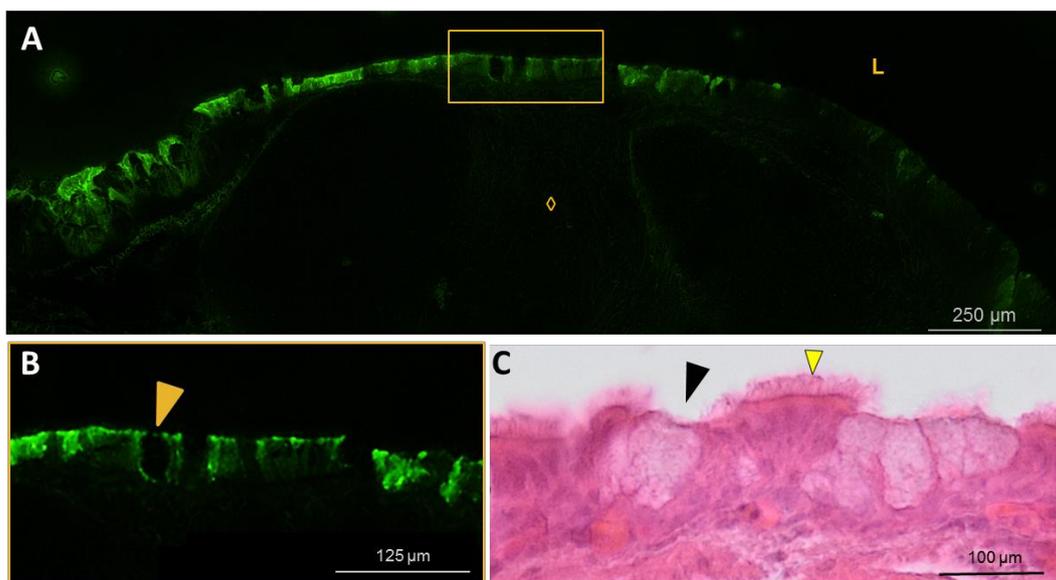


Abbildung 40: Primärbronchus mit BALT im Längsschnitt. **A:** Das Epithel ist deutlich FITC-positiv, während das BALT FITC-negativ ist. **B:** Vergrößerung des FAE-Bereiches aus A (gelbes Rechteck). Einige Zellen des FAE haben kein FITC aufgenommen (orangener Pfeil) **C:** Vergleich mit FAE des BALT aus T1. Das Epithel enthält neben ziliotragenden Zellen (gelber Pfeil) mehrere Becherzellen (schwarzer Pfeil). L: Lumen, ◇: BALT, HE, FITC-Tier 1, 30 min p. a.

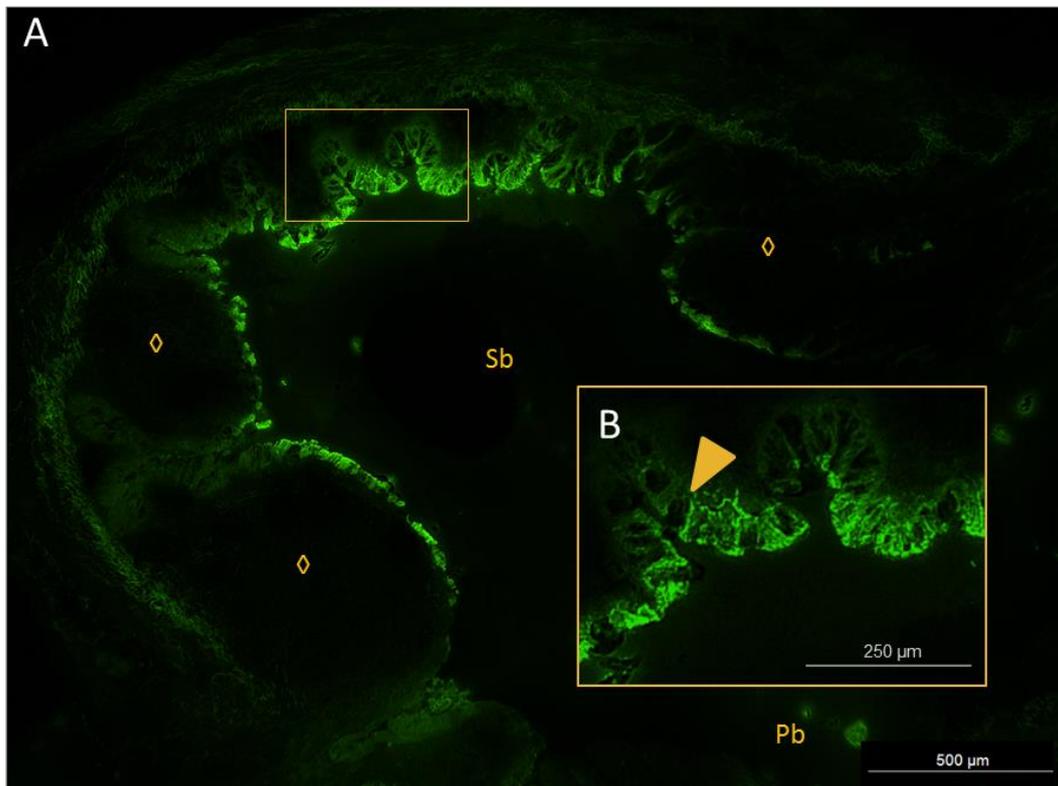


Abbildung 41: Primärbronchus am Übergang zum Sekundärbronchus mit BALT im Querschnitt. **A:** Das BALT-Epithel ist deutlich FITC⁺, während das BALT selbst weitgehend negativ ist. **B:** Vergrößerung des BALT-Epithels aus A (gelbes Rechteck). Im BALT-Epithel sind vom Fluoreszenzfarbstoff ausgesparte Zellen zu erkennen. Pb: Primärbronchus, Sb: Sekundärbronchus, ◇: BALT-GC. FITC-Tier 1, 30 min p. a.

4.2 Extrabronchiales Gewebe

Die Ergebnisse der FITC-Aufnahme im extrabronchialen Gewebe werden den verschiedenen Lokalisationen nach besprochen (s. Kapitel 2).

4.2.1 Atrien

Eine deutliche Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes findet sich entlang der Atrienepithelien. Die Fluoreszenz nimmt zum Infundibulum hin ab und das gasaustauschende Gewebe stellt sich als FITC-negativ dar (Abbildung 42). Fluoreszenzhistologische Färbungen mit KUL01 zeigen im Gegensatz zu den Tuscheversuchen nur selten eine Kolorisation mit KUL01⁺-Zellen im Bereich der Atriensepten und der Luftkapillaren (Abbildung 43 A, Abbildung 44). Die immunhistochemische Färbung derselben FITC-Schnittpräparate mit den Antikörpern anti-Bu1, anti-CD3, anti-CD45 und CVI-ChNL-74.3 sowie CVI-ChNL-68.1 zeigt keine Lagekorrelation der Fluoreszenzpartikel mit den antikörperpositiven Zellen.

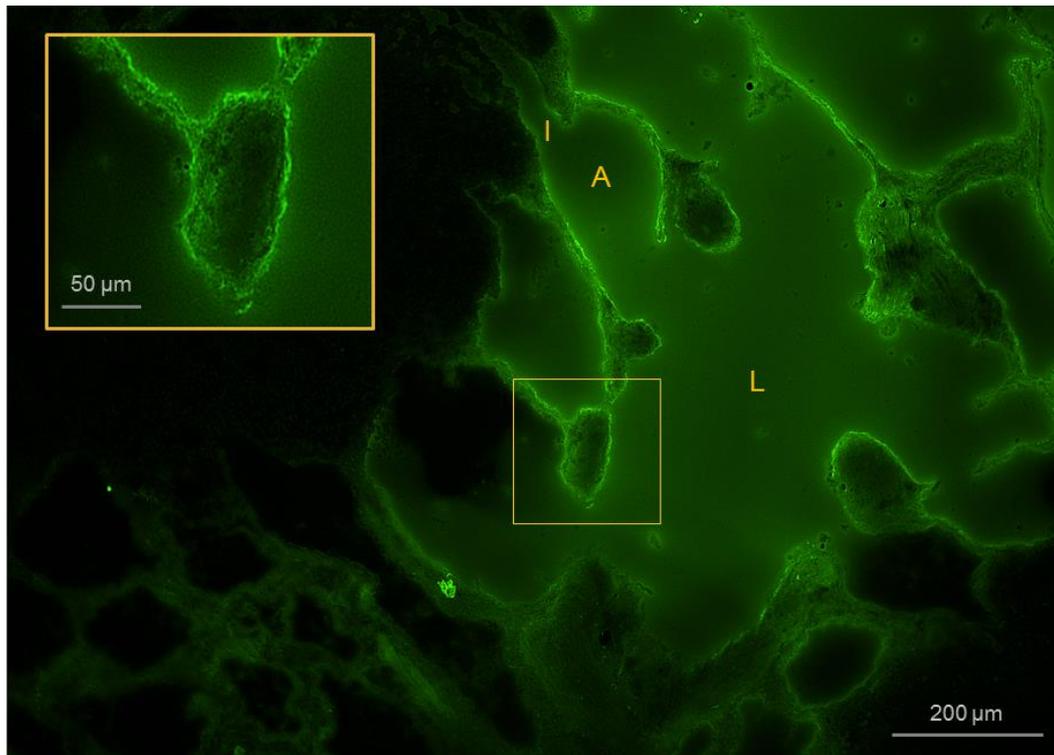


Abbildung 42: Parabronchus im Längsschnitt. **A:** Atrien (A) und Infundibula (I). Die Atrienepithelien sind deutlich FITC⁺, während das umliegende Parenchym FITC⁻ ist. Die Fluoreszenz des Epithels nimmt zum sich verjüngenden Infundibulum stets ab. **Inlay:** Vergrößerter Atrienbereich aus A (orangenes Rechteck). Die Atrienepithelien haben den Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen. L: Lumen, FITC-Tier 1, 30 min p. a.

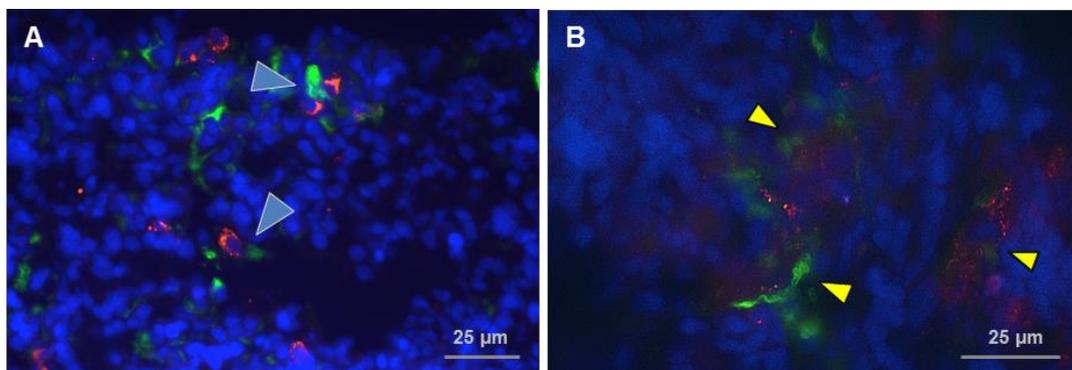


Abbildung 43: Fluoreszenzhistologische KUL01-Färbung. **A:** Gewebe der Parabronchuswand (das Lumen ist nicht dargestellt). Die KUL01⁺-Zellen zeigen insgesamt kaum Lagekorrelation mit FITC. Vereinzelt sind jedoch KUL01⁺-Zellen darstellbar, die in engem Kontakt zu den FITC stehen (blaue Pfeile). **B:** KUL01⁺-Zellen stehen in engem Kontakt zu FITC (gelbe Pfeile). FITC = grün, Zellkerne = blau, KUL01 = rot-orange, FITC-Tier 5, 10 min p. a.

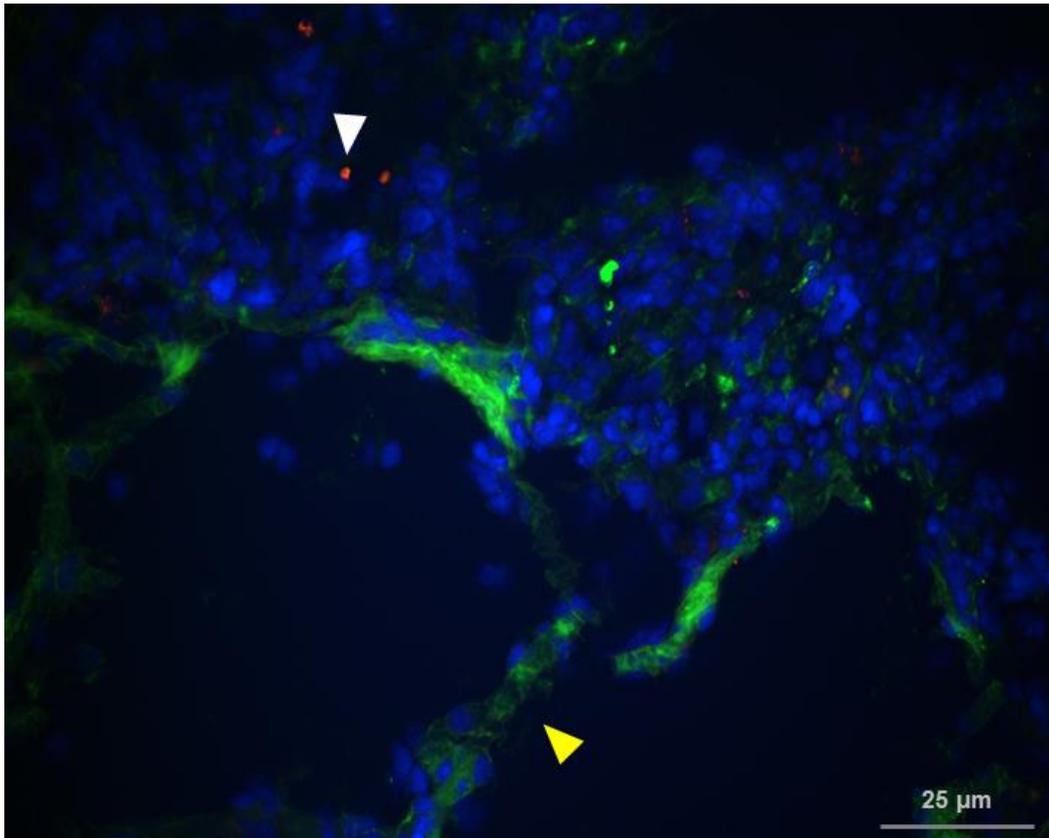


Abbildung 44: Atrienbereich. FITC⁺-Atrienepithel (gelber Pfeil) und einzelne FITC⁺-Zellen im Bereich der Luftkapillaren. KUL01⁺-Zellen (weißer Pfeil) sind hier nur vereinzelt zu finden. Das aufgenommene FITC in den Atrien ist nicht mit KUL01⁺-Zellen assoziiert. FITC = grün, Zellkerne = blau, KUL01 = rot-orange, FITC-Tier 5, 10 min p. a.

4.2.2 Interparabronchiale Septen

In den FITC-Versuchen lassen sich nur äußerst selten schwach FITC-positive IPBS darstellen. Bis auf diese vereinzelt Areale stellen sich die IPBS jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der Tusche- und Beads-Versuche als FITC⁻ dar (Abbildung 45).

4.2.3 Germinale Zentren

Die germinalen Zentren des Parenchyms zeigen lediglich im Randbereich eine Fluoreszenz, die fokal deutlich ausgeprägt ist (Abbildung 46 A). Bei stärkerer Vergrößerung des umliegenden Gewebes lassen sich einzelne Zellen mit fluoreszierenden Granula identifizieren (Abbildung 46 B). Die fluoreszenzhistologische Färbung mit KUL01 zeigt jedoch, dass die antikörperpositiven Zellen im Bereich des Parenchyms nicht FITC⁺ sind. Einige der KUL01⁺-Zellen stehen jedoch vereinzelt in engem Kontakt zu den FITC⁺-Zellen (Abbildung 43 B).

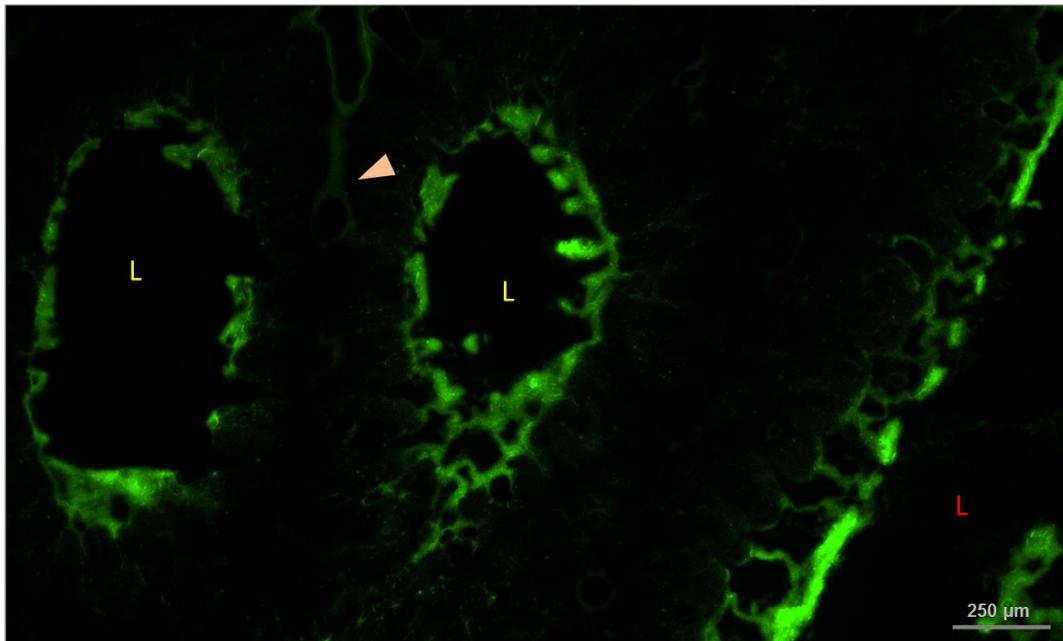


Abbildung 45: Parabronchien im Quer- und Längsschnitt. Die Atrieneithelien sind deutlich FITC⁺, während sich das umliegende Parenchym negativ darstellt. Das IPBS (Pfeil) ist fokal nur ganz schwach FITC⁺. gelbes L: Parabronchus quer, rotes L: Parabronchus längs. FITC-Tier 4, 10 min p. a.

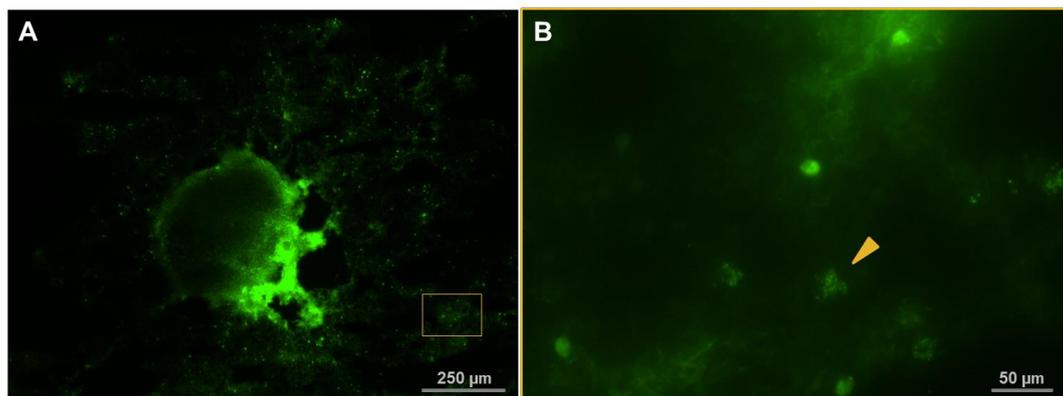


Abbildung 46: Extrabronchiales GC. **A:** Die Atriensepten sind FITC⁺. Im umliegenden Gewebe sind einzelne fluoreszierende Punkte erkennbar. **B:** Vergrößerung aus B (orangenes Rechteck). Die fluoreszierenden Punkte bestehen aus gruppierten Ansammlungen kleiner, leuchtender FITC⁺-Granula. FITC-Tier 5, 10 min p. a.

5. Zusammenfassung der Versuche zur Partikelaufnahme

Während sich sowohl in den Tusche- als auch in den Beads-Versuchen regelmäßig Partikel in den interparabronchialen Septen fanden (Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 39), konnte diese Beobachtung in den FITC-Versuchen nicht gemacht werden (Abbildung 45).

Die Atrien zeigten sich in allen Applikationsversuchen als aufnahmefähig und reaktiv (Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 37, Abbildung 42). Das follikel-assoziierte Epithel zeigte herdförmig eine Aufnahme von Tusche und Beads sowie

eine deutliche, flächenhafte Aufnahme von FITC mit Aussparung der Becherzellen (Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 35, Abbildung 41). Tusche und Beads fanden sich gelegentlich in Blutgefäßen (Abbildung 27, Abbildung 37). Die extrabronchialen GCs zeigen vor allem in den Tuscheversuchen eine deutliche Tuscheaufnahme im Randbereich (Abbildung 29), während dort kaum FITC und keine Beads zu finden waren (Abbildung 46). Die folgende Tabelle und Abbildung gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Applikationsversuche unter Berücksichtigung der Verteilung und Lokalisation der jeweiligen Partikel innerhalb der Lunge.

Tabelle 11: Partikelvorkommen in Abhängigkeit der Lokalisation

Partikel	IPBS	Atrienepithel	FAE	GCs	Blutgefäße
Tusche	+++	+++	+	++	+
Beads	+	+	+	-	+
FITC	-	+++	+++	-	-

- negativ, + vereinzelt, ++ regelmäßig, +++ häufig

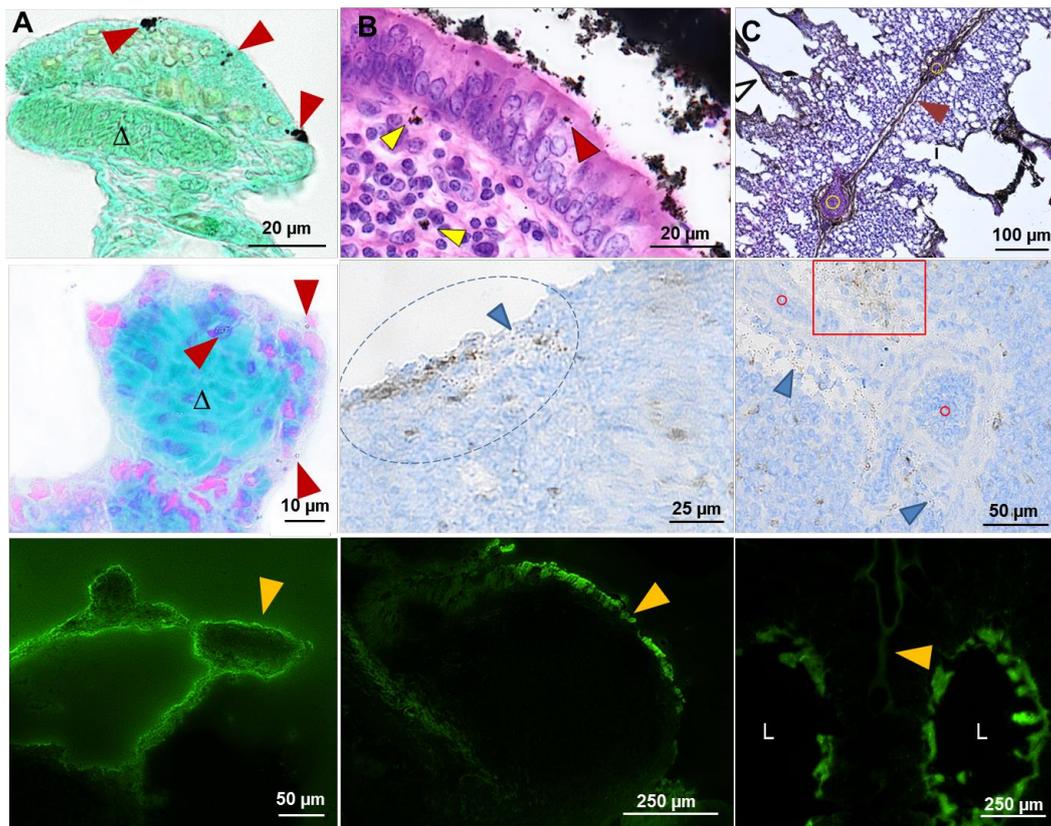


Abbildung 47: Partikelvergleichende Aufnahme im Bereich der Atrien (Spalte A), des BALT (Spalte B) und der IPBS (Spalte C). Obere Reihe: Tusche, mittlere Reihe: Beads, untere Reihe: FITC. Die Pfeile markieren jeweils die Partikellokalisierung. Δ: glatte Muskulatur, ○: Blutgefäß, L: Parabronchuslumen. Färbungen und Versuche siehe Kap. V 1,2,3,4.

6. Keimzentren des extrabronchialen Lungengewebes

6.1 Phänotyp und Lokalisation

Bei der histologischen Begutachtung der Lungenproben verschiedener Altersstufen von einem Monat bis über sechs Monate fiel besonders bei den über drei Monate alten Tieren auf, dass es neben der Ausbildung von BALT auch zur Ausbildung von GCs im extrabronchialen Gewebe kommt. Als GC werden hier Ansammlungen von v.a. B-Lymphozyten und wenigen T-Lymphozyten bzw. DCs bezeichnet, die von einer – manchmal auch unvollständigen – Bindegewebskapsel umgeben sind. Daneben treten aber auch Ansammlungen von Lymphozyten auf, die keine klare äußere Begrenzung aufweisen, sodass diese als lymphoide Follikel angesprochen werden. Neben den BALT-GCs können häufiger GCs mit juxtabronchialer Lage (innerhalb des Interstitiums, in unmittelbarer Nähe zum Primärbronchus bzw. zu den Sekundärbronchien) und extrabronchialer Lage beobachtet werden. Hier lässt sich eine Verteilung in zwei Lokalisationen beobachten: zum einen finden sich die GCs im Bereich der Zwickel (dem Berührungspunkt dreier benachbarter Parabronchien) und zum anderen in der Parabronchuswand, wo sie teilweise bis ans Lumen reichen und den normalen Wandaufbau des Parabronchus auflösen (Abbildung 29).

6.2 Dreidimensionale Rekonstruktion

Aufgrund der häufigen Beobachtung von extrabronchialen GCs wurden diese morphologisch näher betrachtet. Um ein möglichst realistisches Bild der GCs zu erhalten, wurde ergänzend zu den zweidimensionalen Schnittbildern eine dreidimensionale Rekonstruktion anhand der Schnittpräparate durchgeführt. Dadurch können Schnittebenen virtuell mikroskopiert werden und interessante Strukturen in ihren dreidimensionalen Zusammenhängen betrachtet werden. Als Grundlage für die Rekonstruktion diente ein extrabronchiales GC, welches eine deutliche Bindegewebskapsel aufwies. Der äußere Rand der Bindegewebskapsel wurde als Begrenzung herangezogen. In den ersten Stufenschnitten zeigt das GC eine rundliche Form, die mit zunehmender Schnitttiefe ein ovales Erscheinungsbild erhält und gegen Ende wieder in eine rundliche Form übergeht. Die Messung der Ausdehnung des GCs entlang virtueller Schnittebenen ergibt eine Länge von ca. 350 µm, eine Breite von ca. 230 µm und eine Höhe von ca. 130 µm. Somit besitzt das hier rekonstruierte GC eine mehr ellipsoide als kugelige Form.

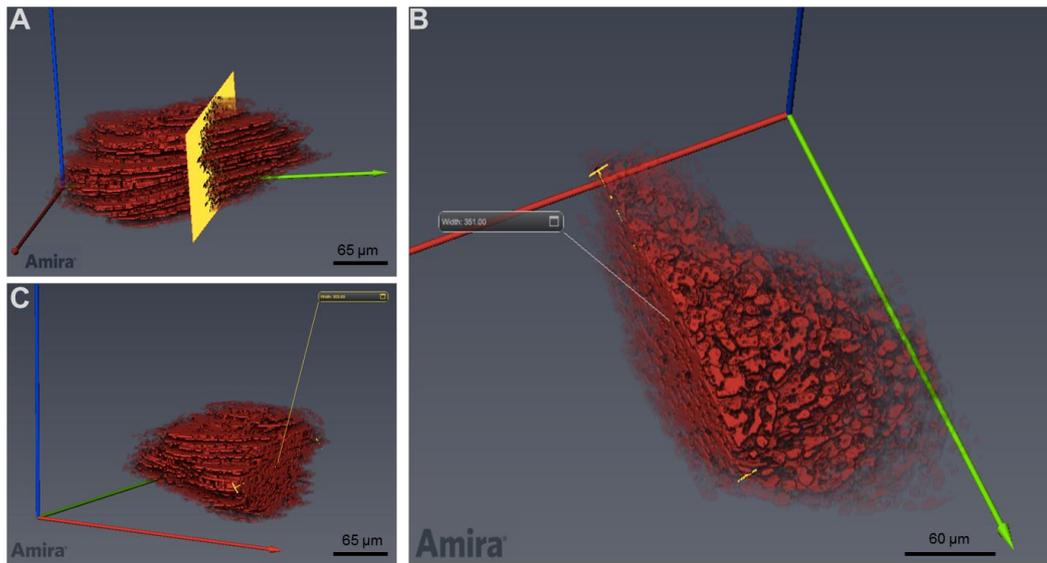


Abbildung 48: 3D-Rekonstruktion eines parabranchialen Keimzentrums. **A:** seitliche Ansicht mit virtueller Schnittebene (gelb). **B:** Schräg-frontale Ansicht nach virtuellem Schnitt, wie beispielhaft in A dargestellt. Maximale Breite des GCs in dieser Schnittebene beträgt 200 µm, **C:** Aufsicht auf das GC mit virtuellem Schnitt an der breitesten Stelle (Breite = 230 µm).

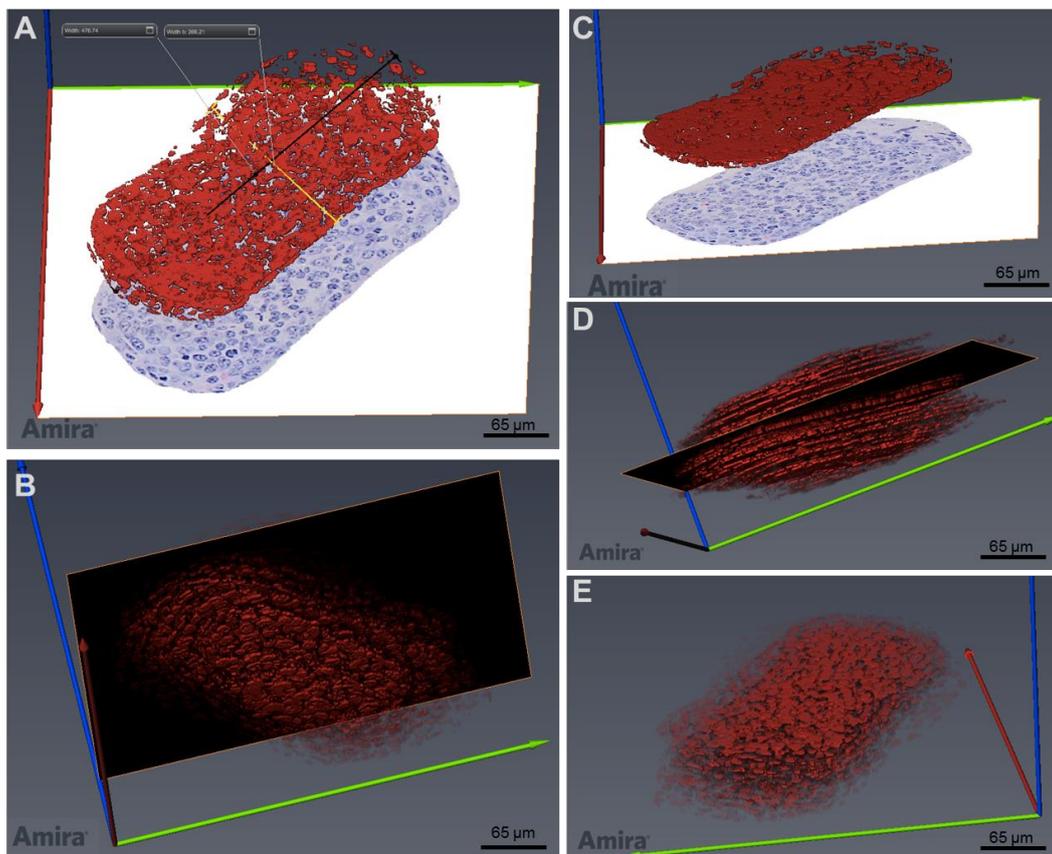


Abbildung 49: Schnittebenen durch ein dreidimensional rekonstruiertes Keimzentrum. Schnittführung entlang der in schwarz dargestellten Ebene in D. **B:** Ansicht des GCs aus D von unten. **A, C und E:** Aufsicht mit histologischem Korrelat (A, C) der Schnittebene aus D. Die maximale Länge in dieser Schnittebene beträgt 320 µm und die Breite 180 µm. **D:** seitliche Ansicht des GCs mit schwarzer Schnittebene. Das extrabranchiale GC besitzt somit im Gegensatz zur kugeligen Form der Milz-GCs eine ellipsoide Form.

6.3 Bromdesoxyuridin-Färbung

Um die Proliferation der Zellen, v.a. der B-Lymphozyten der GCs zu analysieren, wurden die Lungen vier Monate alter Tiere beprobt, da in diesem Alter das BALT bereits stark ausgebildet ist und GCs auch im extrabronchialen Gewebe beobachtet wurden. Den Tieren wurde *Bromdesoxyuridin* (BrdU) intravenös injiziert und die Lungen zum Zeitpunkt Null, drei Stunden und 12 Stunden nach Applikation entnommen. Das während der Zellteilung in der S-Phase inkorporierte BrdU wurde mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Die Färbung mit dem anti-BrdU-Antikörper zeigt, dass zum Zeitpunkt Null noch kein BrdU inkorporiert wurde. Drei Stunden nach intravenöser Applikation wird das Thymidin-Analogon vor allem durch peripher gelegene Zellen innerhalb der BALT-GCs inkorporiert, sodass sich ein ringartiges Bild zeigt. Nach 12 Stunden wird auch das Zentrum zunehmend BrdU⁺, und die ursprüngliche, prominente ringartige Verteilung der BrdU⁺-Zellen verliert sich (Abbildung 50). Zwischen den GCs bzw. lymphoiden Follikeln sind sowohl nach drei Stunden als auch nach 12 Stunden sind nur sehr wenige BrdU⁺-Zellen zu erkennen. Abbildung 50 zeigt die Inkorporation von BrdU nach drei bzw. 12 Stunden im Vergleich mit der Bu1-Färbung.

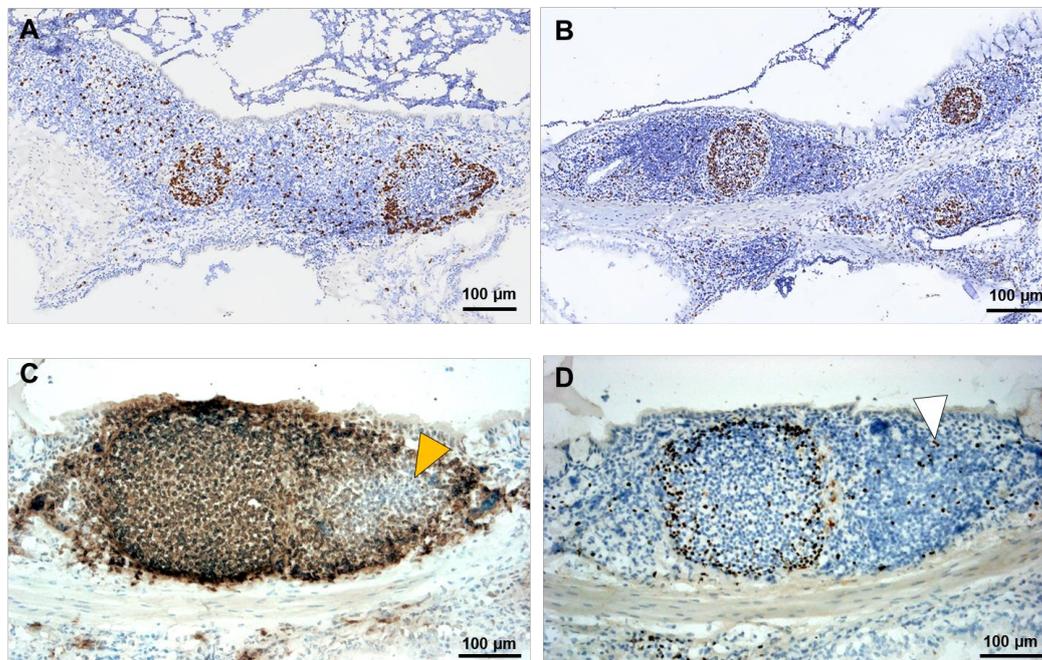


Abbildung 50: Immunhistochemische BrdU und Bu1-Färbung von BALT. **A:** Ein Ring aus BrdU⁺-Zellen in der Peripherie der GCs ist zu erkennen. Das Zentrum dagegen besteht aus BrdU⁻-Zellen. 3 h p.a. **B:** 12 h p.a. sind auch Zellen im Zentrum des GCs BrdU⁺. **C:** Bu1-Färbung eines BALT-GCs und lymphoiden Follikels. Das GC besteht aus Bu1⁺-Zellen, während das Zentrum des lymphoiden Follikels antikörpernegative Zellen enthält (gelber Pfeil). 3 h p.a. **D:** BrdU-Färbung. Das BALT-GC zeigt einen peripheren Ring aus BrdU⁺-Zellen, die sich auch mit Bu1-Antikörpern anfärben lassen. Der lymphoide Follikel weist nur vereinzelte BrdU⁺-Zellen auf (Pfeil).

Im extrabronchialen Gewebe sind nach drei Stunden im Bereich der Parabronchuswand und in den interparabronchialen Septen locker verteilte, BrdU⁺-Zellen zu erkennen. Auch in den GCs des extrabronchialen Gewebes lässt sich eine ähnliche Verteilung des Thymidin-Analogons darstellen wie sie bereits für die BALT-GCs beschrieben wurde: die BrdU⁺-Zellen befinden sich drei Stunden nach Applikation auch hier im Randbereich und bilden einen peripheren Ring (Abbildung 51).

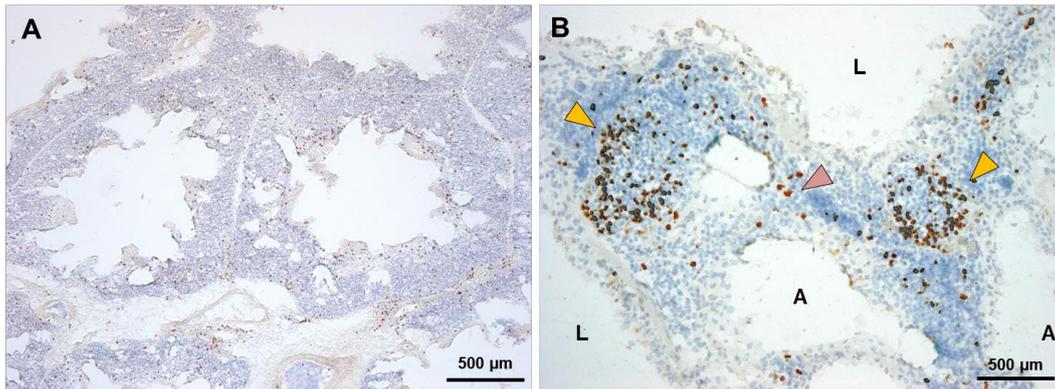


Abbildung 51: BrdU-Färbung des extrabronchialen Lungengewebes. **A:** Parabronchien im Querschnitt. Die IPBS und die Parabronchuswand zeigen gleichmäßig verteilte BrdU⁺-Zellen. **B:** Zwei extrabronchiale GCs in Anbildung (gelbe Pfeile). Die BrdU⁺-Zellen befinden sich vor allem in der Peripherie der GCs, wo sie eine ringartige Begrenzung bilden. Dazwischen sind vereinzelte BrdU⁺-Zellen zu erkennen (roter Pfeil). A: Atrium, L: Lumen des Parabronchus, 3 h p.a.

6.4 Partikelablagerung im Bereich der Keimzentren und Atrien

Bei allen über sechs Monate alten Tieren fielen Ablagerungen dunkelbrauner bis schwarzer Partikel im Bereich der GCs auf. Diese Partikel konnten auch bei Tieren gefunden werden, denen keine Partikel appliziert wurden. Die Ansammlungen bestehen aus heterogenem Material und erscheinen teilweise „gläsern“. Sie befinden sich entweder im GC (Abbildung 54 C Abbildung 56 B) oder aber im Bereich der Bindegewebskapsel und liegen ihr entweder von innen oder von außen auf (Abbildung 54–Abbildung 56). Einige dieser Ablagerungen können auch außerhalb der GCs im Bereich der Atriensepten gefunden werden, wie in Abbildung 54 B, Abbildung 52 sowie in Abbildung 56 D und E dargestellt. Die Partikel sind darüber hinaus auch innerhalb nicht-organisierter lymphoider Follikel zu sehen. Diese Beobachtungen konnten unabhängig von Fixier-, Einbett- und Färbemethode gemacht werden (Abbildung 56). Die immunhistochemische Färbung mit Bu1 und KUL01 ist innerhalb dieser Ablagerungen negativ. Lediglich in der anti-CD45- und CVI-ChNL-68.1-Färbung lassen sich positive

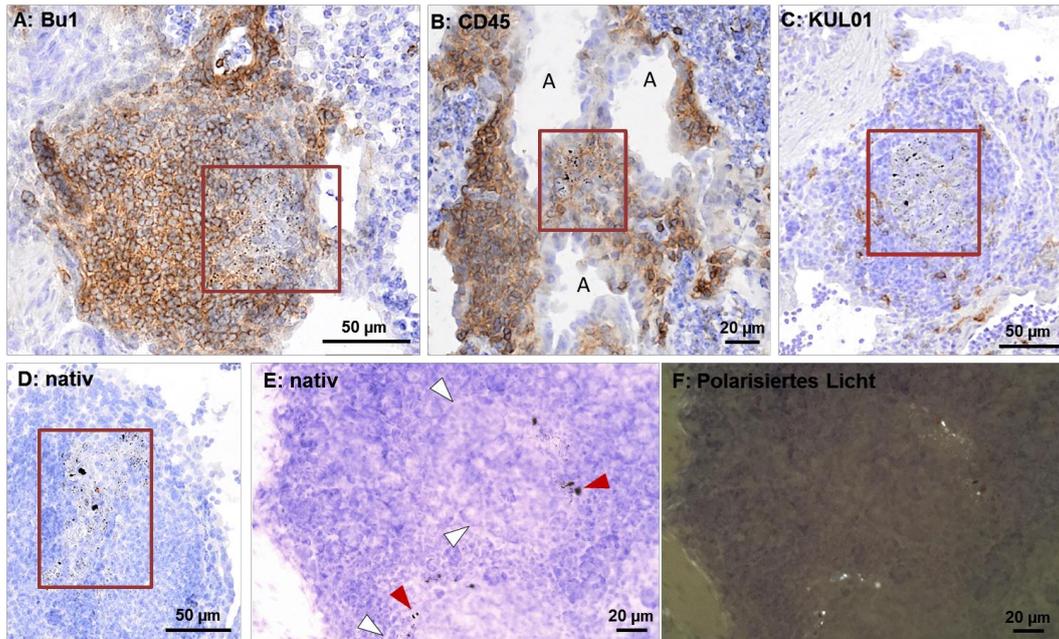


Abbildung 54: Immunhistochemische Färbungen von extrabronchialen GCs und von BALT. Das rote Rechteck kennzeichnet jeweils die Partikelablagerungen. **A:** Die Partikelablagerungen sind am Rand des extrabronchialen GCs zu erkennen. In diesem Bereich sind die GC-Zellen Bu1-negativ. **B:** Atrien mit Partikelablagerungen. Die Zellen in der unmittelbaren Umgebung sind CD45⁺. **C:** Partikelablagerungen im GC. KUL01⁺-Zellen sind in der Umgebung zu erkennen, jedoch ohne Kontakt zu den Partikeln. **D:** Partikelablagerungen im BALT, die dem GC außen aufliegen. **E und F:** Partikelablagerungen (rote Pfeile) entlang der Bindegewebskapsel (weiße Pfeile) zweier GCs. Im polarisierten Licht stellen sich die Partikel als doppelt-lichtbrechend dar. HE (E), Polarisation (F).

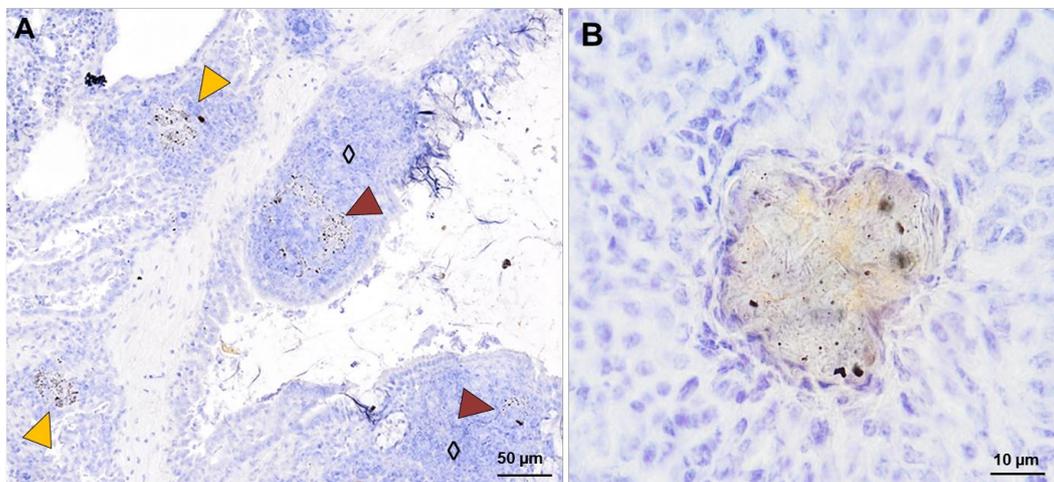


Abbildung 55: Partikelablagerungen im Bereich des Primärbronchus und der Milz. **A:** Partikelablagerungen (blaue Pfeile) sind sowohl im Randbereich sich organisierender BALT-GCs (◇) als auch im extrabronchialen Gewebe (gelbe Pfeile) zu erkennen. **B:** Milz mit Partikelablagerung. Die Partikel wirken „gläsern“ und besitzen eine inhomogene Form, Hämalanfärbung.

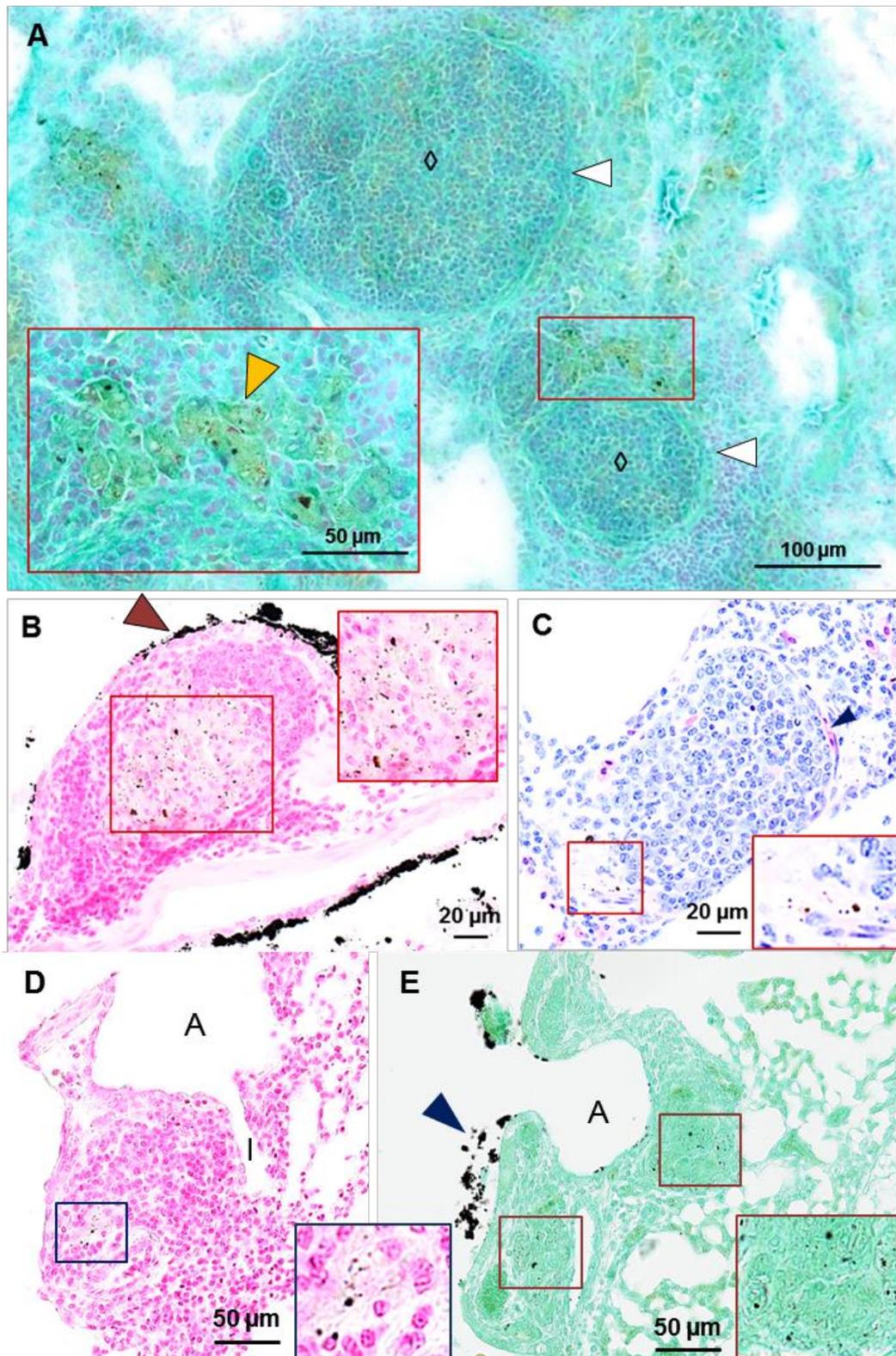


Abbildung 56: Partikelablagerungen im Bereich des BALT und der extrabronchialen GCs. Unterschiedliche Fixierung, Einbettung und Färbung. **A:** Extrabronchiale GCs (◇) mit Bindegewebskapsel (weiße Pfeile). Die Partikelablagerungen liegen dem GC außen auf (Inlay, orangener Pfeil). Das Zytoplasma der unmittelbar umgebenden Zellen färbt sich gelb-grünlich an. Gefrierschnitt, Kernechtrot-Lichtgrün. **B:** BALT-GC mit zentralen Partikelablagerungen (Inlay). Dem FAE haftet Tusche an (Pfeil), Paraffineinbettung, Kernechtrot. **C:** Extrabronchiales GC mit Bindegewebskapsel (Pfeil) und Partikelablagerungen im Randbereich (Inlay), HE. **D und E:** Tusche an der Oberfläche (E, Pfeil) und Partikelablagerungen in den Atriensepten (Inlays). Kernechtrot (D) und Lichtgrün (E). A: Atrium, I: Infundibulum, T3/2, 60 min p. a. (B, D, E), GMA-Einbettung, ohne Partikelapplikation (C), Gefrierschnitt, ohne Partikelapplikation (A).

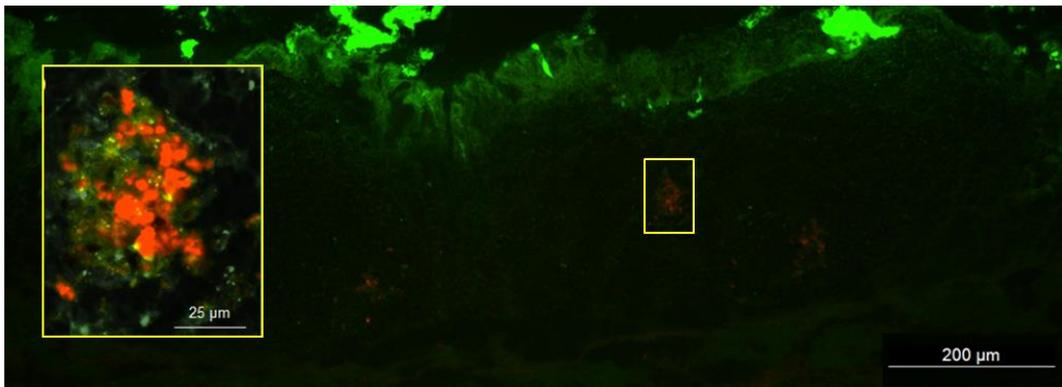


Abbildung 57: Fluoreszenzhistologische KUL01-Färbung von BALT. Das FAE ist deutlich FITC⁺, während das darunterliegende Parenchym FITC⁻ ist. In der Nähe der BALT-GCs sind fokale Ansammlungen von KUL01⁺-Zellen erkennbar (Inlay). KUL01⁺-Zellen = rot-orange, FITC = grün, FITC-Tier 5, 10 min p.a.

7. Immunhistochemische Endothelzellfärbung

Die Tusche- und Beads-Versuche zeigten eine deutliche Partikelansammlung in den interparabronchialen Septen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Gefrierschnitte mit einem Hühner-Endothelzellantikörper gefärbt, um zu untersuchen, ob es sich bei den IPBS um pulmonale Lymphgefäße handelt. Da die Lymphgefäße des Huhns nur schwer histologisch darzustellen sind, diente das Lymphherz eines jungen Tieres als Positivkontrolle. Die immunhistochemische Färbung mit dem Endothelzellantikörper 1A3a führt zu einer spezifischen, positiven Färbung aller Blutgefäße, einschließlich der Blutkapillaren. Im Bereich des BALT sind kleine, antikörperpositive Blutgefäße erkennbar (Abbildung 58 B). Allerdings stellen sich die IPBS in der immunhistochemischen Färbung negativ dar (Abbildung 58 A). Um zu verifizieren, ob der Antikörper Lymphendothelzellen färbt, wurde die immunhistochemische Untersuchung am Lymphherzen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sich selbst das Endothel des Lymphherzens nicht mit dem Endothelzellantikörper 1A3a anfärben ließ, während sich Blutgefäße im umgebenden Gewebe positiv darstellten (Abbildung 59).

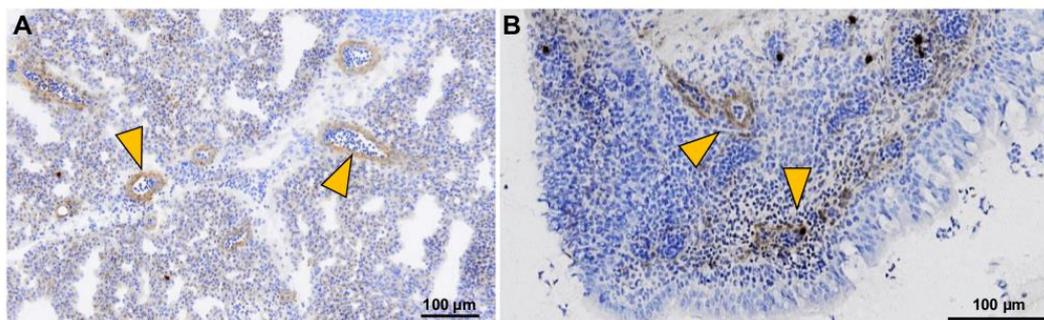


Abbildung 58: Immunhistochemische Färbung mit dem gewonnenen Endothelzellantikörper 1A3a. **A:** Zwickelbereich mit mehreren, antikörperpositiven Blutgefäßen (Pfeile). Die IPBS sind 1A3a-negativ. **B:** BALT mit kleinen Blutgefäßen innerhalb des lymphoiden Follikels (Pfeile).

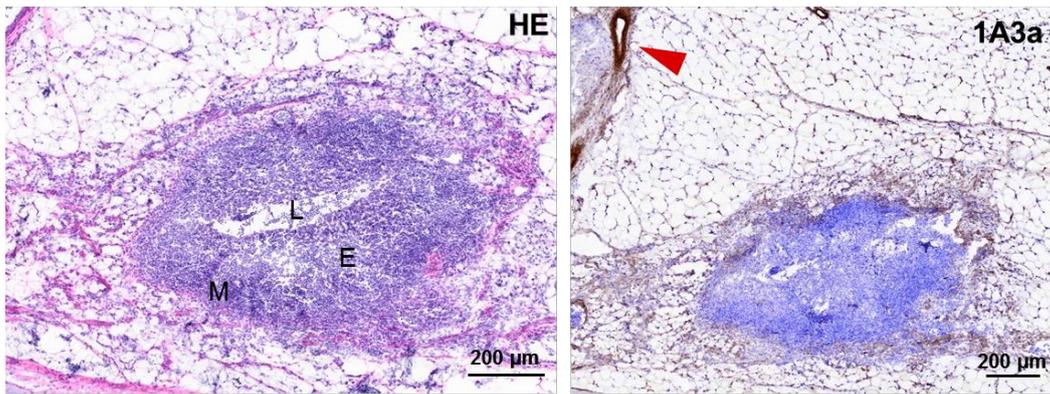


Abbildung 59: Lymphherz eines eine Woche alten Huhns. **Links:** HE-Färbung eines Lymphherzes. **Rechts:** immunhistochemische Färbung mit dem Endothelzellantikörper 1A3a. Das Lymphendothel stellt sich 1A3a-negativ dar, bei gleichzeitiger Positivität der Blutgefäße (Pfeil). L: Lumen, E: Endokard, M: Myokard.

8. Tracheale Infektion mit aviären pathogenen *E. coli*

Die Lungen wurden jeweils zum Zeitpunkt Null, eine Minute, fünf Minuten, 10 und 30 Minuten nach intratrachealer Applikation der aviären pathogenen *E. coli* (APEC) entnommen und für die transmissionselektronenmikroskopische Begutachtung fixiert (s. Kapitel 2.7). Bei der Untersuchung der Proben kann eine hohe Reaktivität auf die tracheale Infektion im Bereich der Atrienepithelien beobachtet werden. Zum Zeitpunkt Null finden sich keine reaktiven Veränderungen im Lungengewebe. Nach bereits einer Minute sind die *E. coli*-Bakterien vermehrt im Lumen der großen und kleinen Bronchien zu finden und zeigen teilweise enge Nähe zum Atrienepithel (Abbildung 60 A). Nach 10 Minuten werden die Bakterien von Zytoplasmafortsätzen des Atrienepithels umschlossen und können bereits intraepithelial lokalisiert werden (Abbildung 60 B). Nach weiteren 20 Minuten kann eine zunehmende Phagozytose der Bakterien festgehalten werden (Abbildung 60 B, D und E). Das Atrienepithel ist deutlich reaktiv und zeigt entzündliche Veränderungen in Form von verschmolzenen, plump wirkenden Zytoplasmafortsätzen. Makrophagen wandern aus dem Luftkapillarbereich an die Oberfläche (Abbildung 60 C).

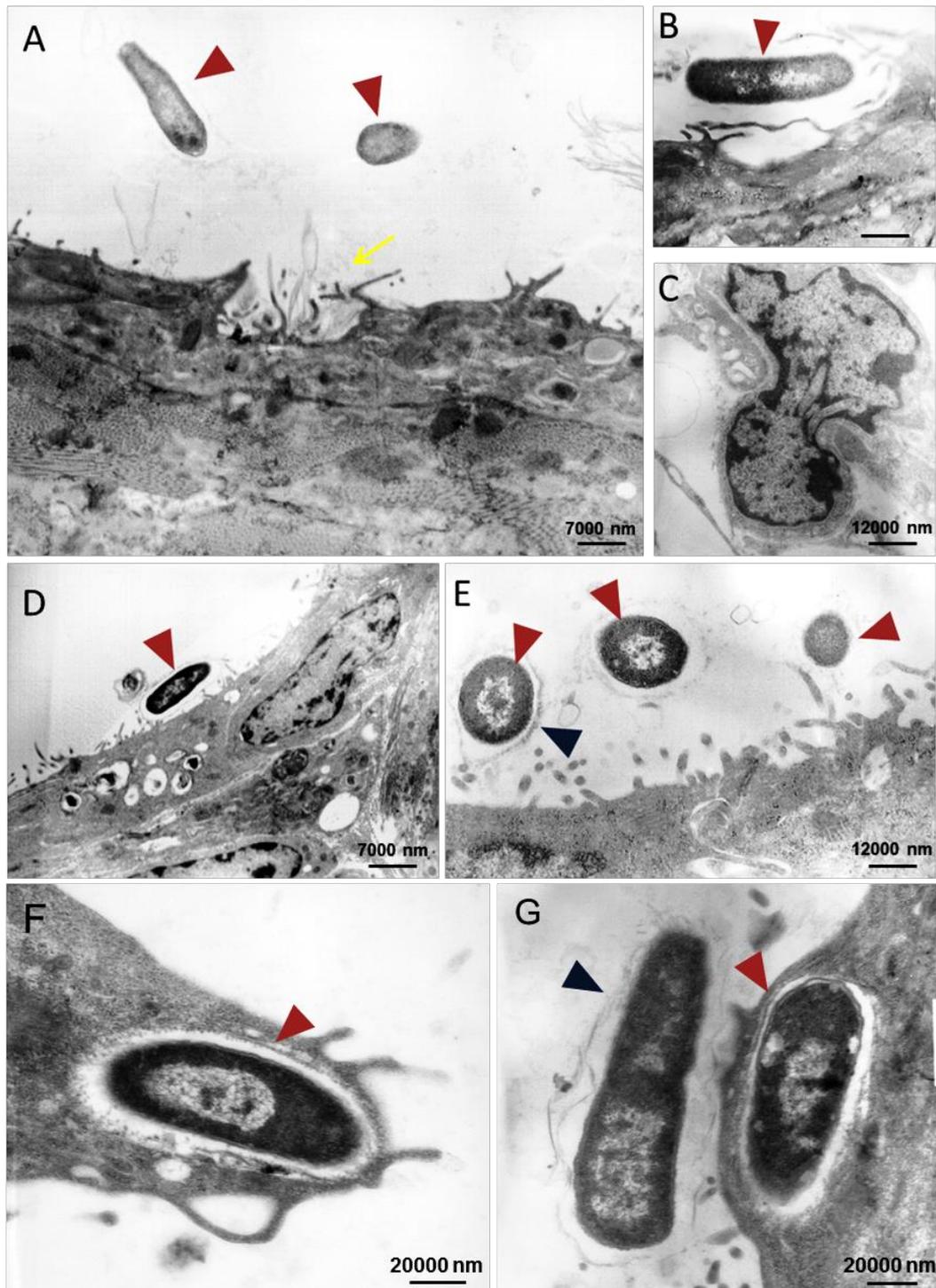


Abbildung 60: Atrienbereich nach APEC-Infektion. **A:** Atrienepithel mit Zytoplasmafortsätzen (gelber Pfeil). Im Lumen sind zwei *E. coli* zu sehen (rote Pfeile). **B:** *E. coli* (roter Pfeil) mit engem Kontakt zum Atrienepithel. Die Zytoplasmafortsätze scheinen das Bakterium zu umschließen. **C:** Im Luftkapillarbereich wandert ein Makrophage aus dem Gewebe an die Epitheloberfläche. **D:** Ein *E. coli* (roter Pfeil) steht in engem Kontakt zum Atrienepithel. **E:** Mehrere *E. coli* (rote Pfeile) mit deutlich erkennbarer Bakterienwand (blauer Pfeil) in der Nähe des Atrienepithels, welches deutliche Zytoplasmafortsätze besitzt. **F und G:** Atrienepithel mit eng in Kontakt stehenden (blauer Pfeil) bzw. phagozytierten *E. coli* (rote Pfeile). A: 1 min p.a., B–G: 30 min p.a.

9. Expression der Gene Bu1 und AID nach NDV-Impfung

Um zu untersuchen, ob die NDV-Vakzinierung mittels Augentropfmethode zu einer pulmonalen Immunität führt, wurde die Genexpression der B-Zell-Gene Bu1 (chB6) und AID (Gen im Rahmen der germinalen Zentrumsreaktion) bestimmt.

9.1 Expression von Bu1

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von Bu-1 sind in Abbildung 61 A dargestellt. Die einfache Impfung (Prime) führt im Vergleich zu den Prime-Kontrolltieren zu einem signifikanten Anstieg der Expression von Bu1 in der Trachea ($p = < 0,03$) sowie im Primärbronchus ($p = < 0,05$). Im Parenchym der Prime-Tiere ist im Vergleich zu den Kontrolltieren ein relevanter, jedoch nicht-signifikanter Anstieg der Genexpression zu beobachten. Bei den zweifach-geimpften Tieren (Boost) lässt sich im Vergleich zu den Boost-Kontrolltieren ein signifikanter Anstieg der Genexpression in Parenchym, Trachea ($p = < 0,02$) und Milz ($p = \leq 0,05$) darstellen. Im Primärbronchus findet sich ein relevanter, jedoch nicht signifikanter Genexpressionsanstieg. Der Vergleich der dCt-Werte zwischen Einfachimpfung (Prime) und Zweifachimpfung (Boost) zeigt bei den Boost-Tieren einen signifikanten Anstieg der Bu1-Genexpression in der Trachea ($p = < 0,02$). Die Unterschiede im Parenchym sowie im Primärbronchus sind nicht relevant und zeigen keine Signifikanz.

9.2 Expression von AID

Die pulmonale Immunantwort nach konjunktivaler NDV-Impfung wurde mittels quantitativer Bestimmung des Enzyms *activation induced cytidine deaminase* (AID) in den verschiedenen Lungenbereichen untersucht. Dieses Enzym wird im Rahmen des Immunglobulin-Klassenwechsels sowie der somatischen Hypermutation exprimiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 61 B dargestellt. Bei den Prime-Tieren lässt sich im Vergleich zu den Prime-Kontrolltieren ein signifikanter Anstieg der Expression von AID in Primärbronchus, Parenchym ($p = < 0,03$) und Trachea ($p = \leq 0,05$) feststellen. Die Boost-Tiere zeigen im Vergleich zu den Boost-Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg der Genexpression von AID in den Geweben Primärbronchus ($p = < 0,03$), Parenchym und Trachea ($p = < 0,005$) sowie Milz ($p = \leq 0,05$). Der Vergleich der dCt-Werte zwischen Prime- und Boost-Tieren ergibt in allen untersuchten Geweben keinen relevanten oder signifikanten Anstieg der Expression von AID.

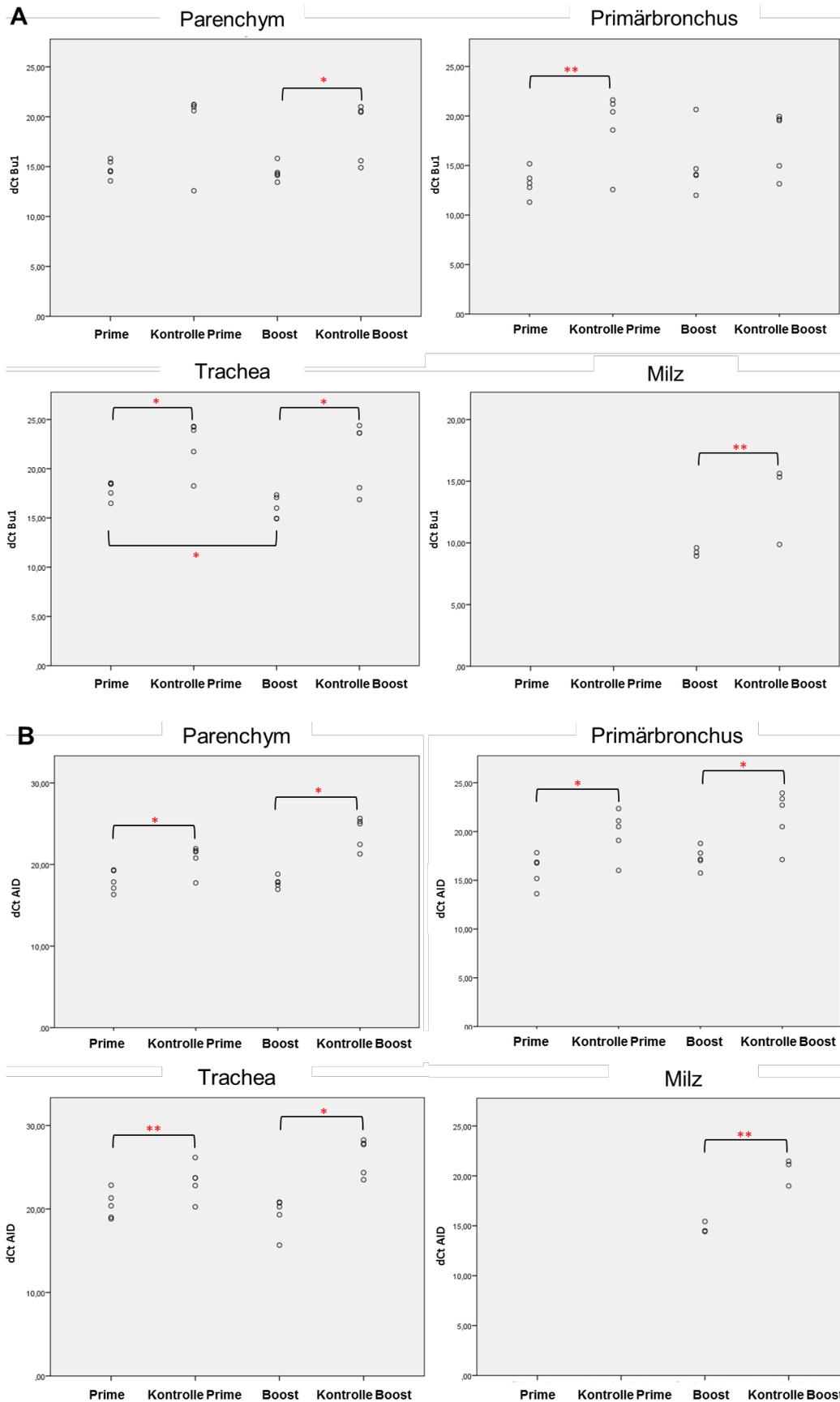


Abbildung 61: Punktdiagramm der Bu1- und AID-dCt-Werte jedes Kontroll- und Impftieres in Abhängigkeit vom Gewebe. **A:** Bu1, **B:** AID. Die Ergebnisse sind als dCt-Werte dargestellt, somit entspricht ein niedriger Wert einer hohen Expression. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. *: $p < 0,03$, **: $p \leq 0,05$.

9.3 Immunhistochemische Untersuchung

Um immunhistochemische Unterschiede zwischen geimpften Tieren und Kontrolltieren zu vergleichen, wurden Gefrierschnitte von Lunge, CALT und Trachea eines zweifach-geimpften Tieres (Boost) und eines Boost-Kontrolltieres immunhistochemisch mit einem anti-Bu1- und anti-IgA-Antikörper gefärbt (Abbildung 62). Es wurden Proben der zweifach-geimpften Tiere verwendet, um sicherzugehen, dass genug NDV-spezifische Immunglobuline und B-Zellen vorhanden waren. Dabei wurde bewusst ein Tier mit hoher Bu1- und AID-Genexpression gewählt.

Ziel dieser Untersuchung war, NDV-spezifische B-Zellen bzw. Immunglobuline immunhistochemisch darzustellen und die Impf- bzw. Kontrolltiere hinsichtlich ihrer Immunantwort miteinander zu vergleichen. Dazu wurden Gefrierschnitte der Lungen eines Boost-Tieres und eines Boost-Kontrolltieres mit dem verwendeten NDV-Lebendimpfstoff (*AviPro® ND C131 der Firma Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG*) bedeckt. Das Impfvirus wurde mit einem aus dem Kaninchen gewonnenen Antiserum gegen den verwendeten NDV-Impfstamm LaSota (*persönliche Kommunikation*) gebunden und dieser mit einem Peroxidase-konjugierten donkey-anti-rabbit-Sekundärantikörper detektiert (s. Kap. 5.6). Als Negativkontrolle für das Antiserum wurde auf einen Schnitt PBS statt NDV-Impfstoff aufgetragen. Für die Negativkontrolle des Sekundärantikörpers wurde das Antiserum durch PBS ersetzt.

Das Antiserum bindet NDV und der Sekundärantikörper bindet spezifisch an das Antiserum, wie anhand von Negativkontrollen kontrolliert wurde. Das Kontrolltier zeigt im Vergleich zu dem geimpften Boost-Tier keine spezifischen, antikörperpositiven Zellen im Bereich der BALT-GCs sowie im Primärbronchusepithel (Abbildung 63). Allerdings zeigt der Schnitt deutlich mehr Braunfärbung als die Negativkontrolle. In der Bu1- und IgA-Färbung der Schnittpräparate von CALT und Trachea konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl antikörperpositiver Zellen dargestellt werden. Lediglich im BALT des Impftieres (Boost) finden sich mehr GCs, während beim Kontrolltier weniger GCs mit Bindegewebskapsel erkennbar sind (Abbildung 62 A und B).

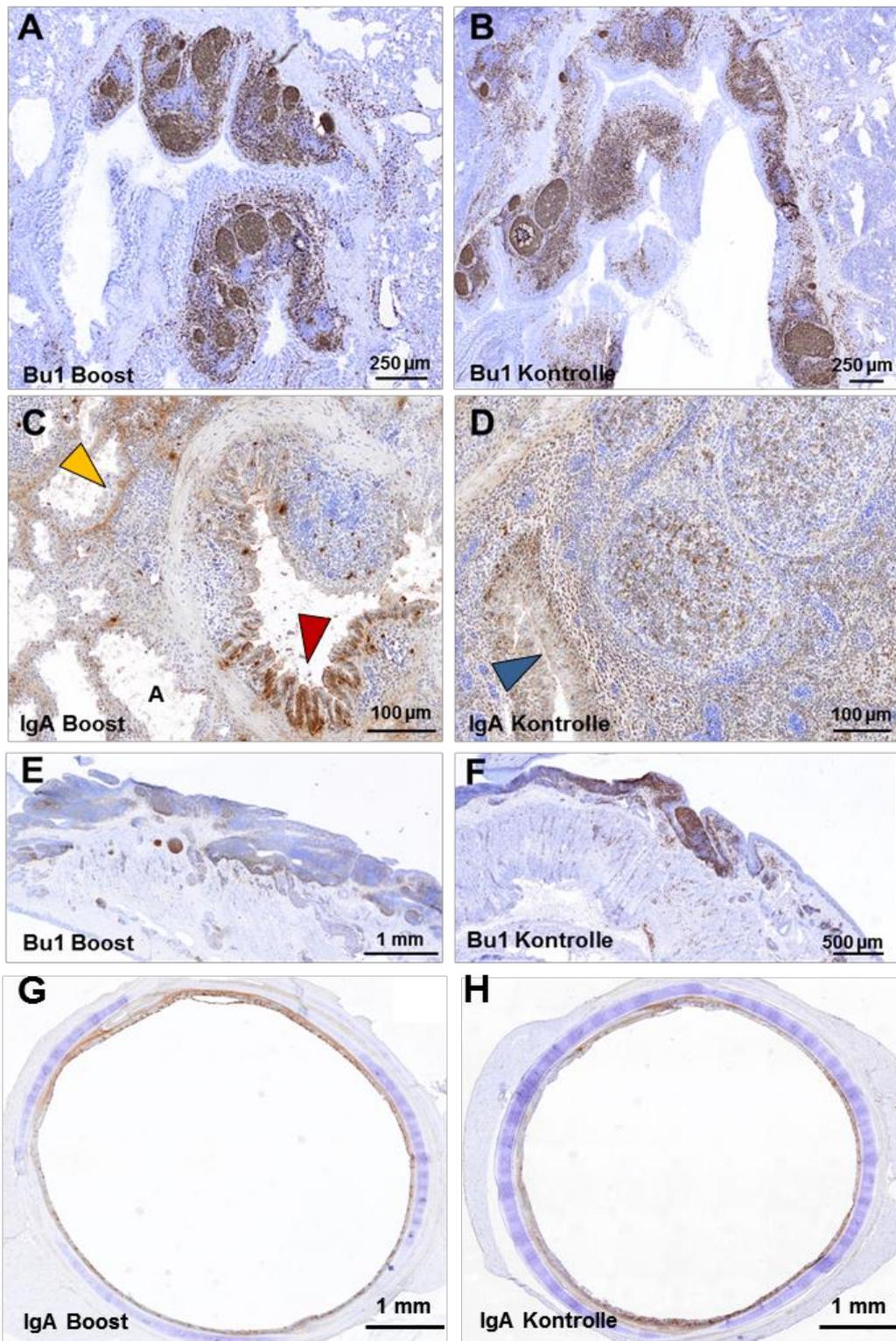


Abbildung 62: Immunhistochemische Färbungen von BALT, CALT und Trachea. **A und B:** Bu1-Färbung am BALT eines Impf- (Boost) und Kontrolltieres. Das BALT des Impftieres enthält mehr klar von einer Bindegewebskapsel begrenzte GCs als das Kontrolltier. **C und D:** IgA-Färbung am BALT eines Impf- (Boost) und Kontrolltieres. Das Primärbronchusepithel des Impftieres stellt sich IgA⁺ dar (Pfeil). Antikörperpositive Zellen sind auch vereinzelt im BALT und im Bereich der Atriensepten zu erkennen (gelber Pfeil), A: Atrium. Das Kontrolltier zeigt eine weniger deutliche IgA-Positivität im Bereich des Primärbronchusepithels, in den BALT-GCs sind jedoch zahlreiche IgA⁺-Zellen zu sehen. **E und F:** Bu1-Färbung am CALT von Impf- (Boost) und Kontrolltier. Es sind keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der B-Zellen zu erkennen. **G und H:** IgA-Färbung an Trachea von Impf- (Boost) und Kontrolltier. Auch hier lässt sich kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Menge an IgA feststellen.

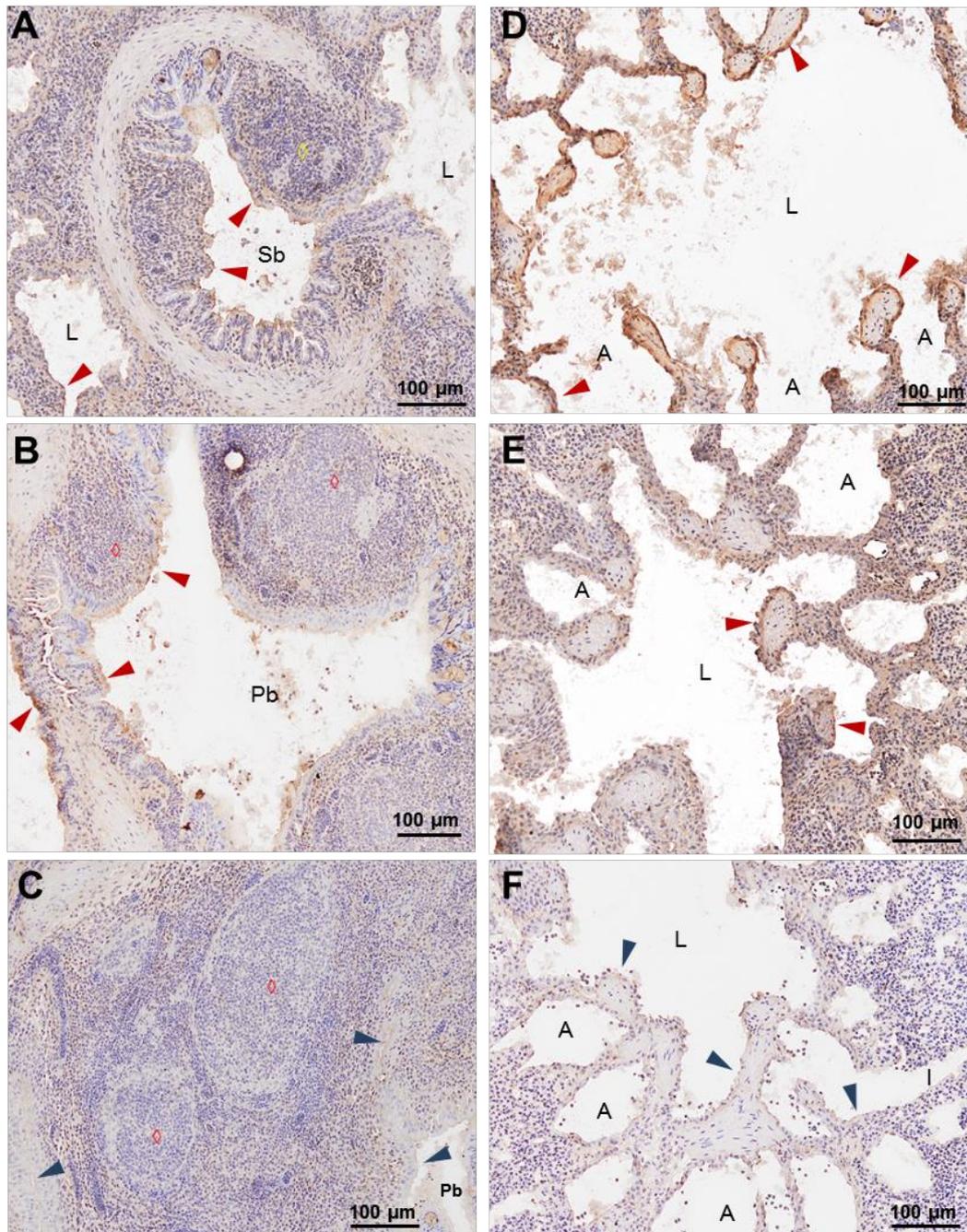


Abbildung 63: Immunhistochemische anti-NDV-Färbung an BALT und Atrien eines Impf- und Kontrolltieres. **A und D:** BALT und Atrien eines zweifach-geimpften Tieres (Boost) am Abgang eines Sekundärbronchus. Das respiratorische und follikelassoziierte Epithel sowie das Atrienepithel sind antikörperpositiv (rote Pfeile). **B und E:** BALT und Parabronchus sowie Atrien desselben Impftieres mit Applikation von PBS statt des Impfstoffes. Das Epithel des Primärbronchus und der Atrien ist stellenweise anti-NDV⁺ (rote Pfeile). **C und F:** Kontrolltier, mit Impfstoffapplikation. BALT im Bereich des Primärbronchus mit negativem respiratorischem und follikelassoziertem Epithel sowie negativem Atrienepithel (blaue Pfeile). ◇: BALT, Pb: Primärbronchus, Sb: Sekundärbronchus, L: Parabronchuslumen, A: Atrium, I: Infundibulum.

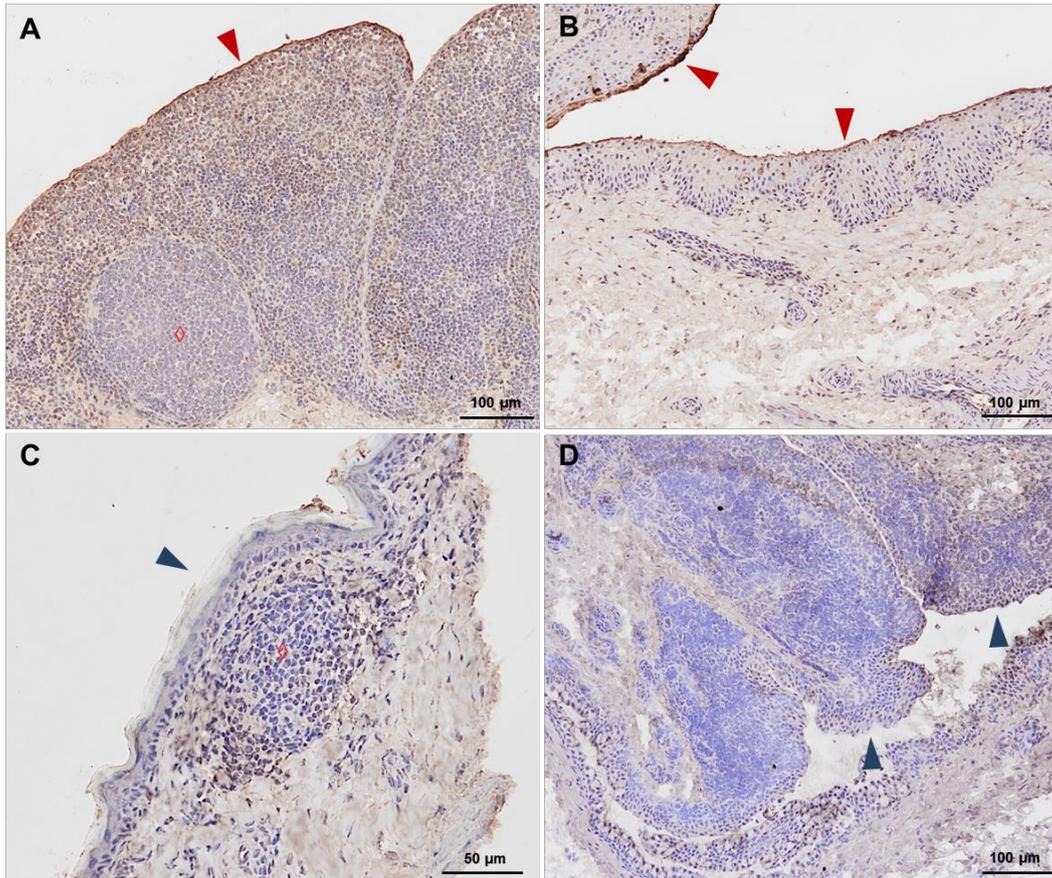


Abbildung 64: Immunhistochemische anti-NDV-Färbung von CALT eines Impf- und Kontrolltieres. **A und B:** Das Follikelassoziierte Epithel (A) und das nicht-CALT-assoziierte Epithel (B) zeigen eine deutliche Positivität. **C und D:** Follikelassoziiertes (C) und nicht-follikelassoziiertes Epithel (D) des CALT eines Kontrolltieres. Das Epithel weist keine Färbung auf. \diamond : Lymphoider Follikel.

VI. DISKUSSION

In der konventionellen Hühnerhaltung herrscht ein staub- und erregereiches Umfeld, mit dem sich die aviäre Lunge permanent auseinandersetzen muss. Federstaub und Mikroorganismen, die über Einstreu- und Kotpartikel inhaliert werden, stellen hohe Anforderungen an das pulmonale Immunsystem. Trotz der enormen wirtschaftlichen Bedeutung respiratorischer Erkrankungen beim Geflügel ist im Vergleich zum Säuger relativ wenig über das lokale Immunsystem des Atmungstrakts bekannt. Dies ist – verglichen mit der Säugerylunge – zum einen der unterschiedlichen und komplexeren Anatomie der Vogellunge und den bisher nicht nachgewiesenen pulmonalen Lymphgefäßen und -knoten geschuldet. Zum anderen unterscheiden sich beim Säuger etablierte Marker bestimmter Immunzellpopulationen von denen des Vogels, sodass das Wissen über die Säugerylunge insgesamt kaum auf die Vogellunge übertragbar ist. Wie das aviäre Lungengewebe bzw. das pulmonale Immunsystem mit inhalierten Partikeln oder Erregern umgeht, ist daher wenig erforscht.

Der aktuelle Wissensstand stützt sich vor allem auf durchflusszytometrische und wenige histologische Untersuchungen, wobei letztere durch die erwähnte Komplexität der Vogellunge erschwert werden. Während sich ältere Forschungsarbeiten insbesondere mit dem BALT und dessen follikelassoziiertem Epithel befassten [9, 10, 144, 157, 160, 165], rückte die pulmonale Antigenaufnahme durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) erst in jüngerer Zeit in den Fokus der Forschung. Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten den Aufnahmeort inhalierten Antigene zu bestimmen bzw. die Aufnahme durch APCs zu quantifizieren [1, 135]. Der Schwerpunkt lag hierbei jedoch auf der vergleichenden Aufnahme in den Respirationstrakt-assoziierten lymphatischen Geweben wie der Harder'schen Drüse oder dem CALT bzw. NALT und der Lunge im Ganzen, weniger den einzelnen Bereichen innerhalb der Lunge. Sofern histologische Verfahren angewandt wurden, fand dies auf kollabiertem Gewebe statt [221], wodurch die Beurteilung der phagozytisch bedeutsamen Atrien nur sehr eingeschränkt möglich ist. Forschungsarbeiten, die Partikel in die Hühnerlunge eingaben, untersuchten vorrangig deren Verteilung innerhalb der Lunge und nicht die lokale Reaktion des Immunsystems auf das Fremdmaterial [37, 167-169]. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Partikelaufnahme in der Hühnerlunge erstmals systematisch untersucht und die extrabronchialen Strukturen, wie die bisher wenig erforschten germinalen

Zentren (GCs) des Lungenparenchyms sowie die interparabronchialen Septen, näher beschrieben. Mithilfe einer für die Hühnerlunge etablierten Methodik [9] konnte die Lunge in aufgespanntem Zustand sowohl konventionell-histologisch als auch immunhistochemisch untersucht werden. Durch Genexpressionsanalysen wurde die Immunantwort zweier Kompartimente der Lunge – des Parenchyms und des Primärbronchus bzw. der Trachea – miteinander verglichen. Während bisherige Untersuchungen die Viruslast in der Lunge nach experimenteller Infektion nachwiesen [194, 222, 223] oder die Immunantwort der Lunge undifferenziert betrachteten [3], wird in dieser Arbeit erstmals die Bedeutung des Parenchyms bei der viralen Immunabwehr mit der des Primärbronchus bzw. der Trachea verglichen.

Unter Praxisbedingungen sind die Partikel aus dem Haltungsumfeld von heterogener Natur und können belebt oder unbelebt sein (grober und feiner Staub in Form von Einstreu-, Futter- sowie Kotpartikel und Mikroorganismen). Die Methodik in dieser Arbeit bildet diese Situation ab, indem grobe Partikel (Tusche), feinere Partikel (Latex-Beads) und äußerst feine, molekulare Substanzen (Fluoresceinisothiocyanat, Neutralrot) sowie Erreger (*E. coli*) zum Einsatz kamen. Die Versuche aus dieser Arbeit wurden aus Tierschutzgründen in Anlehnung an das „3R-Prinzip“ (*Replacement, Reduction, Refinement*) kurze Zeit *post mortem* durchgeführt. Um die physiologische Verteilung der Partikel bei der Atmung am toten Tier möglichst realistisch nachzuahmen, wurde die gesamte Lunge durch intratracheale Applikation gefüllt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Partikel bis in die luftaustauschenden Areale gelangten und die Antigenaufnahme in den unterschiedlichen Bereichen der Lunge untersucht werden konnte. Die lokale Applikation mittels Katheter ermöglichte dagegen die Fokussierung auf einen bestimmten Bereich des Primärbronchus.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der histologischen Untersuchung der Partikelaufnahme. Ziel war es, bevorzugte Phagozytosebereiche der Lunge in Abhängigkeit der Partikelart (Tusche, Latex-Beads, FITC, *E. coli*) zu identifizieren und die beteiligten Zellen histologisch zu charakterisieren. Auf die Quantifizierung der phagozytierenden Zellen wurde verzichtet, da sich verschiedene Arbeiten, u. a. unter Einsatz der Durchflusszytometrie, mit diesem Thema beschäftigten [1, 135, 224].

Eine in der Literatur beschriebene, altbewährte Methode, die Partikelaufnahme histologisch darzustellen, ist die Applikation von **Tusche**. Damit können nicht nur bestimmte Areale makroskopisch markiert werden [219, 225], sondern die Kohlenstoffpartikel aus der Tusche sind sowohl lichtmikroskopisch als auch transmissionselektronenmikroskopisch gut darstellbar. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Größe der Kohlenstoffpartikel von unter 2 μm [226] sowie die unkomplizierte Handhabung und gute Reproduzierbarkeit der Versuche. Ein Nachteil dieser Methode stellt allerdings die eingeschränkte Aussagekraft hinsichtlich des Mechanismus der Aufnahme dar. Da Kohlenstoffpartikel ihrer Natur nach unbelebte, nicht-infektiöse Partikel darstellen, ist jedoch von einer unspezifischen Aufnahme in Form von Phagozytose durch APCs auszugehen [227, 228]. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Tuscheaufnahme in unterschiedlichen Organen. Die intratracheale Tuscheapplikation ist beim Säuger bereits durchgeführt worden [170]. Vor rund 90 Jahren näherte sich *Dotterweich* dem Weg der Atemluft beim Vogel an, indem er Enten, Tauben und Grünfinken stark rußhaltiger Luft aussetzte und den Weg der Atemluft anhand der Rußablagerung, d. h. in erster Linie der Kohlenstoffpartikelablagerung, in der Lunge rekonstruierte [37]. Hierbei untersuchte er jedoch weder den zellulären Aufnahmemechanismus, noch die Feinverteilung.

Da sich die Lunge des Vogels in ihrer Struktur wesentlich von der des Säugers unterscheidet [5, 6, 31], ist eine Übertragung der Methodik bzw. der Ergebnisse aus den Säugerversuchen auf das Huhn als Vertreter der Spezies Vogel nicht möglich. Beim Hausgeflügel Pute und Huhn wurde die Eingabe von Tusche an den MALT-Gewebe CALT [146, 185] oder der Bursa Fabricii [186] sowie am Dottersack und Meckel'schen Divertikel [187] durchgeführt. Dabei zeigte sich bei lichtmikroskopischer Untersuchung, dass die Kohlenstoffpartikel aus der Tuschesuspension aufgenommen werden und mit zunehmender Dauer immer tiefer im Gewebe zu finden sind. *Fix und Arp* stellen nach dreißigminütiger Einwirkzeit fest, dass sich die Partikel subepithelial im CALT befinden. Diese Ergebnisse und auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Kohlenstoffpartikel aus der Tusche auch durch Epithelzellen und APCs des Respirationstrakts aufgenommen werden können. Somit ist die Tusche als ein geeignetes Mittel für die Darstellung der Partikelverteilung und -aufnahme in der Lunge mithilfe von histologischen Methoden anzusehen.

Mikropartikel bzw. **Beads** sind dagegen ein modernes Mittel, die Interaktion des Organismus mit Fremdpartikeln zu untersuchen. Ein Vorteil der Beads ist die Möglichkeit, diese u. a. mit verschiedenen mikrobiellen Antigenen zu ummanteln, wie z. B. Lipopolysacchariden oder ganzen Viren wie dem *Newcastle Disease Virus* oder dem aviären *Influenzavirus* [1, 135]. Dadurch können Infektionen nachgeahmt und der Aufnahmemechanismus verschiedener Pathogene untersucht werden. Eine andere Variante stellt die Koppelung mit Meerrettichperoxidase, Fluoreszenzfarbstoffen oder Antikörpern dar, die eine spezifische Detektion der Beads im Gewebe ermöglichen [224, 229]. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zur Tusche ist die einheitliche Form und Größe, die eine sichere Detektion ermöglicht. Da Beads mit einer Größe von 1–3 µm eine Verteilung im gesamten aviären Respirationstrakt zeigen [167-169], wurden für die Versuche dieser Arbeit 1 µm durchmessende, ungekoppelte Beads gewählt. Dadurch konnte einerseits ein besserer Vergleich mit publizierten Arbeiten gezogen werden [1, 135]. Andererseits zeigten Forschungsergebnisse, dass auch ungekoppelte Beads durch Makrophagen mithilfe der Scavenger-Rezeptoren phagozytiert werden können [227, 228], wie z. B. im MALT des Kopfbereiches und in der Lunge des Huhns [1, 135]. *De Geus et al.* belegen eine favorisierte Aufnahme immunogener Beads durch APCs des aviären Respirationstraktes, vermuten aber für ungekoppelte Beads eine unspezifische Aufnahme durch Epithelzellen [135].

Der Fluoreszenzfarbstoff **Fluoresceinisothiocyanat (FITC)** kann effektiv durch B-Zellen der Bursa Fabricii aufgenommen werden [230]. In einem jüngeren Versuch wurden TRITC-gekoppelte Beads und deren Verteilung bzw. Aufnahme im Organismus u. a. fluoreszenzmikroskopisch beurteilt [224]. *Berghof et al.* postulieren eine Aufnahme der Beads durch Leukozyten bzw. Epithelzellen des Respirationstraktes, jedoch ohne nähere Analyse. Diese Forschungsergebnisse zur Grundlage nehmend, wurde in der vorliegenden Arbeit reines FITC appliziert, ohne Koppelung an Beads, da zu diesem Zeitpunkt bereits Ergebnisse zur Verteilung und Aufnahme von Beads im Rahmen dieser Arbeit vorlagen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Verteilung bzw. der Aufnahme-mechanismus von FITC als molekulares Antigen im Gegensatz zu größeren Partikeln wie Kohlenstoffpartikeln oder Beads bzw. Mikroorganismen wie *E. coli*-Bakterien unterscheidet. Für diese Versuchsreihe wurde die lokale Applikation in den Primärbronchus mittels Katheter etabliert, um insbesondere die Reaktivität des BALT-Epithels zu untersuchen.

Die Applikation der Partikel erfolgte mit Ausnahme der *E. coli*-Bakterien jeweils wenige Minuten *post mortem*. Je nach Einwirkdauer der Partikel zeigen die Ergebnisse ein unterschiedliches histologisches Bild. Während die Kohlenstoffpartikel aus der Tusche nach 10 Minuten in großer Menge hauptsächlich am Atrien-, und BALT-Epithel kleben und nur spärlich im Parenchym zu finden sind, zeigt sich bei der maximalen Einwirkzeit der Tusche von 60 Minuten eine Anreicherung innerhalb der Atriensepten sowie bei einem Tier auch in Zellen des GC-Randbereichs. Auch die Ansammlung in den interparabronchialen Septen nimmt mit zunehmender Einwirkdauer zu, wie im Vergleich zu den Gefrierschnitten mit geringerer Einwirkzeit deutlich zur Darstellung kommt. Diese spezifische Verteilung und Aufnahme der Kohlenstoffpartikel kann nur erfolgen, wenn das Gewebe auch gewisse Zeit nach der Applikation noch vital ist. Wäre das Gewebe zu diesem Zeitpunkt bereits avital, müsste sich nach unterschiedlicher Einwirkdauer stets ein ähnliches histologisches Bild ergeben. Infektionsversuche an Vibratomschnitten von Hühnerlungen zeigten, dass Vitalitätszeichen des Gewebes in Form von Zilienschlag der Primärbronchus-schleimhaut und Bronchokonstriktion nach medikamentöser Stimulation nachweisbar sind. Der überwiegende Teil der Zellen stellte sich in der Lebend-Tot-Färbung als vital dar. Diese Vitalitätszeichen konnten bei Kultivierung in Zellkulturmedium bis zu eine Woche p. m. nachgewiesen werden [193, 203]. Durch tracheale Applikation von Neutralrot konnte gezeigt werden, dass sowohl die Atrienepithelien als auch Zellen der Lunge mit dem Phänotyp von Makrophagen oder dendritischen Zellen den Farbstoff aufnehmen. Dass Makrophagen in der Lage sind, Neutralrot zu phagozytieren, konnte durch Forschungsarbeiten gezeigt werden [231]. Die Atrienepithelien und Makrophagen waren in den Versuchen der vorliegenden Arbeit somit zum Zeitpunkt der Applikation noch vital und konnten den Farbstoff aufnehmen. Das histologische Bild der aufgenommenen Neutralrotlösung ähnelt dem Bild der phagozytierten Kohlenstoffpartikel.

Auf inhalierte Fremdantigene bzw. Partikel kann in der Lunge auf unterschiedliche Weise reagiert werden: sie können zunächst durch Mukus oder flimmerhaartragende Epithelzellen abgefangen werden, durch spezialisierte Zellen aufgenommen und weitertransportiert oder aber lokal abgekapselt bzw. reaktionslos abgelagert werden, wie es z. B. im Sinne der Anthrakose beim

Menschen oder bei Granulomen bekannt ist [232, 233]. Um die Reaktion des Lungengewebes zu analysieren ist es sinnvoll, den Weg der Partikel anhand ihrer Beschaffenheit und der Topographie der Lunge nachzuvollziehen. Eingeatmete Partikel treten zunächst mit den Lungenoberflächen in Kontakt. Hier sind einerseits das becherzell- und flimmerhaartragende **respiratorische Epithel** des Primärbronchus bzw. der Sekundärbronchien und andererseits das modifizierte bzw. **follikelassoziierte Epithel (FAE)** über dem BALT zu unterscheiden. Das respiratorische Epithel und das FAE kommen an erster Stelle mit inhalierten Antigenen in Berührung und beide sind den Ergebnissen dieser Arbeit nach in der Lage FITC aufzunehmen. Größere Partikel wie Tusche, aber auch feinere Partikel wie Latex-Beads werden vom respiratorischen Epithel abgefangen und bleiben im Mukus bzw. dem Flimmerepithel hängen. Im Bereich des FAE zeigt sich im Vergleich zu den Atrienepithelien jedoch wider Erwarten eine nur spärliche Partikelaufnahme, was in Kontrast mit der beschriebenen, deutlichen Phagozytose durch das BALT-Epithel beim Säuger steht [170, 183]. Mit zunehmender Einwirkdauer (10 vs. 60 Minuten) lässt sich vermehrt eine subepitheliale Lage der Kohlenstoffpartikel darstellen, wobei einige der Kohlenstoffpartikel auch in der Nähe der BALT-GCs nachweisbar sind, jedoch insgesamt in verhältnismäßig geringer Zahl. In der immunhistochemischen Färbung mit KUL01 zeigt sich eine Lagekorrelation positiver Zellen mit den Kohlenstoffpartikeln nahe dem FAE. Auch nach intratrachealer Applikation von Beads lässt sich diese Kolokalisation im Bereich des FAE finden. Eine tiefere Lage der Beads ließ sich lediglich bei einem Tier darstellen, was mit der im Vergleich zu den Tuscheversuchen methodisch bedingten, kürzeren Einwirkdauer der Beads-Suspension zusammenhängen könnte. Intratracheal appliziertes FITC-PBS-Gemisch reichert sich favorisiert im Epithel des Primärbronchus und der Atrien an, während das übrige Parenchym FITC-negativ ist. Einige Bereiche des Primärbronchusepithels bleiben vom Fluoreszenzfarbstoff ausgespart. Den konventionell-histologischen Vergleichsbildern dieser Arbeit nach sowie in Einklang mit lektinhistochemischen [192] Untersuchungen entsprechen diese Zellen Becherzellen des Epithels. Dieser Befund spricht dafür, dass es sich um eine spezifische Reaktion des Epithels handelt, bei der FITC durch spezielle Epithelzellen aufgenommen wird. Die Fähigkeit zur zellulären Aufnahme von FITC konnte auch am Beispiel der B-Zellen der Bursa Fabricii gezeigt werden [230]. Insgesamt weisen die Befunde dieser Arbeit darauf hin, dass das gesamte Epithel des Primärbronchus

einschließlich des FAE mit Ausnahme der Becherzellen zur Aufnahme von FITC befähigt ist, die Aufnahme 1–2 µm-durchmessender Partikel wie Tusche [226] und Beads aber nur an bestimmten Stellen des FAE stattfindet. Obwohl Zellen im FAE des BALT beschrieben sind, die morphologisch Ähnlichkeit mit M-Zellen besitzen [9, 11], gelang die histologische Zuordnung der aufgenommenen Partikel nicht. Durch lektinhistochemische Färbungen wurden in Vorarbeiten Gal- und GalNAc-positive, hochprismatische Zellen im FAE dargestellt, die M-Zellen entsprechen könnten [192]. Da sich derartige Zellen jedoch auch in BALT-entferntem Epithel anfärben ließen, wirft dies die Frage auf, ob es sich bei den positiven Zellen des BALT-FAE tatsächlich um M-Zellen handelt, die typischerweise nur im FAE von MALT-Gewebe zu finden sind [140, 145, 182].

Die Kolokalisation von KUL01⁺-Zellen mit Kohlenstoffpartikeln und Beads bei gleichzeitiger Negativität von FITC im BALT-Parenchym gibt einen Hinweis darauf, dass Partikel abhängig von ihrem molekularen Aufbau bzw. ihrer Größe und Form unterschiedlich aufgenommen und weiterverarbeitet werden. Während es sich bei Kohlenstoffpartikeln und Beads um gröbere Partikel handelt, ist FITC eine Chemikalie. Die Ergebnisse aus diesen Arbeiten deuten darauf hin, dass Kohlenstoffpartikel und Beads durch das FAE phagozytiert und an darunter liegende, KUL01⁺-Zellen weitergegeben werden, während FITC großflächig aufgenommen wird und sich im Epithel anreichert. Die immunhistochemische Färbung des FAE mit den Antikörpern anti-CD45, anti-Bu1, anti-CD3, KUL01 und CVI-ChNL-68.1 fällt negativ aus, was darauf schließen lässt, dass sich die Epithelzellen des FAE in ihrer Antigenstruktur von den übrigen Immunzellpopulationen unterscheiden. Die Färbung mit dem anti-Pan-Zytokeratin-Antikörper führt jedoch zu einer kräftigen, lückenlosen Positivität des gesamten respiratorischen und follikelassoziierten Epithels, sodass es sich bei diesen Zellen sicher um Epithelzellen handelt.

Das respiratorische Epithel der Sekundärbronchien geht in die Parabronchien über, die sich wiederum in **Atrien** ausbuchten. Bei den atrienüberkleidenden Zellen handelt es sich um Epithelzellen, wie immunhistochemisch mit dem anti-Pan-Zytokeratin-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Dagegen zeigen sich die Zellen negativ mit den Antikörpern KUL01, CVI-ChNL-68.1 oder anti-CD45. Diese Zellen sind somit nicht mesodermaler, sondern endodermaler Abstammung [234]. Sie sind in der Lage, Mukus zu produzieren [176, 235] und

besitzen fingerförmige Zytoplasmafortsätze, wie in dieser Arbeit durch die transmissionselektronenmikroskopische Begutachtung gezeigt werden konnte. Die Atrieneithelzellen stellen sich in der Vitalitätsfärbung mit Neutralrot als lebend dar und zeigen eine deutliche Reaktivität gegenüber allen eingegebenen unbelebten Partikeln und *E. coli*-Bakterien. Die Tusche zeigt einen innigen Kontakt zu den Epithelzellen, sie wirken dabei wie von Kohlenstoffpartikeln ausgekleidet. Bei genauer Betrachtung wird die deutliche intrazelluläre Lage der Kohlenstoffpartikel deutlich, wie auch durch die TEM-Untersuchung bestätigt werden konnte. Das Zytoplasma der Atrieneithelzellen erscheint stellenweise verbreitert, heller und enthält einzelne Kohlenstoffpartikel. Zellen mit derartiger Morphologie lassen sich insbesondere im basalen Bereich der Atrien darstellen. Dabei könnte es sich um Makrophagen handeln, die aus dem Gewebe an die Oberfläche wandern oder aber um andere Phagozyten, die Kohlenstoffpartikel aufgenommen haben und sich in diesen Bereichen angesammelt haben. Die Negativität dieser Zellen mit dem Antikörper KUL01 deutet jedoch darauf hin, dass es sich entweder um KUL01-negative Phagozyten handelt oder aber um besonders reaktive Epithelzellen an strategisch günstig gelegenen Bereichen des Atrieneithels mit hoher Phagozytoseaktivität. Die Atrieneithelien zeigen auch im Falle der Beads eine ähnliche Anhaftung an der Atrienoberfläche, wie sie auch bei der gröberen Tusche beobachtet werden kann. FITC dagegen wird durch das gesamte Atrieneithel gleichmäßig aufgenommen, während das unmittelbar subepithelial gelegene Gewebe negativ ausfällt. Die deutliche Phagozytosefähigkeit des Atrieneithels wird auch durch die Aufnahme der *E. coli*-Bakterien deutlich, die bereits nach fünf Minuten vom Zytoplasma des Atrieneithels umschlossen werden.

Die Befunde aus den Applikationsversuchen unterschiedlicher Partikel deuten darauf hin, dass das **Atrieneithel** eine wichtige Rolle bei der Antigenaufnahme in der Hühnerlunge spielt. Diese Annahme scheint umso wahrscheinlicher, da das Atrieneithel einen Großteil der Lungengesamtoberfläche ausmacht [4] und damit eine effektivere Antigenaufnahme ermöglicht als das FAE des BALT, das gemessen an der Gesamtoberfläche der Lunge nur einen sehr geringen Anteil der luftleitenden Wege auskleidet. Bereits in der Vergangenheit wurde die Phagozytosefähigkeit des Atrieneithels postuliert [4, 174, 175] und auch aktuelle Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass die Epithelien der Lunge zur

Phagozytose befähigt sind [224]. Diese Schlussfolgerungen stehen im Konsens der Ergebnisse dieser Arbeit, in der die Aufnahme von Fremdpartikeln durch das Atrieneithel sowohl licht- als auch transmissionselektronenmikroskopisch (TEM) dargestellt werden konnte. Für die Identifikation der Tusche im Gewebe und die Abgrenzung von Färbe- und Kontrastierartefakten war die Begutachtung sowohl von Negativkontrollen in Form von Gewebe ohne Tusche als auch von Positivkontrollen in Form eines eingebetteten Tuschesediments notwendig. Erst durch diese Referenzproben war es möglich, Partikel, die sich sowohl im Lumen von Luftkapillaren als auch innerhalb von Atrieneithelzellen und Makrophagen befinden, als Kohlenstoffpartikel zu identifizieren und von Kontrastierartefakten abzugrenzen. Bereits vor 30 Jahren postulierten *Heilmann und Müller* die Aufnahme von Tusche durch M-Zellen des follikelassozierten Epithels des BALT und untermauerten ihre These durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, jedoch ohne das übrige Lungengewebe näher zu betrachten und ohne genauere Beschreibung der Lokalisation der Tusche innerhalb der Zelle [170]. In einer jüngeren Forschungsarbeit zur Aufnahme von Tusche in Mollusken werden die Kohlenstoffpartikel als osmiophil und elektronendicht charakterisiert. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird dabei auf elektronendichte, lamelläre Strukturen innerhalb von Zellen verwiesen, in denen sie eine mögliche Entsprechung zu den Kohlenstoffpartikeln sehen [226]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten ebenfalls intrazelluläre, lamelläre Strukturen dargestellt werden, die als Surfactant-Komponenten in Form von Lamellenkörperchen (*lamellar bodies*) bzw. osmiophilen Einschlusskörperchen (*osmiophilic inclusion bodies*) innerhalb von Typ II-Pneumozyten der Atrien [176, 236-238] oder als *trilaminäre Substanz* an der Atrienoberfläche [191, 239] identifiziert wurden. Es können jedoch ebenso Partikel mit unregelmäßiger Oberfläche gefunden werden, die teilweise einzeln oder in Ansammlungen im Lumen bzw. innerhalb von Zellvakuolen oder aber innerhalb des Atrieneithels zu finden sind. Da diese Partikel in ihrem Erscheinungsbild der Positivkontrolle entsprechen, gleichzeitig aber nicht in den Negativproben zu finden sind, werden diese Partikel als Kohlenstoffpartikel der Tusche angesprochen.

Klika et al. postulierten, dass Antigene, die über das Atrieneithel aufgenommen wurden, an **Makrophagen** weitergegeben werden, die im Interstitium des Atrienbodens lokalisiert sind [175]. *De Geus et al.* konnten mittels Immunhistochemie CVI-ChNL-74.3⁺-Zellen entlang der parabronchialen Aus-

kleidung darstellen, ein Hinweis für die strategische Position dieser Subpopulation dendritischer Zellen für die Aufnahme von inhaliertem Fremdmaterial [221]. Diese Beobachtungen konnten in der KUL01-Färbung aus den Tusche- und Beads-Versuchen bestätigt werden. KUL01⁺-Zellen, die sich innerhalb der Atriensepten oder im subatrialen Interstitium befinden, zeigen eine Kolo-kalisation mit Kohlenstoffpartikeln und Beads, die Kohlenstoffpartikel sind zudem regelmäßig intrazellulär in Makrophagen zu finden. Im Falle der Beads ist ebenfalls eine Aufnahme durch Atrienepithelzellen sowie eine Kolo-kalisation mit KUL01⁺-Zellen darstellbar, jedoch insgesamt in geringer Menge, was mit der unterschiedlichen molekularen Beschaffenheit und der unterschiedlichen Applikationsform zusammenhängen kann. Auch die FITC-Versuche deuten darauf hin, dass das Atrienepithel eine hohe Aufnahmekapazität besitzt. Die effektive Aufnahme im Bereich der Atrien erscheint als sinnvoll, da es sich um eine strategisch günstige Position handelt, in der sich das Lumen verjüngt und Partikel effektiv vor Erreichen der sensiblen Gasaustauschenden Areale abgefangen werden können. Da sich nach unterschiedlicher Einwirkzeit keine Veränderung hinsichtlich der Verteilung von FITC ergibt, liegt nahe, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff zunächst innerhalb der Atrienepithelzellen ansammelt und in der Versuchszeit von bis zu 30 Minuten nicht, wie bei den Kohlenstoffpartikeln beobachtet, an Makrophagen oder dendritische Zellen weitergegeben wird. Die Tatsache, dass sich allerdings vereinzelt FITC⁺-Zellen im Parenchym wiederfinden, wirft die Frage auf, um welche Zellen es sich hierbei handeln könnte, zumal sie KUL01- und Bu1-negativ sind. Die Weiterentwicklung von Antikörpern zur Identifizierung von Immunzellpopulationen könnte diese Frage zukünftig beantworten.

Die Atrien verjüngen sich über die Infundibula schlussendlich in die **Luftkapillaren**. Dieses sensible, gasaustauschende Areal besitzt nur noch eine äußerst dünne Epithelauskleidung und kaum Abwehrmechanismen [5, 26, 27, 30, 177]. Trotz Eingabe großer Mengen Tusche wurden kaum freie Kohlenstoffpartikel im Lumen der Luftkapillaren gesehen. Das weist darauf hin, dass die Atrienepithelien die in großer Menge eingegebene Tusche effektiv abfangen können, ehe die Kohlenstoffpartikel die Luftkapillaren erreichen. Dass die ungebundene Tusche allein durch das Auswaschen der Proben aus den Luftkapillaren gespült wird, ist unwahrscheinlich, da sich die Luftkapillaren in den Gefrierschnitten ähnlich tuschearm bzw. leer darstellen. Auch Beads und

FITC dringen nicht bis in die Luftkapillaren vor, sondern werden zuvor durch die Atrienepthelien aufgenommen. Dieses Ergebnis unterstreicht das regionenspezifische Aufnahmeverhalten der Epithelien.

Wie inhalierte Partikel aus der Vogellunge abtransportiert werden ist weitgehend unbekannt, u. a. aufgrund der im Vergleich zum Säuger bisher nicht nachgewiesenen pulmonalen Lymphgefäße [6, 22, 31]. Der Beantwortung der Frage, wie der Partikelabtransport aus der aviären Lunge erfolgt, kann sich genähert werden, indem die einzelnen **Bindegewebsstrukturen** betrachtet werden. Nach der Aufnahme durch das Atrienepthel oder das follikelassoziierte Epithel des BALT werden Partikel wie Tusche oder Beads an freie Makrophagen im Bindegewebe weitergegeben. Dieses lässt sich in die Atriensepten innerhalb der Parabronchuswand sowie die interparabronchialen Septen und Zwickel differenzieren. Tuscheartikel können regelmäßig innerhalb von KUL01⁺-Zellen im Bereich der Atriensepten, der Parabronchialwand oder der interparabronchialen Septen gefunden werden. Durch Vitalitätsfärbung mit Neutralrot konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen vital und in der Lage sind, den Farbstoff aufzunehmen, ähnlich wie dies auch bei den Tuscheversuchen zu sehen ist. Jedoch zeigen die KUL01⁺-Zellen keine Assoziation zu FITC, sodass die Vermutung naheliegt, dass es sich hierbei, wie bereits oben erwähnt, um einen im Vergleich zur Tusche oder Beads anderen Aufnahme- und Destruktionsmechanismus handelt.

Im extrabronchialen Gewebe konnten insbesondere bei über sechs Monate alten Tieren vermehrt lymphoide Follikel und voll entwickelte GCs beobachtet werden, die entweder in der Parabronchuswand und im Bereich der Zwickel zu finden sind oder dem Primärbronchus bzw. den Sekundärbronchien außen anliegen. Im Vergleich zu den GCs des aviären BALT sind die extrabronchialen GCs wenig erforscht und eigene Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass GCs in der Lunge anders als z. B. in der Hühnermilz nicht zwangsläufig rund oder allseits von einer Bindegewebskapsel begrenzt sind [142]. Im Rahmen der Tuscheversuche können im Randbereich dieser lymphoiden Follikel Zellen dargestellt werden, die große Mengen Kohlenstoffpartikel enthalten. Das Bindegewebe einschließlich der GCs ist auch nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten jedoch FITC-negativ, was die These der unterschiedlichen Aufnahme und Verarbeitung der Partikel weiter unterstreicht. Aufgrund ihrer Bedeutung bei der Antigenaufnahme der Tusche sowie des beobachteten Vorkommens von

Fremdpartikeln innerhalb der GCs älterer Tiere, sollte die dreidimensionale Rekonstruktion ein besseres Verständnis dieser Strukturen liefern, da bisherige Kenntnisse über aviäre GCs nur auf zweidimensionaler Analyse aufbauen [141, 142]. Die dreidimensionale Rekonstruktion zeigt, dass sich pulmonale, insbesondere extrabronchiale GCs sowohl innerhalb des Lungengewebes, aber auch im Vergleich zu den als Standard geltenden, kugelrunden GCs der Milz in ihrer Form unterscheiden. Ihre dreidimensionale Struktur könnte möglicherweise den strukturellen Besonderheiten der Lunge bzw. der lokalen Lage im Lungengewebe angepasst sein.

Bei genauerer Betrachtung finden sich in nahezu allen der voll entwickelten und in Ausbildung befindlichen extrabronchialen GCs älterer Tiere, aber auch im BALT **Partikelablagerungen**. Diese kommen vor allem in der Peripherie der GCs, jedoch auch vereinzelt im GC vor und besitzen ein teilweise schwärzliches, teilweise glasiges Erscheinungsbild und eine inhomogene Größe bzw. Form. Diese Beobachtung wurde unabhängig von Fixier- und Einbettmethode oder Haltung gemacht und trat auch bei Tieren auf, denen keine Partikel appliziert wurden. Die Partikel stellen sich polarisationsoptisch doppelt-lichtbrechend dar, ein Hinweis auf Fremdmaterial [232]. In der immunhistochemischen Färbung zeigt sich lediglich mit anti-CD45 und CVI-ChNL-68.1 eine Kollokalisierung positiver Zellen mit den Partikeln. Immunfluoreszenzhistologische Färbungen zeigten jedoch bei einem Tier im Bereich des BALT eine Assoziation von KUL01⁺-Zellen mit den Partikeln. Das Erscheinungsbild mancher dieser Partikel lässt den Gedanken aufkommen, ob es sich hierbei möglicherweise um Federstaub oder andere Staubpartikel aus der Atemluft (zerfallener, eingetrockneter Kot, Einstreu- oder Futterpartikel) handeln könnte, die entweder durch Epithelzellen bzw. APCs phagozytiert und in diese Bereiche transportiert wurden, ähnlich wie es bei der Tusche beobachtet werden konnte. Durch die immunhistochemische Färbung mit einem anti-Pan-Zytokeratin-Antikörper konnten einige dieser Partikel als Keratine identifiziert werden. Keratine bilden das Zytoskelett von Epithelzellen und lassen sich in α - und β -Keratine unterteilen [240-243]. Während α -Keratine bei allen Wirbeltieren vorkommen, sind β -Keratine nur bei Reptilien und Vögeln zu finden [240]. Federn bestehen aus reinen β -Keratinen [240] und spezifische Antikörper sind nicht kommerziell erhältlich. Die Positivität einzelner Partikel innerhalb dieser Ablagerungen mit dem anti-Pan-Zytokeratin-Antikörper könnte allerdings durch eine gewisse Kreuzreaktivität mit bestimmten Epitopen

der α -Keratine bedingt sein. Für Federstaub spricht, dass GCs auch in der Lunge von keimfrei gehaltenen Tieren dargestellt werden konnten, im Darm jedoch keine GCs gefunden wurden (*unveröffentlichte Arbeiten des Instituts, mündliche Mitteilung G. Zengerling am 25.07.17*). Das Immunsystem dieser Tiere könnte möglicherweise durch die Staubpartikel (Feder-, Futter und Einstreu- bzw. Kotpartikel) stimuliert und die Bildung von GCs so induziert worden sein. Die Ablagerung dieser Partikel scheint umso plausibler, da die Federkeratine nur schwer durch proteolytische Enzyme destruiert werden können, es vielmehr spezieller chemischer Modifikationen bedarf [240]. Ein bekanntes Krankheitsbild beim Menschen, die sogenannte „Farmerlunge“ [233] führt nach Inhalation besonders staubhaltiger, häufig farm- und stallassoziierter Luft mit organischen Partikeln u. a. zur Bildung von Langhans-Riesenzellen und Granulomen um die eingeatmeten Fremdpartikel, die scheinbar reaktionslos liegen bleiben [232, 233]. Diese pathologischen Befunde zeigen Parallelen zu den beschriebenen Arealen der Hühnerlunge. Es ist anzunehmen, dass sowohl GCs des BALT als auch der Parabronchien eine wichtige Rolle bei der lokalen Antigenpräsentation spielen. Möglicherweise stellen sie auch einen Ansammlungsort für Fremdpartikel dar, ähnlich wie es im Falle der Anthrakose intrapulmonaler Lymphknoten beim Säuger nach länger anhaltender Rußbelastung zu beobachten ist oder analog zu Tuscheablagerungen in regionären Lymphknoten nach Tätowierungen [244-246]. Gleichartige Partikel sind auch in der Milz darstellbar, was darauf hinweist, dass diese Partikel aus der Lunge abtransportiert werden können.

Dieser Befund wird erstmals in dieser Arbeit beschrieben und liefert wichtige Erkenntnisse zur Antigenaufnahme in der Hühnerlunge, an die Folgeuntersuchungen anknüpfen sollten. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass inhalierte Partikel sowohl zu den GCs des Parenchyms als auch des BALT transportiert werden und auch extrabronchiale GCs eine Bedeutung bei der induktiven Seite der pulmonalen Immunantwort besitzen. Eine immunhistochemische Färbung mit Antiserum speziell gegen β -Keratine könnte weitere Aufschlüsse über die Zuordnung und Herkunft der Partikel liefern [240, 241], doch die Heterogenität der Partikel lässt vermuten, dass es sich um unterschiedliche Partikeltypen handelt, z. B. unter anderem um eingetrocknete, zerfallene Kotpartikel oder eine Mischung aus Futter- und Einstreupartikeln. Ein weiterer Weg des Abtransports könnte zellulär erfolgen, indem Partikel nach ihrer Aufnahme durch die Lungenoberflächen an Makrophagen weitergegeben werden,

die wiederum über die **interparabronchialen Septen, Zwickel oder Blutgefäße** aus der Lunge in Richtung Milz auswandern. Da die in der Lunge beschriebenen Partikelablagerungen auch vereinzelt in der Milz gefunden wurden, würde das die These des Abtransports Richtung Milz bekräftigen. In den pulmonalen Blutgefäßen konnten immer wieder sowohl einzelne Tuschepartikel als auch Beads gefunden werden. Mittels TEM konnten Makrophagen im Blut dargestellt werden, die feine körnige Partikel enthalten, die morphologisch Tuschepartikeln entsprechen, sodass ein Abtransport von phagozytiertem Fremdmaterial über das Blut naheliegt. Diese Beobachtung der Lage in den Blutgefäßen machten auch *de Geus et al.* nach intratrachealer Eingabe Lipopolysaccharid (LPS)- und *Influenza A Virus* (IAV)-gekoppelter Beads. Die Beads finden sich den Ergebnissen nach sowohl in Blutgefäßen als auch in der Milz wieder [1]. Auch die tracheale Applikation von *E. coli* führt zu einer Besiedelung der Milz [197]. *Berghof et al.* wiesen FITC- bzw. TRITC-konjugierte Latex-Beads in verschiedenen Organen nach intratrachealer Applikation nach und vermuten einen Abtransport tracheal applizierter Partikel über das Blutssystem in Richtung Milz, Nieren oder Leber [224]. Diese Ergebnisse deuten zusammen mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit darauf hin, dass sowohl immunogene (LPS-, IAV-gekoppelte Beads, *E. coli*) als auch nicht-immunogene Partikel (Tusche, ungekoppelte Beads) nach intratrachealer Applikation möglicherweise über das FAE und/oder Atrieneithel aufgenommen werden können und durch APCs über das Kreislaufsystem abtransportiert werden. Dass es sich bei den Beobachtungen aus dieser Arbeit um Artefakte handelt, kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da dieser Befund unabhängig von der Fixier- und Einbettmethode beobachtet werden kann. Die Partikel sind zudem stets in derselben Fokusebene lokalisiert und zeigen einen klaren histologischen Gewebebezug. In der immunohistochemischen KUL01-Färbung sind Zellen darstellbar, die Kohlenstoffpartikel phagozytiert haben und in der Nähe von Blutgefäßen lokalisiert sind, was die These des venösen Abtransportes aus der Lunge durch APCs unterstützt.

Den bisherigen Ergebnissen der Tusche- und Beads-Eingabe nach können efferente pulmonale Blutgefäße ein wichtiger Weg des Abtransportes von Fremdpartikeln aus der Lunge sein. Um dies mit Sicherheit sagen zu können, bedarf es jedoch weiterer Untersuchung mit längerer Einwirkdauer in Kombination mit umfassender histologischer Auswertung von Lunge, Milz und

möglicherweise Leber. Im Gegensatz zu Tusche und Beads konnte kein FITC in den Blutgefäßen nachgewiesen werden, was den Gedanken eines unterschiedlichen Abtransports von FITC im Vergleich zu Tusche und Beads weiter bekräftigt. Gezielte *in vivo*-Versuche auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit können weitere Erkenntnisse zum Weitergabe- und Abbaumechanismus liefern.

Die **interparabronchialen Septen und Zwickel** als Teil des Bindegewebes weisen sowohl in den Beads- als auch in den Tuscheversuchen Partikelansammlungen auf. In den Tuscheversuchen mit sechzigminütiger Einwirkzeit zeigt sich im Vergleich zu den Versuchen mit kürzerer Einwirkzeit eine deutlich gesteigerte Ansammlung der Kohlenstoffpartikel in diesen Bereichen. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde der Versuch mit gleicher Einwirkzeit und Behandlung an zwei weiteren Tieren desselben Alters durchgeführt. Hierbei ergab sich dasselbe histologische Bild. Das Vorliegen eines histologischen Artefakts ist unwahrscheinlich, da dieser Befund sowohl in den Paraffin- und Kunstharz- als auch Gefrierschnitten gefunden werden konnte. Um Gewebeerreißen zu verhindern und einen Druckausgleich zu schaffen, wurde die kaudale Luftsackgruppe zudem vor Applikation eröffnet. Versuche mit kürzerer Einwirkzeit zeigen darüber hinaus kaum Partikelansammlungen im Bereich der interparabronchialen Septen. Denkbar ist, dass es sich bei den interparabronchialen Septen um einen weiteren Weg des Abtransportes im Sinne von Lymphgefäßen handelt. Die Aufnahmekapazität der Septen für Tusche könnte die vergleichsweise geringere Aufnahmemenge von Partikeln über das Blut ergänzen. Nach experimenteller Hyperinfusion und Erhöhung des Extrazellulärvolumens lässt sich eine Weitung der interparabronchialen Septen feststellen, ein Befund, der auf die lymphatische Drainage durch die IPBS hinweist [247]. Insbesondere die Ergebnisse aus der Tuscheapplikation unterstützen die These eines Abtransportes, da sich die Partikel vermehrt in diesen Bereichen anreichern und ein ähnliches Bild geweiteter Septen erzeugen, wie *Weidner et al.* dies beobachteten [247].

Der Versuch, die Zellen der IPBS immunhistochemisch näher zu charakterisieren und die These des lymphatischen Abflusses durch den Nachweis von Lymphendothelzellen zu bekräftigen, gelang in dieser Arbeit nicht. Grund hierfür sind bisher fehlende, hühnerspezifische Antikörper für Lymphendothelzellen. Die Antigenstruktur dieser Zellen scheint sich von der der Blutendothelzellen zu

unterscheiden, da Lymphendothelzellen des Lymphherzes im Gegensatz zu Blutgefäßendothelien nicht durch den Antikörper 1A3a erkannt werden. Die immunhistochemische Färbung mit dem anti-Pan-Zytokeratin-Antikörper fällt im Bereich der interparabronchialen Septen negativ aus, sodass diese Zellen keine Epithelzellen sind. Folglich handelt es sich bei den Zellen der interparabronchialen Septen um Zellen mesodermaler Herkunft [234], die mithilfe der zurzeit verfügbaren Antikörper jedoch nicht näher charakterisiert werden können. Zur Klärung der Funktion der interparabronchialen Septen bedarf es noch weiterer Forschung und der Entwicklung aviärer, lymphendothelspezifischer Antikörper. Hinsichtlich des Abtransports in Richtung Septen kommt prinzipiell ein zellulärer Transport durch APCs in Betracht. Allerdings ließen sich nur sehr vereinzelt Bereiche darstellen, in denen der Weg der Kohlenstoffpartikel von den Lungenoberflächen in Richtung Septen nachvollziehbar war. Ein zellulärer Transport derart großer Mengen von Kohlenstoffpartikel, wie sie teilweise nach einer Stunde Einwirkzeit zu finden sind, ist allerdings unwahrscheinlich. Die Tatsache, dass sich FITC im Gegensatz zu Tusche und Beads nicht in den interparabronchialen Septen anreichert, weist erneut darauf hin, dass das Lungengewebe anders auf FITC reagiert als auf Tusche und Beads. Während Kohlenstoffpartikel und Beads durch subepithelial im Bereich der Atrien gelegene KUL01⁺-Zellen aufgenommen werden und in Richtung interparabronchiale Septen und Blutgefäße abtransportiert werden, deutet die epithelspezifische Aufnahme von FITC bei weitgehender Negativität des tieferen Parenchyms auf einen möglicherweise Pinozytose-basierten Aufnahmemechanismus und unterschiedlichen Transport hin. In einigen lumennahen Bereichen sind einzelne, FITC⁺-Zellen darstellbar, die immunhistochemische Färbung derselben Schnitte mit den Antikörpern anti-Bu1, anti-CD3, CVI-ChNL-74.3 sowie CVI-ChNL-68.1 zeigte jedoch keine Assoziation von FITC mit den antikörperpositiven Zellen. Lediglich mit KUL01 ließen sich bei einem Tier vereinzelte Kolokalisationen darstellen. Die kloakale Applikation von FITC führt zu einer Aufnahme durch das FAE der Bursa Fabricii [248] sowie zur Aufnahme durch B-Zellen. Die FITC⁺-B-Zellen sind mit der Zeit auch im peripheren Blut sowie der Milz nachweisbar [230]. Bei den FITC-assoziierten Zellen der Lunge handelt es sich allerdings nicht um B-Zellen, da die Färbung der FITC-assoziierten Zellen mit dem anti-Bu1-Antikörper negativ ausfällt. Denkbar ist, dass KUL01⁺-Zellen ebenfalls in der Lage sind FITC aufzunehmen und abzutransportieren. Die Kolokalisation

KUL01⁺-Zellen mit FITC ist jedoch insgesamt als gering zu bewerten. Alternativ könnte es sich um Phagozyten handeln, die mit den aktuell zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht näher charakterisierbar sind. Der Großteil des FITC wird effektiv über Epithelzellen aufgenommen und sammelt sich dort zunächst an. Vorstellbar ist auch, dass FITC mit der Zeit abtransportiert wird, die Darstellung des Weitertransports jedoch aufgrund der möglicherweise zu kurzen Versuchszeit oder im Rahmen des *post mortem*-Versuchsdesigns nicht möglich war.

Eine **antigenspezifische Immunantwort** kann nur *in vivo* untersucht werden. Daher wurde im Rahmen einer Impfung ein **NDV-Lebendimpfstoff** (AviPro[®] ND C131 der Firma Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG.) konjunktival appliziert. Da dem Institut eine Ausnahmegenehmigung von der Newcastle-Disease-Impfpflicht („*Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit*“) vorliegt, handelt es sich bei dem Versuch um naive Tiere, wodurch die Analyse einer NDV-spezifischen Immunantwort anhand einer Impfung älterer Tiere mit bereits voll entwickeltem BALT [9] möglich war.

In konventionellen, industriellen Hühnerhaltungen kommt routinemäßig die Sprayvaksinierung zum Einsatz, um große Bestände kostengünstig und schnell zu impfen. Dabei gelangt der Impfstoff auf die Schleimhäute von Augen und Nase und wird durch Inhalation in der Trachea und Lunge verteilt. Dass die tracheale oder konjunktivale Infektion mit NDV oder APEC zu einer systemischen Immunreaktion führt, konnte anhand von Infektionsmodellen gezeigt werden [194, 197, 223]. Die impfbezogene, pulmonale Immunantwort nach mukosalem Kontakt ist beim Vogel allerdings wenig erforscht. Forschungsergebnisse zeigten, dass Antigene, die in Form von NDV-gekoppelten Beads über die kopf-assoziierten lymphatischen Gewebe wie das CALT oder NALT eindringen, im oberen und unteren Respirationstrakt wiederzufinden sind. Die Bestimmung des Phänotyps an Zellen des NALT zeigte dabei, dass dendritische Zellen oder Makrophagen für die Aufnahme der immunogenen Partikel verantwortlich sind [135].

Ziel der Arbeit war es daher, die lokale Immunantwort des Respirationstraktes durch Nutzung einer praxisüblichen Vakzinierungsform (Antigenkontakt über Schleimhäute des Kopfes) zu untersuchen. Der Respirationstrakt wurde dabei differenziert betrachtet, indem die Trachea, der Primärbronchus samt BALT und das Parenchym jeweils separat mithilfe von Genexpressionsanalysen und immunhistochemischen Färbungen untersucht und miteinander verglichen

wurden. Um reproduzierbare und standardisierte Proben des Parenchyms zu gewinnen, kamen Stanzbiopsien des kaudalen Lungenparenchyms zum Einsatz, da die Begutachtung zahlreicher Lungenproben zeigte, dass sich insbesondere hier häufiger GCs befinden. Um das BALT möglichst vollständig zu gewinnen, wurde der Primärbronchus präpariert und soweit möglich von Blutgefäßen und Bindegewebe befreit. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass es zu einer erhöhten Expression von Bu1 und AID sowohl im Lungenparenchym als auch im Primärbronchus bzw. BALT kommt. Beide Komponenten spielen somit eine wichtige Rolle bei der pulmonalen Immunität. Auch die Trachea zeigt eine erhöhte Expression beider Gene, was darauf zurückzuführen sein kann, dass das Impfvirus nach Aufnahme durch das CALT in den Nasopharynx und anschließend in die Trachea gelangt, wo es vor der Verteilung in der Lunge eine relativ hohe Konzentration aufweist. Das zeigt, dass auch der trachealen Schleimhaut eine nicht unerhebliche Bedeutung bei der Immunantwort zukommt. Der lokale Antigenkontakt über die Schleimhäute des Auges führt zu einer systemischen Immunität, da auch in der Milz ein Anstieg der Genexpression zu beobachten ist. Es bleibt jedoch zu klären wo die Induktion der Immunantwort stattfindet. Denkbar ist einerseits die primäre Antigenpräsentation in der Milz mit anschließender Auswanderung der B-Zellen in den Respirationstrakt bzw. mit transzellulärem Transport von IgA an die Schleimhautoberflächen. Andererseits könnte es zusätzlich zur Antigenpräsentation in der Milz zu einer lokalen Antigenpräsentation in bestimmten Lungenbereichen wie den extrabronchialen GCs oder den BALT-GCs kommen, wie Ergebnisse mit LPS-gekoppelten Beads vermuten lassen [1]. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind nur unter Berücksichtigung der biologischen Varianz zu interpretieren und können durch einzelne Kontrolltiere, die eine NDV-unspezifische Immunreaktion sowie durch schlecht auf die Impfung ansprechende Impftiere beeinflusst sein. Die Untersuchung einer größeren Fallzahl kann im Rahmen weiterer, daran anknüpfender Studien sinnvoll sein, um die Streuung der Werte zu reduzieren. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass die Genexpression von Bu1 und AID nur eine Aussage hinsichtlich einer adaptiven Immunreaktion ermöglicht, nicht jedoch des ursächlichen Antigens. Hier sei auf bereits durchgeführte Arbeiten verwiesen, die das NDV-Virus aus verschiedenen Organen, u. a. der Lunge nach konjunktivaler Applikation isolierten [194, 222, 223]. Den Ergebnissen dieser Arbeiten nach ist daher von einem Zusammenhang des Anstiegs der B-Zell-Genexpression mit der

NDV-Impfung auszugehen. Jüngere Ergebnisse zeigen u. a. einen Anstieg der Expression von Bu1 in der Lunge nach konjunkтивaler NDV-Vakzinierung sowie eine systemische Immunität [3], jedoch ohne differenzierte Betrachtung des Respirationstraktes. In dieser Arbeit liegt der Fokus erstmals auf der lokalisationsbezogenen Untersuchung der pulmonalen Immunantwort nach NDV-Vakzinierung.

Die immunhistochemische anti-NDV Färbung mithilfe eines NDV-spezifischen Kaninchen-Antiserums ergab beim Boost-Tier im Vergleich zum Kontrolltier eine deutliche Positivität im Bereich des Atrienepithels sowie des respiratorischen und des follikelassoziierten Epithels. Die Schnittpräparate des Boost-Tieres, bei denen das NDV-Virus durch PBS ersetzt wurde, zeigten ebenfalls eine Positivität mit dem Antiserum in den beschriebenen Bereichen, wenn auch weniger stark ausgeprägt als mit vorheriger NDV-Applikation. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich noch NDV in der Lunge des Boost-Tieres befindet und durch das Antiserum erkannt wird. Die vermehrte Positivität der Schnittpräparate in den beschriebenen Bereichen nach vorheriger NDV-Applikation kann damit erklärt werden, dass das Virus an antigenspezifisches IgA im Bereich der Epithelien bindet und zu einer vermehrten Positivität mit dem Antiserum führt. Die Tatsache, dass die Schnittpräparate des Kontrolltieres in der immunhistochemischen Färbung mit dem anti-LaSota-Antiserum negativ ausfallen, untermauert die These, dass das Impftier NDV-spezifisches IgA im Bereich des Atrien- und Primärbronchusepithels trägt. Auch in der immunhistochemischen IgA-Färbung lässt sich eine im Vergleich zum Kontrolltier stärkere Positivität der Epithelien beim Impftier darstellen, was mit den Ergebnissen der immunhistochemischen anti-NDV-Färbung korreliert. Eine unspezifische Bindung des Sekundärkörpers konnte anhand von Negativkontrollen, in denen das Antiserum durch PBS ersetzt wurde, ausgeschlossen werden. Auch im Bereich des CALT färbt sich Epithel des Impftieres im Vergleich zum Kontrolltier mit dem anti-NDV-Antiserum an. Das spricht dafür, dass antigenspezifisches IgA im Bereich der Epithelien sezerniert wird, die mit dem Virus in Kontakt gekommen sind. Die immunhistochemische Bu1-Färbung zeigt in den Geweben Trachea und CALT keine wesentlichen Unterschiede. Lediglich im Bereich des BALT fanden sich beim Impftier mehr GCs. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Impfung im Vergleich zum Kontrolltier zu einer stärkeren Ausprägung des BALT geführt hat. Jedoch wurden die Schnitte bei der

Blockaufarbeitung zufällig im Bereich des BALT abgenommen, sodass es sich hier um einen Ausschnitt des BALT handelt, an anderer Stelle könnte sich ein anderes histologisches Bild ergeben und individuelle Unterschiede in der BALT-Ausprägung sind nicht auszuschließen. Um eine sichere Aussage zur Quantität der GCs treffen zu können, ist eine systematische Auswertung der GC-Zahl notwendig, wie dies beispielsweise in der Milz durchgeführt wurde [141]. Jedoch korreliert das histologisch feststellbare, vermehrte Auftreten von BALT-GCs mit den Genexpressionsdaten, die einen Anstieg der B-Zellen zeigen. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Impfung zur Induktion von GCs geführt hat. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und der immunhistochemischen Untersuchung sprechen somit für eine lokale, impfbezogene Immunantwort des Respirationstraktes. Die immunhistochemische Färbung mit dem anti-NDV-Antiserum konnte im Gegensatz zu anderen Forschungsergebnissen [222] eine histologisch darstellbare, NDV-spezifische Immunantwort in umschriebenen Bereichen des Lungengewebes darstellen. Die Ergebnisse deuten darauf, dass die Lungenoberflächen eine besondere Bedeutung bei der pulmonalen Immunabwehr besitzen. Insbesondere die Atrieneithelien zeigen ähnlich wie in den Versuchen zur Partikelaufnahme eine verstärkte Reaktion und Sekretion von IgA. Möglicherweise übernehmen die Atrieneithelzellen der Vogellunge neben einer mukosalen Abwehrfunktion u. a. die Funktion der Säuger-Alevolarmakrophagen. Die immunhistochemische IgA-Färbung stellt jedoch lediglich einen ersten Schritt in Richtung funktionelles Verständnis der pulmonalen Immunantwort dar, weitere Untersuchungen zur mukosalen Immunität, u. a. durch Gewinnung und Analyse des Mukus können weitere Erkenntnisse liefern.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass die Atrieneithelien eine bedeutende Phagozytosekapazität gegenüber unbelebten Fremdanigenen wie Kohlenstoffpartikeln aus Tusche, Beads und FITC besitzen. Dabei handelt es sich um eine nicht-rezeptorvermittelte Phagozytose (Tusche, Beads, Neutralrot) [1, 226, 249] bzw. wahrscheinlich um Pinozytose (FITC). Die Atrieneithelien scheinen daher eine wichtige Rolle bei der pulmonalen Immunabwehr zu spielen. Ergebnisse zur Phagozytose in der Hühnerlunge liegen aus Infektionsversuchen oder der Applikation immunogener Beads durch APCs vor [1, 135, 221], doch umfassende histologische Studien der Vogellunge zu diesem Thema sind noch immer rar. Obwohl die histologische Untersuchung der aviären Lunge aufgrund

der anatomischen Besonderheiten zeitaufwendig ist, kann sie zusammen mit bisherigen Forschungsergebnissen wertvolle, weiterführende Erkenntnisse zur Partikelaufnahme liefern. Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Basis für weitere Studien zum Aufnahmeverhalten der Vogellunge dienen. Insbesondere hinsichtlich der Rolle der extrabronchialen GCs bei der pulmonalen Immunantwort sowie der interparabronchialen Septen als mögliche lymphatische Drainage besteht weiterer Forschungsbedarf. Da das BALT, gemessen an der Gesamtkontaktfläche der Lunge, eine verhältnismäßig kleine Oberfläche besitzt, liegt der Gedanke nahe, dass es auch andere Epithelien mit Antigenerkennungsfunktion in der Vogellunge gibt. Diese Arbeit zeigt deutlich, dass dies durch die Atrieneithelien erfolgt. Neben den BALT-GCs scheinen die extrabronchialen GCs ähnlich den intrapulmonalen Lymphknoten des Säugers eine Bedeutung bei der Antigenpräsentation zu besitzen oder als Ablageort von inhalieren Fremdpartikeln zu dienen [245], da Partikelansammlungen in diesen Bereichen vor allem bei älteren Tieren regelmäßig gefunden werden können. Sie könnten das BALT aber auch als möglichen Ort der Antigenpräsentation ergänzen. KUL01⁺-Zellen befinden sich im Bereich der endozytotisch aktiven Atrien und sind in der Lage Partikel, die über das Epithel aufgenommen werden, zu übernehmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass sie die Partikel zu den interparabronchialen Septen und Blutgefäßen transportieren. Um diesen Weg der Partikelaufnahme weiter zu verfolgen, können Lebendversuche, bei denen die Tiere partikelhaltiger Atemluft über einen längeren Zeitraum ausgesetzt werden, dienlich sein. In Kombination mit histologischer Auswertung kann dadurch weiteres Wissen hinsichtlich des Ablageortes und einer möglichen lymphatischen Drainage entlang der interparabronchialen Septen, gewonnen werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Der Aufnahmemechanismus, Weitertransport sowie Abbau von inhalierten Partikeln in der Vogellunge sind im Vergleich zur Säugerlunge weitgehend unverstanden. Dies liegt zum einen an den anatomischen Unterschieden und zum anderen an der geringeren Verfügbarkeit spezifischer Marker, insbesondere für aviäre antigenpräsentierende Zellen. Von bestimmten Bereichen der Vogellunge, wie dem follikelassoziierten Epithel (FAE) des Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes (BALT) oder den Atrienepithelien, wird die Fähigkeit zur Phagozytose angenommen. Umfassende histologische Untersuchungen zur Partikelaufnahme, die dies belegen, sind jedoch nicht vorhanden. Diese Arbeit setzt sich anhand von unterschiedlichen histologischen Techniken umfassend mit der Partikelaufnahme in der Hühnerlunge auseinander. Die Versuche stellen eine histologische Annäherung an das Thema Partikelaufnahme in der Vogellunge dar und dienen als Grundlage für die Etablierung von geeigneten *in vivo*-Versuchsmodellen für die histologische Analyse. Aus diesem Grund – und insbesondere aus Tierschutzgründen – wurde die Applikation in Anlehnung an beschriebene Infektionsversuche kurze Zeit *post mortem* durchgeführt. Um die Heterogenität der Partikel in der Stallluft abzubilden, wurden unterschiedliche Partikel tracheal appliziert (Tusche, Latex-Beads, Fluoresceinisothiocyanat, Neutralrot, *E. coli*). Die Vitalität des Gewebes wurde anhand von Vitalitätsfärbungen bestätigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass alle eingegebenen Partikel sowie *E. coli*-Bakterien durch das Atrienepithel aufgenommen werden und belegen damit dessen postulierte Phagozytosefähigkeit. Entgegen den Forschungsergebnissen beim Säuger ist im Bereich des FAE des Hühner-BALT nur eine geringe Aufnahmekapazität für Tusche und Beads darstellbar, wohingegen FITC (Fluoresceinisothiocyanat) effektiv durch das gesamte FAE aufgenommen wird. Hinweise zum Abtransport der Partikel lassen sich aus den histologischen Befunden ableiten. Sowohl Tusche als auch Beads sind vermehrt in den interparabronchialen Septen und teilweise in der Nähe extrabronchialer germinaler Zentren (GCs) sowie den Blutgefäßen darstellbar. In den GCs älterer Tiere finden sich regelmäßig Partikelablagerungen, die teilweise positiv mit dem anti-Pan-Zytokeratin-Antikörper reagieren und Federstaub entsprechen können. Die GCs können somit einen Ablageort für inhalierte Partikel darstellen, ähnlich wie dies bei Säugerlymphknoten beschrieben ist. Aufgrund dieser Ergebnisse und

zum besseren Verständnis der pulmonalen GCs wurde eine dreidimensionale Rekonstruktion der GCs erstellt. Diese zeigte, dass sich die GCs der Lunge von den typisch kugeligen Milz-GCs unterscheiden und an die strukturellen Besonderheiten der Lunge angepasst sind. Neutralrot, Kohlenstoffpartikel aus der Tusche und Beads werden den Ergebnissen der Arbeit nach durch Makrophagen bzw. dendritische Zellen im Bereich der Atriensepten aufgenommen und somit möglicherweise zellulär zu den Blutgefäßen und interparabronchialen Septen transportiert. Die interparabronchialen Septen können eine lymphatische Drainage der Lunge darstellen, der Nachweis von Lymphendothelzellen gelang mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern allerdings nicht. Allein FITC reichert sich in den Epithelien des Primärbronchus und der Atrien an und findet sich nur vereinzelt im Bindegewebe. Die Identifizierung der FITC-assoziierten Zellen gelang mit den derzeit verfügbaren Markern jedoch nicht.

Die antigenspezifische Immunantwort wurde im Rahmen einer Impfung mit dem *Newcastle Disease Virus* durch Genexpressionsanalysen in Abhängigkeit der verschiedenen Kompartimente der Lunge (Primärbronchus, Parenchym, Trachea) und der Milz untersucht. Die konjunktivale Impfung führt sowohl zu einer systemischen als auch pulmonalen Immunantwort in Form eines Anstiegs der B-Zellen und des Enzyms AID (*activation induced cytidine deaminase*), das im Rahmen der germinalen Zentrumsreaktion exprimiert wird. Immunhistochemische Untersuchungen als Ansatz eines histologischen Verständnisses der immunologischen Vorgänge weisen hierbei sowohl auf eine Beteiligung des BALT (Anstieg der GC-Zahl) als auch auf eine schleimhautassoziierte Immunität hin (Anstieg der IgA-Sekretion).

Auf den hier etablierten Versuchsmodellen aufbauend, kann der Weg inhalierter Partikel durch *in vivo*-Studien gezielt analysiert und die Frage nach dem Abtransport aus der Lunge nach Aufnahme durch das Atrieneithel bzw. das FAE weiterverfolgt werden.

VIII. SUMMARY

In contrast to the mammalian lung comparatively little is known about the avian respiratory immune system and the mechanisms by which inhaled particles are taken up, transported and degraded. The anatomical differences compared to the mammalian lung as well as the scarcity of known immune cell markers are complicating the analysis. Some pulmonary structures like the atrial and the follicle associated epithelium (FAE) of the bronchus associated lymphoid tissue (BALT) are suspected to be capable of endocytosis. But extensive histological studies focusing on the particle uptake in the avian lung are missing to this day. Therefore this work's aim is to analyze the route of tracheally applied particles and to characterize the cells involved in particle uptake by histological and immunohistochemical methods. The experiments of this work represent a histological approach towards the understanding of particle uptake in the avian lung and help to establish a suitable experimental design for further histological studies on the chicken lung. Taking this into account and due to animal welfare reasons the experiments were performed *post mortem* on the basis of infection models of cultured lung tissue. To imitate the heterogeneity of dust particles inhaled by chickens under conventional housing conditions different types of particles were used (ink, beads, fluorescein isothiocyanate, neutral red, *E. coli*). The viability of the lung tissue was confirmed by neutral red as a viability marker.

This work's detailed histological study clearly shows the uptake of all applied particles, chemicals and the *E. coli* bacteria by the atrial epithelium, confirming its postulated phagocytic capacity. In contrast to research results concerning the mammalian BALT there is only little uptake of ink (approx. 2 μm) and latex beads (1 μm) by the FAE of the avian BALT, whereas FITC (fluorescein isothiocyanate) is taken up effectively. There is histological evidence of a possible path of particle transport after entering the lung. The carbon particles of the ink as well as the latex beads can be found in increased number inside the inter-parabronchial septa and also partly near extrabronchial germinal centers (GC) or inside the pulmonary blood vessels. GCs of older animals regularly show deposition of heterogeneous particles, which partly can be stained by the anti-pan cytokeratin antibody and therefore could represent feather keratins. This finding suggests that the GCs play a role as a place of antigen presentation and deposition similar to the mammalian pulmonary lymph nodes. Furthermore

neutral red, carbon particles and latex beads are taken up by macrophages and dendritic cells respectively localized within the atrial septa. Therefore the particle transport towards the interparabronchial septa, GCs or blood vessels could take place by cellular mechanisms. The interparabronchial septa could function as lymphatic vessels of the lung, though the existence of lymphatic endothelial cells could not be proven by currently available antibodies. FITC is found mainly inside the epithelium of the primary bronchus and the atria, while there is only little FITC within the connective tissue, but currently available antibodies failed to characterize the FITC associated cells. The antigen specific immune response was investigated by NDV-vaccination in consideration of the different bronchial and extrabronchial compartments (primary bronchus, parenchyma, trachea) and the spleen. The conjunctival vaccination leads both to a systemic and local immune response in terms of an increase of the gene expression of B cells and the enzyme AID (*activation induced cytidine deaminase*) as a marker of the germinal center reaction. Immunohistochemical analysis as a step towards understanding the pulmonary immune reaction indicates a participation of the BALT (increase of number of GCs) as well as a mucosal immunity (increase of IgA secretion).

The experimental design established in this work can be used to analyze the particle uptake in the avian lung by *in vivo* studies and thus helps to answer the question how and where particles are transported after uptake by the atrial or follicle associated epithelium.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. de Geus, E.D., C.A. Jansen, and L. Vervelde, *Uptake of Particulate Antigens in a Nonmammalian Lung: Phenotypic and Functional Characterization of Avian Respiratory Phagocytes Using Bacterial or Viral Antigens*. *Journal of Immunology*, 2012. **188**(9): p. 4516-4526.
2. Senne, D.A., D.J. King, and D.R. Kapczynski, *Control of Newcastle disease by vaccination*. *Dev Biol (Basel)*, 2004. **119**: p. 165-70.
3. Cors, J.-C., *Untersuchungen zu lokalen Immunreaktionen nach Impfung gegen das Newcastle Disease Virus mit einem rekombinanten Putenherpesvirus und einer herkömmlichen Lebendvakzine*. 2013, Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
4. Nganpiep, L.N. and J.N. Maina, *Composite cellular defence stratagem in the avian respiratory system: functional morphology of the free (surface) macrophages and specialized pulmonary epithelia*. *J Anat*, 2002. **200**(5): p. 499-516.
5. Duncker, H.R., *Structure of avian lungs*. *Respir Physiol*, 1972. **14**(1): p. 44-63.
6. Duncker, H.R., *Structure of the avian respiratory tract*. *Respir Physiol*, 1974. **22**(1-2): p. 1-19.
7. Nagy, N., I. Bodi, and I. Olah, *Avian dendritic cells: Phenotype and ontogeny in lymphoid organs*. *Dev Comp Immunol*, 2016. **58**: p. 47-59.
8. Jeurissen, S. and E. Janse, *The use of chicken-specific antibodies in veterinary research involving three other avian species*. *Veterinary quarterly*, 1998. **20**(4): p. 140-143.
9. Zengerling, G., *Struktur und Entwicklung des Immunsystems der Hühnerlunge*. 2006, lmu.
10. Fagerland, J.A. and L.H. Arp, *A morphologic study of bronchus-associated lymphoid tissue in turkeys*. *Am J Anat*, 1990. **189**(1): p. 24-34.
11. Fagerland, J.A. and L.H. Arp, *Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens*. *Avian Dis*, 1993. **37**(1): p. 10-8.
12. Bienenstock, J., N. Johnston, and D.Y. Perey, *Bronchial lymphoid tissue. II. Functional characteristics*. *Lab Invest*, 1973. **28**(6): p. 693-8.
13. de Geus, E.D., *Respiratory immune responses in the chicken; Towards development of mucosal avian influenza virus vaccines*. 2012: Wöhrman Print Service.
14. Maina, J.N., *Development, structure, and function of a novel respiratory organ, the lung-air sac system of birds: to go where no other vertebrate has gone*. *Biological Reviews*, 2006. **81**(4): p. 545-579.

15. Härtle, S. and B. Kaspers, *Chapter 14 - The Avian Respiratory Immune System*, in *Avian Immunology (Second Edition)*. 2014, Academic Press: Boston. p. 251-263.
16. Makanya, A.N. and V. Djonov, *Development and spatial organization of the air conduits in the lung of the domestic fowl, Gallus gallus variant domesticus*. *Microsc Res Tech*, 2008. **71**(9): p. 689-702.
17. King, A.S., *Structural and functional aspects of the avian lungs and air sacs*. *Int Rev Gen Exp Zool*, 1966. **2**: p. 171-267.
18. King, A.S. and J. McLelland, *Birds, their structure and function*. 1984: Bailliere Tindall, 1 St. Annes Road.
19. Nickel, R., et al., *Anatomie der Voegel*. 2004, Parey. p. 159-175.
20. Lopez, J., E. Gomez, and P. Sesma, *Anatomical study of the bronchial system and major blood vessels of the chicken lung (Gallus gallus) by means of a three-dimensional scale model*. *Anat Rec*, 1992. **234**(2): p. 240-8.
21. Maina, J.N., *Pivotal debates and controversies on the structure and function of the avian respiratory system: setting the record straight*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2016.
22. Maina, J.N., *Some recent advances on the study and understanding of the functional design of the avian lung: morphological and morphometric perspectives*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2002. **77**(1): p. 97-152.
23. Cook, R., C. Vaillant, and A. King, *The structure and innervation of the saccopleural membrane of the domestic fowl, Gallus gallus: an ultrastructural and immunohistochemical study*. *Journal of anatomy*, 1987. **150**: p. 1.
24. Magnussen, H., H. Willmer, and P. Scheid, *Gas exchange in air sacs: contribution to respiratory gas exchange in ducks*. *Respiration physiology*, 1976. **26**(1): p. 129-146.
25. Fedde, M.R., *Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility*. *Poult Sci*, 1998. **77**(8): p. 1130-8.
26. Maina, J.N., *Scanning electron microscope study of the spatial organization of the air and blood conducting components of the avian lung (Gallus gallus variant domesticus)*. *Anat Rec*, 1988. **222**(2): p. 145-53.
27. Maina, J.N., A.S. King, and G. Settle, *An allometric study of pulmonary morphometric parameters in birds, with mammalian comparisons*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1989. **326**(1231): p. 1-57.
28. Abdalla, M.A., et al., *Morphometrics of the avian lung. 1. The domestic fowl (Gallus gallus variant domesticus)*. *Respir Physiol*, 1982. **47**(3): p. 267-78.
29. West, J.B., *Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier: the unique avian solution*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. **297**(6): p. R1625-34.

30. Maina, J.N. and A.S. King, *The thickness of avian blood-gas barrier: qualitative and quantitative observations*. J Anat, 1982. **134**(Pt 3): p. 553-62.
31. Duncker, H.R., *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**(2-3): p. 111-24.
32. Mackelprang, R. and F. Goller, *Ventilation patterns of the songbird lung/air sac system during different behaviors*. J Exp Biol, 2013. **216**(Pt 19): p. 3611-9.
33. Scheid, P. and J. Piiper, *Cross-current gas exchange in avian lungs: effects of reversed parabronchial air flow in ducks*. Respiration physiology, 1972. **16**(3): p. 304-312.
34. Powell, F.L., et al., *Airflow in the avian respiratory tract: Variations of O₂ and CO₂ concentrations in the bronchi of the duck*. Respiration Physiology, 1981. **44**(2): p. 195-213.
35. Brandes, G., *Atmung der Vögel*. Vergleichenden Deutsche Gesellschaft Zoology, 1924. **28**: p. 57-9.
36. Bethe, A., *Allgemeines und Vergleichendes*, in *Atmung*. 1925, Springer. p. 1-36.
37. Dotterweich, H., *Versuche über den Weg der Atemluft in der Vogellunge*. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 1930. **11**(2): p. 271-284.
38. Dotterweich, H., *Die atmung der vögel*. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 1936. **23**(5): p. 744-770.
39. Banzett, R.B., et al., *Inspiratory aerodynamic valving in goose lungs depends on gas density and velocity*. Respiration Physiology, 1987. **70**(3): p. 287-300.
40. Banzett, R.B., et al., *Pressure profiles show features essential to aerodynamic valving in geese*. Respiration Physiology, 1991. **84**(3): p. 295-309.
41. Wang, N., et al., *An aerodynamic valve in the avian primary bronchus*. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 1992. **262**(4): p. 441-445.
42. Maina, J.N. and M. Africa, *Inspiratory aerodynamic valving in the avian lung: functional morphology of the extrapulmonary primary bronchus*. Journal of Experimental Biology, 2000. **203**(18): p. 2865-2876.
43. Harvey, E.P. and A. Ben-Tal, *Robust Unidirectional Airflow through Avian Lungs: New Insights from a Piecewise Linear Mathematical Model*. PLoS Comput Biol, 2016. **12**(2): p. e1004637.
44. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition:*

- mechanisms and pathways*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
45. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
46. Schmidt, C.Q., J.D. Lambris, and D. Ricklin, *Protection of host cells by complement regulators*. Immunol Rev, 2016. **274**(1): p. 152-171.
47. Fearon, D.T. and R.M. Locksley, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. Science, 1996. **272**(5258): p. 50-3.
48. Tang, Y., et al., *Emergence of NK-cell progenitors and functionally competent NK-cell lineage subsets in the early mouse embryo*. Blood, 2012. **120**(1): p. 63-75.
49. van Furth, R., et al., *The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells*. Bull World Health Organ, 1972. **46**(6): p. 845-52.
50. Langermans, J.A., W.L. Hazenbos, and R. van Furth, *Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes*. J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 185-94.
51. Hiraiwa, K. and S.F. van Eeden, *Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 619523.
52. Dinarello, C.A., *Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed*. J Endotoxin Res, 2004. **10**(4): p. 201-22.
53. Gomez Perdiguero, E., et al., *Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors*. Nature, 2015. **518**(7540): p. 547-51.
54. Sibille, Y. and H.Y. Reynolds, *Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury*. Am Rev Respir Dis, 1990. **141**(2): p. 471-501.
55. Green, G.M. and E.H. Kass, *THE ROLE OF THE ALVEOLAR MACROPHAGE IN THE CLEARANCE OF BACTERIA FROM THE LUNG*. J Exp Med, 1964. **119**: p. 167-76.
56. Kopf, M., C. Schneider, and S.P. Nobs, *The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells*. Nat Immunol, 2015. **16**(1): p. 36-44.
57. Werner, J.L. and C. Steele, *Innate receptors and cellular defense against pulmonary infections*. J Immunol, 2014. **193**(8): p. 3842-50.
58. Bartlett, J.A., A.J. Fischer, and P.B. McCray, Jr., *Innate immune functions of the airway epithelium*. Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 147-63.
59. Ghoneim, H.E., P.G. Thomas, and J.A. McCullers, *Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections*. J

- Immunol, 2013. **191**(3): p. 1250-9.
60. Hickman-Davis, J.M., et al., *Depletion of alveolar macrophages exacerbates respiratory mycoplasmosis in mycoplasma-resistant C57BL mice but not mycoplasma-susceptible C3H mice*. Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2278-82.
61. Broug-Holub, E., et al., *Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine Klebsiella pneumonia: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival*. Infect Immun, 1997. **65**(4): p. 1139-46.
62. Qureshi, M., et al., *Profiles of chicken macrophage effector functions*. Poultry science, 1994. **73**(7): p. 1027-1034.
63. Fellah, J.S., et al., *Chapter 3 - Development of the Avian Immune System A2 - Schat, Karel A*, in *Avian Immunology (Second Edition)*, B. Kaspers and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 45-63.
64. Jeurissen, S.H., E. Claassen, and E.M. Janse, *Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen*. Immunology, 1992. **77**(1): p. 75-80.
65. Jeurissen, S.H., et al., *The monoclonal antibody CVI-ChNL-68.1 recognizes cells of the monocyte-macrophage lineage in chickens*. Dev Comp Immunol, 1988. **12**(4): p. 855-64.
66. Kaspers, B., H.S. Lillehoj, and E.P. Lillehoj, *Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody*. Vet Immunol Immunopathol, 1993. **36**(4): p. 333-46.
67. Mast, J., et al., *Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1998. **61**(2-4): p. 343-357.
68. Tang, F., Q. Du, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity*. Sci China Life Sci, 2010. **53**(2): p. 172-82.
69. Chen, K., et al., *Tissue-resident dendritic cells and diseases involving dendritic cell malfunction*. Int Immunopharmacol, 2016. **34**: p. 1-15.
70. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells as sensors of infection*. Immunity, 2001. **14**(5): p. 495-8.
71. Aguzzi, A., J. Kranich, and N.J. Krautler, *Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease*. Trends Immunol, 2014. **35**(3): p. 105-13.
72. Steinman, R.M., *Decisions about dendritic cells: past, present, and future*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 1-22.
73. Moingeon, P. and L. Mascarell, *Differences and similarities between sublingual immunotherapy of allergy and oral tolerance*. Semin Immunol, 2017.
74. Takagi, H., et al., *Plasmacytoid dendritic cells orchestrate TLR7-mediated*

innate and adaptive immunity for the initiation of autoimmune inflammation. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24477.

75. Yanez, D.A., et al., *The role of macrophages in skin homeostasis*. Pflugers Arch, 2017. **469**(3-4): p. 455-463.

76. Thorbecke, G.J., I. Silberberg-Sinakin, and T.J. Flotte, *Langerhans Cells as Macrophages in Skin and Lymphoid Organs*. Journal of Investigative Dermatology, 1980. **75**(1): p. 32-43.

77. Hoeffel, G., et al., *Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1167-81.

78. Wood, G.S., et al., *Human dendritic cells and macrophages. In situ immunophenotypic definition of subsets that exhibit specific morphologic and microenvironmental characteristics*. Am J Pathol, 1985. **119**(1): p. 73-82.

79. Del Cacho, E., et al., *Avian follicular and interdigitating dendritic cells: isolation and morphologic, phenotypic, and functional analyses*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. **129**(1-2): p. 66-75.

80. Igyarto, B.Z., et al., *Characterization of chicken epidermal dendritic cells*. Immunology, 2006. **119**(2): p. 278-88.

81. Olah, I. and B. Glick, *Secretory cell in the medulla of the bursa of Fabricius*. Experientia, 1978. **34**(12): p. 1642-1643.

82. Olah, I. and B. Glick, *Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: light and electron microscopic and autoradiographic studies*. Poult Sci, 1979. **58**(1): p. 195-210.

83. Glick, B., *Historical perspective: The bursa of Fabricius and its influence on B-cell development, past and present*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1991. **30**(1): p. 3-12.

84. Del Cacho, E., et al., *Isolation of chicken follicular dendritic cells*. Journal of Immunological Methods, 2008. **334**(1-2): p. 59-69.

85. Igyarto, B.Z., A. Magyar, and I. Olah, *Origin of follicular dendritic cell in the chicken spleen*. Cell Tissue Res, 2007. **327**(1): p. 83-92.

86. Wu, Z., et al., *Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells*. Immunology, 2010. **129**(1): p. 133-45.

87. Janeway Jr, C., P. Travers, and M. Walport, *Immunobiology. 8th Editio*. New York: Garland Science, 2012.

88. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.

89. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. Science, 2002. **296**(5566): p. 298-300.

90. Janeway, C.A., Jr. and K. Bottomly, *Signals and signs for lymphocyte*

- responses. Cell, 1994. **76**(2): p. 275-85.
91. Snapper, C.M. and J.J. Mond, *Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching*. Immunology Today, 1993. **14**(1): p. 15-17.
92. Rajewsky, K., *Clonal selection and learning in the antibody system*. Nature, 1996. **381**(6585): p. 751-8.
93. Macpherson, A.J., et al., *IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms*. Microbes Infect, 2001. **3**(12): p. 1021-35.
94. Mostov, K.E., *Transepithelial transport of immunoglobulins*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 63-84.
95. Segal, D.M., et al., *The three-dimensional structure of a phosphorylcholine-binding mouse immunoglobulin Fab and the nature of the antigen binding site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(11): p. 4298-302.
96. Sakano, H., et al., *Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes*. Nature, 1980. **286**(5774): p. 676-83.
97. Bransteitter, R., et al., *Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4102-7.
98. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity*. Nature, 1983. **302**(5909): p. 575-81.
99. Weill, J.C. and C.A. Reynaud, *The chicken B cell compartment*. Science, 1987. **238**(4830): p. 1094-8.
100. Glick, B., T.S. Chang, and R.G. Jaap, *The bursa of Fabricius and antibody production*. Poultry Science, 1956. **35**(1): p. 224-225.
101. LYDYARD, P.M., C.E. Grossi, and M. COOPER, *I. Sequential Development of Clonal Diversity in the Bursa*. The Journal of experimental medicine, 1976. **144**: p. 79.
102. Grossi, C.E., P.M. Lydyard, and M.D. Cooper, *B-cell ontogeny in the chicken*. Ann Immunol (Paris), 1976. **127**(6): p. 931-41.
103. Houssaint, E., O. Lassila, and O. Vainio, *Bu-1 antigen expression as a marker for B cell precursors in chicken embryos*. Eur J Immunol, 1989. **19**(2): p. 239-43.
104. McCormack, W.T., L.W. Tjoelker, and C.B. Thompson, *Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 219-41.
105. Reynaud, C.-A., et al., *A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity*. Cell, 1985. **40**(2): p. 283-291.
106. Ratcliffe, M.J.H. and S. Härtle, *Chapter 4 - B Cells, the Bursa of Fabricius*

- and the Generation of Antibody Repertoires A2 - Schat, Karel A*, in *Avian Immunology (Second Edition)*, B. Kaspers and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 65-89.
107. Härtle, S., et al., *Chapter 6 - Structure and Evolution of Avian Immunoglobulins*, in *Avian Immunology (Second Edition)*. 2014, Academic Press: Boston. p. 103-120.
108. Ratcliffe, M.J., *Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development*. *Dev Comp Immunol*, 2006. **30**(1-2): p. 101-18.
109. Rudolph, M.G., R.L. Stanfield, and I.A. Wilson, *How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 419-66.
110. Sowder, J.T., et al., *A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor*. *J Exp Med*, 1988. **167**(2): p. 315-22.
111. Bucy, R., et al., *Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium*. *The Journal of Immunology*, 1988. **141**(7): p. 2200-2205.
112. Davidson, N.J. and R.L. Boyd, *Delineation of chicken thymocytes by CD3-TCR complex, CD4 and CD8 antigen expression reveals phylogenically conserved and novel thymocyte subsets*. *Int Immunol*, 1992. **4**(10): p. 1175-82.
113. Bernot, A. and C. Auffray, *Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991. **88**(6): p. 2550-2554.
114. Chen, C.H., et al., *TCR3: a third T-cell receptor in the chicken*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(7): p. 2351-5.
115. Gobel, T.W. and M. Fluri, *Identification and analysis of the chicken CD3epsilon gene*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(1): p. 194-8.
116. Smith, A.L. and T.W. Göbel, *Chapter 5 - Avian T Cells: Antigen Recognition and Lineages A2 - Schat, Karel A*, in *Avian Immunology (Second Edition)*, B. Kaspers and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 91-102.
117. Chiu, C. and P.J. Openshaw, *Antiviral B cell and T cell immunity in the lungs*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(1): p. 18-26.
118. Stanley, A.C., et al., *Characterization of Ovine Nasal-associated Lymphoid Tissue and Identification of M Cells in the Overlying Follicle-associated Epithelium*. *Journal of Comparative Pathology*, 2001. **125**(4): p. 262-270.
119. Owen, R.L. and A.L. Jones, *Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles*. *Gastroenterology*, 1974. **66**(2): p. 189-203.

120. Mantis, N.J., et al., *Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor*. The Journal of Immunology, 2002. **169**(4): p. 1844-1851.
121. Shreedhar, V.K., B.L. Kelsall, and M.R. Neutra, *Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 504-9.
122. Neutra, M.R., N.J. Mantis, and J.P. Kraehenbuhl, *Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1004-9.
123. Gutzeit, C., G. Magri, and A. Cerutti, *Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction*. Immunological reviews, 2014. **260**(1): p. 76-85.
124. Hiller, A.S., 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): p. 316-22.
125. Kracke, A., et al., *Larynx-Associated Lymphoid Tissue (LALT) in Young Children*. Anatomical Record, 1997. **248**(3): p. 413-420.
126. Casteleyn, C., P. Simoens, and W. Van den Broeck, *Larynx-associated lymphoid tissue (LALT) in young cattle*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2008. **124**(3): p. 394-397.
127. Knop, N. and E. Knop, *Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT)–the physiological protective MALT of the conjunctiva*. Acta Ophthalmologica, 2008. **86**(s243): p. 0-0.
128. van de Pavert, S.A. and R.E. Mebius, *New insights into the development of lymphoid tissues*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 664-74.
129. Tschernig, T. and R. Pabst, *Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases*. Pathobiology, 2000. **68**(1): p. 1-8.
130. Brandtzaeg, P. and R. Pabst, *Let's go mucosal: communication on slippery ground*. Trends Immunol, 2004. **25**(11): p. 570-7.
131. Falkenau, A., *Histologische und immunhistochemische Untersuchungen tertiärer lymphatischer Gewebe in der Lunge des Schweines*. 2015, lmu.
132. King, A.S. and J. McLelland, *Outlines of avian anatomy*. 1975, London: Bailliere Tindall. 154 pp.
133. Fix, A.S. and L.H. Arp, *Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in normal and Bordetella avium-infected turkeys*. Vet Pathol, 1989. **26**(3): p. 222-30.
134. Bang, B.G. and F. Bang, *Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chickens*. The American journal of pathology, 1968. **53**(5): p. 735.
135. de Geus, E.D., et al., *Distribution patterns of mucosally applied particles*

and characterization of the antigen presenting cells. *Avian Pathol*, 2015. **44**(3): p. 222-9.

136. Hegde, S.N., et al., *Influence of gut microflora on the lymphoid tissue of the chicken (Gallus domesticus) and japanese quail (coturnix coturnix japonica)*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1982. **72**(1): p. 205-209.

137. Oláh, I., N. Nagy, and L. Vervelde, *Chapter 2 - Structure of the Avian Lymphoid System A2 - Schat, Karel A*, in *Avian Immunology (Second Edition)*, B. Kaspers and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 11-44.

138. Bockman, D.E. and M.D. Cooper, *Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study*. *Am J Anat*, 1973. **136**(4): p. 455-77.

139. Burns, R.B., *Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (Gallus domesticus)*. *Res Vet Sci*, 1982. **32**(3): p. 359-67.

140. Jeurissen, S.H., F. Wagenaar, and E.M. Janse, *Further characterization of M cells in gut-associated lymphoid tissues of the chicken*. *Poult Sci*, 1999. **78**(7): p. 965-72.

141. Hainke, S., *Charakterisierung der germinalen Zentrumsreaktion beim Huhn und deren Beeinflussung durch das Zytokin chBAFF*. 2011, lmu.

142. Yasuda, M., et al., *A comparative study of germinal center: fowls and mammals*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1998. **21**(3): p. 179-89.

143. Cozine, C.L., K.L. Wolniak, and T.J. Waldschmidt, *The primary germinal center response in mice*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(3): p. 298-302.

144. Jeurissen, S.H.M., et al., *Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens*. *Cell and Tissue Research*, 1989. **258**(1): p. 119-124.

145. Befus, A.D., et al., *Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches*. *J Immunol*, 1980. **125**(6): p. 2626-32.

146. Fix, A.S. and L.H. Arp, *Quantification of Particle Uptake by Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue (CALT) in Chickens*. *Avian Diseases*, 1991. **35**(1): p. 174-179.

147. Olah, I., A. Kupper, and Z. Kittner, *The lymphoid substance of the chicken's harderian gland is organized in two histologically distinct compartments*. *Microsc Res Tech*, 1996. **34**(2): p. 166-76.

148. Glick, B., *The immune response in the chicken: lymphoid development of the bursa of Fabricius and thymus and an immune response role for the gland of Harder*. *Poult Sci*, 1978. **57**(5): p. 1441-4.

149. van Ginkel, F.W., et al., *Infectious bronchitis virus in the chicken Harderian gland and lachrymal fluid: viral load, infectivity, immune cell responses, and effects of viral immunodeficiency*. *Avian Dis*, 2008. **52**(4): p. 608-

17.

150. Dohms, J.E., K.P. Lee, and J.K. Rosenberger, *Plasma cell changes in the gland of Harder following infectious bursal disease virus infection of the chicken*. Avian Dis, 1981. **25**(3): p. 683-95.

151. Ohshima, K. and K. Hiramatsu, *Distribution of T-cell subsets and immunoglobulin-containing cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of chickens*. Histo Histopathol, 2000. **15**(3): p. 713-20.

152. Kuper, C.F., et al., *The role of nasopharyngeal lymphoid tissue*. Immunol Today, 1992. **13**(6): p. 219-24.

153. Kang, H., et al., *Characterization of nasal cavity-associated lymphoid tissue in ducks*. Anat Rec (Hoboken), 2014. **297**(5): p. 916-24.

154. Klein, E.E., *The Anatomy of the Lymphatic System: I*. 1873: Smith, Elder & Company.

155. Miller, W.S., *The lung*. The American Journal of the Medical Sciences, 1937. **193**(4): p. 564.

156. Macklin, C.C., *Pulmonary sumps, dust accumulations, alveolar fluid and lymph vessels*. Cells Tissues Organs, 1955. **23**(1): p. 1-33.

157. Bienenstock, J., N. Johnston, and D.Y. Perey, *Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics*. Lab Invest, 1973. **28**(6): p. 686-92.

158. Myers, R.K. and L.H. Arp, *Pulmonary clearance and lesions of lung and air sac in passively immunized and unimmunized turkeys following exposure to aerosolized Escherichia coli*. Avian Dis, 1987. **31**(3): p. 622-8.

159. Fagerland, J.A. and L.H. Arp, *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): p. 28-36.

160. Jeurissen, S., L. Vervelde, and M. Janse, *Structure and function of lymphoid tissues of the chicken*. Poultry science reviews, 1993. **5**(3): p. 183-207.

161. Giddens, W.E., Jr., C.K. Whitehair, and G.R. Carter, *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): p. 115-29.

162. Crabbe, P.A., et al., *Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice*. Lab Invest, 1970. **22**(5): p. 448-57.

163. Gregson, R.L., M.J. Davey, and D.E. Prentice, *Postnatal development of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the rat, Rattus norvegicus*. Lab Anim, 1979. **13**(3): p. 231-8.

164. Hiller, A.S., et al., *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): p. 159-62.

165. Van Alstine, W.G. and L.H. Arp, *Histologic evaluation of lung and bronchus-associated lymphoid tissue in young turkeys infected with Bordetella avium*. Am J Vet Res, 1988. **49**(6): p. 835-9.
166. Reese, S., G. Dalamani, and B. Kaspers, *The avian lung-associated immune system: a review*. Vet Res, 2006. **37**(3): p. 311-24.
167. Hayter, R.B. and E.L. Besch, *Airborne-particle deposition in the respiratory tract of chickens*. Poult Sci, 1974. **53**(4): p. 1507-11.
168. Corbanie, E.A., et al., *Deposition of differently sized airborne microspheres in the respiratory tract of chickens*. Avian Pathol, 2006. **35**(6): p. 475-85.
169. Tell, L.A., et al., *An aerosolized fluorescent microsphere technique for evaluating particle deposition in the avian respiratory tract*. Avian Dis, 2006. **50**(2): p. 238-44.
170. Heilmann, P. and G. Muller, [*Uptake of intratracheally administered india ink particles by bronchus-associated lymphatic tissues in the calf and piglet*]. Arch Exp Veterinarmed, 1987. **41**(2): p. 242-8.
171. Gilberti, R.M., G.N. Joshi, and D.A. Knecht, *The phagocytosis of crystalline silica particles by macrophages*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(5): p. 619-27.
172. Fulton, R.M., W.M. Reed, and D.B. DeNicola, *Light microscopic and ultrastructural characterization of cells recovered by respiratory-tract lavage of 2- and 6-week-old chickens*. Avian Dis, 1990. **34**(1): p. 87-98.
173. Toth, T.E. and P.B. Siegel, *Cellular defense of the avian respiratory tract: paucity of free-residing macrophages in the normal chicken*. Avian Dis, 1986. **30**(1): p. 67-75.
174. Stearns, R.C., et al., *Deposition and phagocytosis of inhaled particles in the gas exchange region of the duck, Anas platyrhynchos*. Respir Physiol, 1987. **67**(1): p. 23-36.
175. Klika, E., et al., *Pulmonary macrophages in birds (barn owl, Tyto tyto alba), domestic fowl (Gallus gallus f. domestica), quail (Coturnix coturnix), and pigeons (Columba livia)*. Anat Rec, 1996. **246**(1): p. 87-97.
176. Lorz, C. and J. Lopez, *Incidence of air pollution in the pulmonary surfactant system of the pigeon (Columba livia)*. The Anatomical Record, 1997. **249**(2): p. 206-212.
177. Maina, J.N. and H.M. Cowley, *Ultrastructural characterization of the pulmonary cellular defences in the lung of a bird, the rock dove, Columba livia*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 1998. **265**(1405): p. 1567-1572.
178. Scheuermann, D.W., et al., *An electron microscopic study of the parabronchial epithelium in the mature lung of four bird species*. Anat Rec, 1997.

249(2): p. 213-25.

179. Ficken, M.D., J.F. Edwards, and J.C. Lay, *Induction, collection, and partial characterization of induced respiratory macrophages of the turkey*. Avian Dis, 1986. **30**(4): p. 766-71.

180. Toth, T.E., P. Siegel, and H. Veit, *Cellular defense of the avian respiratory system. Influx of phagocytes: elicitation versus activation*. Avian Dis, 1987. **31**(4): p. 861-7.

181. Im Hof, V., M. Klauser, and P. Gehr, *Phagocytic properties and organelle motility of pulmonary macrophages from smokers and nonsmokers estimated in vitro by magnetometric means*. Eur Respir J, 1990. **3**(2): p. 157-62.

182. Bienenstock, J. and D. Befus, *Gut- and bronchus-associated lymphoid tissue*. Am J Anat, 1984. **170**(3): p. 437-45.

183. van der Brugge-Gamelkoorn, G., M. van de Ende, and T. Sminia, *Uptake of antigens and inert particles by bronchus associated lymphoid tissue (BALT) epithelium in the rat*. Cell Biol Int Rep, 1985. **9**(6): p. 524.

184. van der Brugge-Gamelkoorn, G., M. van de Ende, and T. Sminia, *Changes occurring in the epithelium covering the bronchus-associated lymphoid tissue of rats after intratracheal challenge with horseradish peroxidase*. Cell and Tissue Research, 1986. **245**(2): p. 439-444.

185. Fix, A.S. and L.H. Arp, *Particle uptake by conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in turkeys*. Avian Dis, 1991. **35**(1): p. 100-6.

186. Schaffner, T., et al., *The bursa of Fabricius: a central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content*. Cell Immunol, 1974. **13**(2): p. 304-12.

187. Jeurissen, S.H., D. van Roozelaar, and E.M. Janse, *Absorption of carbon from the yolk into gut-associated lymphoid tissues of chickens*. Dev Comp Immunol, 1991. **15**(4): p. 437-42.

188. Fagerland, J.A., R.K. Myers, and L.H. Arp, *Uptake of ferritin and Bordetella avium in bronchus-associated lymphoid tissue of turkeys*. Vet Immunol Immunopathol, 1994. **40**(4): p. 367-77.

189. Halle, S., et al., *Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells*. J Exp Med, 2009. **206**(12): p. 2593-601.

190. King, A.S. and A.F. Cowie, *The functional anatomy of the bronchial muscle of the bird*. J Anat, 1969. **105**(Pt 2): p. 323-36.

191. Jones, A.W. and C.J. Radnor, *The development of the chick tertiary bronchus. II. The origin of the surface lining system*. Journal of Anatomy, 1972. **113**(Pt 3): p. 325-340.

192. Hinterseher, C., *Lektin histochemische Untersuchungen an der Lunge des Haushuhnes unter besonderer Berücksichtigung BALT-assoziiierter Strukturen*.

2005, Imu.

193. Winter, C., G. Herrler, and U. Neumann, *Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent*. *Microbes Infect*, 2008. **10**(4): p. 367-73.

194. Gohm, D.S., B. Thür, and M. Hofmann, *Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR*. *Avian Pathology*, 2000. **29**(2): p. 143-152.

195. van Eck, J.H., *Protection of broilers against Newcastle disease by hyperimmunisation of the dams*. *Vet Q*, 1990. **12**(3): p. 139-45.

196. Cheville, N.F. and L.H. Arp, *Comparative pathologic findings of Escherichia coli infection in birds*. *J Am Vet Med Assoc*, 1978. **173**(5 Pt 2): p. 584-7.

197. Horn, F., et al., *Infections with avian pathogenic and fecal Escherichia coli strains display similar lung histopathology and macrophage apoptosis*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41031.

198. Chen, H., et al., *Reliability and accuracy of three imaging software packages used for 3D analysis of the upper airway on cone beam computed tomography images*. *Dentomaxillofac Radiol*, 2017. **46**(6): p. 20170043.

199. Wang, R.H., et al., *[3-Dimensional model reconstruction of penis and surrounding tissue]*. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 2012. **28**(4): p. 274-7.

200. Mendel, T., et al., *CT-based 3-D visualisation of secure bone corridors and optimal trajectories for sacroiliac screws*. *Injury*, 2013. **44**(7): p. 957-63.

201. Bottcher, P., et al., *The visible animal project: a three-dimensional, digital database for high quality three-dimensional reconstructions*. *Vet Radiol Ultrasound*, 1999. **40**(6): p. 611-6.

202. Project, T.G.H. *The Glass Horse*. 2001 [26.09.17 26.09.17]; Available from: <http://sciencein3d.com/> zuletzt besucht am 26.09.2017.

203. Abd El Rahman, S., et al., *Differential sensitivity of well-differentiated avian respiratory epithelial cells to infection by different strains of infectious bronchitis virus*. *J Virol*, 2010. **84**(17): p. 8949-52.

204. Oresland, V. and R.W. Horobin, *Tracking living decapod larvae: mass staining of eggs with neutral red prior to hatching*. *Biotech Histochem*, 2012. **87**(3): p. 229-34.

205. Repetto, G., A. del Peso, and J.L. Zurita, *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. *Nat. Protocols*, 2008. **3**(7): p. 1125-1131.

206. Pierce, K.S. and D.C. Morfitt, *Simple, reliable detection of latex microspheres in high quality tissue sections*. *Stain Technol*, 1989. **64**(5): p. 249-51.

207. Pinto, A.J.W., et al., *Glycol methacrylate embedding for the histochemical*

- study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with Leishmania infantum*. European Journal of Histochemistry, 2015. **59**(4): p. 289-297.
208. Collins, J.E., et al., *Enhanced Immunohistochemical Resolution of Claudin Proteins in Glycolmethacrylate-Embedded Tissue Biopsies*, in *Claudins: Methods and Protocols*, K. Turksen, Editor. 2011, Humana Press Inc, 999 Riverview Dr, Ste 208, Totowa, Nj 07512-1165 USA. p. 371-382.
209. Britten, K.M., P.H. Howarth, and W.R. Roche, *IMMUNOHISTOCHEMISTRY ON RESIN SECTIONS - A COMPARISON OF RESIN EMBEDDING TECHNIQUES FOR SMALL MUCOSAL BIOPSIES*. Biotechnic & Histochemistry, 1993. **68**(5): p. 271-280.
210. Luchtel, D.L., et al., *Histological methods to determine blood flow distribution with fluorescent microspheres*. Biotech Histochem, 1998. **73**(6): p. 291-309.
211. Tregaskes, C.A., et al., *Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure*. Immunogenetics, 1996. **44**(3): p. 212-217.
212. Rothwell, C.J., L. Vervelde, and T.F. Davison, *Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1996. **55**(1): p. 225-234.
213. Viertlboeck, B.C. and T.W. Göbel, *Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007. **119**(1): p. 137-141.
214. Jeurissen, S.H.M., et al., *Monoclonal antibodies as probes for defining cellular subsets in the bone marrow, thymus, bursa of Fabricius, and spleen of the chicken*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1988. **19**(3): p. 225-238.
215. Erhard, M.H., et al., *Development of Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Antibody Assay Systems for the Detection of Chicken Immunoglobulins G, M, and A Using Monoclonal Antibodies I*. Poultry Science, 1992. **71**(2): p. 302-310.
216. Baker, S.A., K.A. Baker, and T. Hagg, *Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone*. European Journal of Neuroscience, 2004. **20**(2): p. 575-579.
217. Tseng, S.C., et al., *Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies*. Cell, 1982. **30**(2): p. 361-372.
218. Lettmann, S., *Einfluss der intestinalen Mikroflora auf die Entwicklung des mukosalen Immunsystems des Hühnerdarms*. 2015, lmu.
219. Bischof, B. and K. Budras, *The topography of the lymph heart in the domestic chicken (Gallus domesticus)*. Lymphology, 1993. **26**(4): p. 177-185.
220. Becker, C., et al., *RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik*.

- BIOspektrum, 2009. **15**(5): p. 512-515.
221. de Geus, E.D. and L. Vervelde, *Regulation of macrophage and dendritic cell function by pathogens and through immunomodulation in the avian mucosa*. Dev Comp Immunol, 2013. **41**(3): p. 341-51.
222. Wakamatsu, N., et al., *Detection of Newcastle disease virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and comparison with immunohistochemistry and in situ hybridization*. J Vet Diagn Invest, 2007. **19**(4): p. 396-400.
223. Smietanka, K., Z. Minta, and K. Domanska-Blicharz, *Detection of Newcastle disease virus in infected chicken embryos and chicken tissues by RT-PCR*. BULLETIN-VETERINARY INSTITUTE IN PULAWY, 2006. **50**(1): p. 3.
224. Berghof, T.V., et al., *Localization and (semi-)quantification of fluorescent beads of 2 sizes in chickens over time after simultaneous intratracheal and cloacal administration*. Poult Sci, 2013. **92**(5): p. 1186-94.
225. Kosemehmetoglu, K., G. Guner, and D. Ates, *Indian ink vs tissue marking dye: a quantitative comparison of two widely used macroscopical staining tool*. Virchows Arch, 2010. **457**(1): p. 21-5.
226. Carvalho, Y.B., et al., *India ink induces apoptosis in the yellow clam Mesodesma mactroides (Deshayes, 1854). Optical and ultrastructural study*. An Acad Bras Cienc, 2015. **87**(4): p. 1981-9.
227. Kobzik, L., *Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors*. J Immunol, 1995. **155**(1): p. 367-76.
228. Sulahian, T.H., et al., *Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry*. Respir Res, 2008. **9**: p. 59.
229. Champion, J.A., A. Walker, and S. Mitragotri, *Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres*. Pharm Res, 2008. **25**(8): p. 1815-21.
230. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 955-8.
231. Schaefer, A.E., et al., *Strong suppression by monocytes of T cell mitogenesis in chicken peripheral blood leukocytes*. J Immunol, 1985. **135**(3): p. 1652-60.
232. Reyes, C.N., et al., *The Pulmonary Pathology of Farmer's Lung Disease*. Chest, 1982. **81**(2): p. 142-146.
233. Dickie, H.A. and J. Rankin, *Farmer's lung: an acute granulomatous interstitial pneumonitis occurring in agricultural workers*. Journal of the American Medical Association, 1958. **167**(9): p. 1069-1076.
234. Ingber, D.E., *Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development*. International Journal of Developmental Biology,

2003. **50**(2-3): p. 255-266.
235. Tyler, W.S. and A.G. Pearse, *Functional and analytical histochemistry of the chicken lung lobule with particular reference to surfactant*. Poult Sci, 1966. **45**(3): p. 501-11.
236. Akester, A.R., *Osmiophilic inclusion bodies as the source of laminated membrane in the epithelial lining of avian tertiary bronchi*. J Anat, 1970. **107**(Pt 1): p. 189-90.
237. Jones, A.W. and C.J. Radnor, *The development of the chick tertiary bronchus. I. General development and the mode of production of the osmiophilic inclusion body*. Journal of Anatomy, 1972. **113**(Pt 3): p. 303-324.
238. Weaver, T.E., C.-L. Na, and M. Stahlman, *Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2002. **13**(4): p. 263-270.
239. Pattle, R.E., *Lung Surfactant and Lung Lining in Birds*, in *Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic: Satellite Symposium of the 27th International Congress of Physiological Sciences, Paris 1977, held at the Max-Planck-Institute for Experimental Medicine, Göttingen (FRG), July 28–30, 1977*, J. Piiper, Editor. 1978, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 23-32.
240. Schweitzer, M.H., et al., *Beta-keratin specific immunological reactivity in feather-like structures of the cretaceous alvarezsaurid, Shuvuuia deserti*. J Exp Zool, 1999. **285**(2): p. 146-57.
241. Knapp, L.W., et al., *Biochemical identification and immunological localization of two non-keratin polypeptides associated with the terminal differentiation of avian scale epidermis*. Cell Tissue Res, 1991. **265**(3): p. 535-45.
242. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. Cell, 1982. **31**(1): p. 11-24.
243. O'Guin, W.M. and R.H. Sawyer, *Avian scale development: VIII. Relationships between morphogenetic and biosynthetic differentiation*. Developmental Biology, 1982. **89**(2): p. 485-492.
244. Cabalag, M.S., M. Christie, and J.A. Miller, *Pigmented lymphadenopathy secondary to tattoo ink: A potential masquerader*. Surgery, 2015. **157**(5): p. 959-60.
245. Jungraithmayr, W., B. Delaloye-Frischknecht, and W. Weder, *Anthracotic intrapulmonary lymph nodes mimicking lung metastases*. Ann Thorac Surg, 2014. **98**(2): p. 704-6.
246. Hochegger, B., et al., *Intrapulmonary lymph node: a common and underrecognized tomography finding*. J Bras Pneumol, 2013. **39**(6): p. 757-8.
247. Weidner, W.J. and J.R. Kinnison, *Effect of extracellular fluid volume expansion on the interparabronchial septum of the avian lung*. J Comp Pathol, 2002. **127**(2-3): p. 219-22.

248. Houssaint, E. and M.M. Hallet, *The follicle-associated epithelium in the bursa of Fabricius cell origin studied by means of quail-chick chimeras and monoclonal antibodies*. J Leukoc Biol, 1986. **40**(4): p. 469-77.
249. Resch, K. and D. Gemsa, *The Role of Macrophages in the Activation of T-Lymphocytes by Concanavalin A I. Macrophages Support Proliferation after Commitment of Lymphocytes*. Immunobiology, 1980. **156**(4): p. 509-522.

X. ANHANG

A. Herstellerverzeichnis verwendeter Materialien, Reagenzien und Chemikalien

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

- 1 Servoprax GmbH, Wesel
- 2 Thermo Fisher Scientific, Dreieich
- 3 Applichem GmbH, Darmstadt
- 4 Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe
- 5 Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
- 6 Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
- 7 Winsor & Newton, London, England
- 8 Pelikan AG, Berlin
- 9 Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
- 10 Simport Scientific, Beloein, Kanada
- 11 CLN GmbH, Langenbach
- 12 VWR International GmbH, Darmstadt
- 13 Heraeus Kulzer, Hanau
- 14 Waldeck-Chroma, GmbH & Co. KG, Münster
- 15 Polysciences Inc., Warrington, USA
- 16 Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, England
- 17 Vector Laboratories, Peterborough, England
- 18 Dianova Vertriebsgesellschaft mbH, Hamburg
- 19 Neolab Migge GmbH, Heidelberg
- 20 Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- 21 GE Healthcare GmbH, München
- 22 Invitrogen GmbH, Darmstadt
- 23 Plano GmbH, Wetzlar
- 24 Honeywell Riedel-de Haehn, Seelze
- 25 Kai Medical Inc., Honolulu; USA
- 26 peqlab Biotechnologie, VWR International GmbH, Darmstadt
- 27 Promega GmbH, Mannheim
- 28 Applied Biosystems, Santa Clara, USA

29 MWG-Biotech GmbH, Ebersberg

30 Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn

B. Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Altes Rotationsmikrotom	-	Ehemals Leitz, Wetzlar
Analysewaage	Mettler PJ400/AE 100	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
Färbegerät für Immunhistochemie	Autostainer Link 48	
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Fluoreszenz-Mikroskop	DM5000 B Kamera: DFC 3000 G	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
Fraktionssammler	Model 2110 Fraction Collector	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Handzentrifuge	Rotilabo [®] -Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe
Homogenisator	Precellys24	VWR, Darmstadt, ehemals peqlab, Erlangen
Horizontalschüttler	KS 125 basic	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Kryotom	CryoStar NX70	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Lichtmikroskop	Axiolab	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
	Olympus BX51 Kamera: Olympus X10 Olympus BX50	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Magnetrührer	IKAMAG [®] RCT	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Niedrigdruck-Chromatographie-System	BioLogic LP	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Objektträger-Strecktisch	OTS40	Medite GmbH, Burgdorf
Paraffin-Einbettssystem	TES 99	
Paraffin-Streckbad	-	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
PCR-Workstation	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	peqlab Biotechnologie, VWR International GmbH, Darmstadt
pH-Meter	Sartorius PB-11 mit Glaselektrode PY-P10	Sartorius AG, Göttingen

qPCR System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich,
Rotationsmikrotom	Microm HM 340 E	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Sicherheitswerkbank	-	Arge Labor- und Objekteinrichtungen GmbH, Wathlingen
Spektrophotometer	NanoDrop® ND-100	peqlab Biotechnologie, VWR International GmbH, Darmstadt
Spin-Gewebeeinbett-automat	Microm STP 120	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Thermocycler	T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer	eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Transmissions-elektronenmikroskop	EM 902	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
	Kamera: 2K-CCD	TRS, Morrenweis
Ultramikrotom	Ultracut E	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
Ultraschallbad	-	Buehler LTD, Illinois, USA
Voretex-Mixer	Vortex Mixer neoLab 7-2020	Neolab Migge GmbH, Heidelberg
	IKA® MS2 Vortexer	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wärmeschrank	-	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
	Sigma 4H15C	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

C. Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Sven Reese und Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, um dieses zu bearbeiten. Ihr Ideenreichtum sowie ihre fachliche und stets freundliche Unterstützung waren eine große Hilfe beim wissenschaftlichen Arbeiten.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. vet. Grammatia Zengerling für ihre stetige Hilfsbereitschaft sowie wertvolle fachliche und persönliche Unterstützung. Deine ehrliche und konstruktive Kritik war stets sehr hilfreich.

Vielen Dank auch an Frau Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle für ihre Unterstützung in fachlichen Fragen und ihre stets ehrliche Meinung.

Ich danke Marina Kohn und Dr. med. vet. Nina Burkhardt für ihre Hilfsbereitschaft. Vielen lieben Dank auch an Frau Dr. Christine Winter, an Beatrice Schaerer sowie an Franziska und Larissa, die mir halfen mich in neue Themen einzuarbeiten.

Für die Unterstützung in technisch-histologischen Fragen danke ich Frau Silvia Mitterer, die durch ihren enormen Erfahrungsschatz für fast jedes technische Problem eine Lösung parat hatte. Ein herzlicher Dank geht auch an Frau Annette Wernet für die Verarbeitung der TEM-Proben.

Vielen Dank auch an Fritz Meggendorfer und Andreas Schöffmann für die Betreuung der Tiere und die stets freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Dr. med. Dr. phil. Clemens Becker sowie Dr. med. Kai Wagner für ihre Unterstützung in fachlichen Fragen sowie Christina Boick und Sabine Steidle für ihre technische Hilfe.

Vielen lieben Dank auch an Simone und Jörg sowie an Alex, der nicht müde wurde, mir Mut zu machen.

Meinen Eltern danke ich für ihre liebevolle Unterstützung, auf die ich stets zählen kann.

Ich danke der FAZIT-Stiftung für ihre finanzielle Unterstützung, die mir die fokussierte Arbeit an diesem Thema ermöglichte.