

» Molekularer Mechanismus der Signaltransduktion im Rahmen der CD95- und CD69-Rezeptor-induzierten Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten^{1,2}

Einfluss auf die GM-CSF-vermittelte Viabilität und Beziehung zur intrazellulären bcl-2-Expression

Zusammenfassung: Die Infiltration der Atemwege durch eosinophile Granulozyten ist ein Charakteristikum des Asthma bronchiale. Eosinophile exprimieren apoptoseauslösende Rezeptoren (z. B. CD95R und CD69R), die die Viabilität bzw. die Überlebenszeit und damit das Ausmaß der Gewebeeinfiltration regulieren. Die durch die Aktivierung dieser Rezeptoren induzierten molekularen Prozesse sind jedoch nur unzureichend bekannt. Gereinigte humane Bluteosinophile (MACS, Reinheit > 99%) wurden mit GM-CSF vorinkubiert und nach 18 h mit α -CD69mAb (Klon TP1/55), α -CD95mAb (Klon CH-11) bzw. als Kontrolle α -CD11bmAb (Klon Bear-1) stimuliert. Die Spezifität der Rezeptorligation wurde mittels blockierender mAb (Klon ZB4) bestimmt. Phänotyp, Viabilität, Apoptose und bcl-2-Expression wurden durchflusszytometrisch analysiert. α -CD95mAb (1 μ g/ml) induzierte eine Apoptose sowohl ruhender als auch mit GM-CSF (10 ng/ml) vorbehandelter Eosinophiler. In gleicher Weise führte nach 114 h α -CD69mAb (10 μ g/ml) zur Apoptose GM-CSF-stimulierter CD69⁺-Zellen, die sich nicht durch einen CD95-Apoptose blockierenden mAb inhibieren ließ. Naive Eosinophile zeigten eine basale bcl-2-Expression, die nach 66 h auf 30% des Ausgangswertes abnahm. In Gegenwart von GM-CSF blieb die intrazelluläre bcl-2-Konzentration auf dem gleichen Niveau. Nach Stimulation mit α -CD69mAb oder α -CD95mAb verringerte sich die bcl-2-Expression dosisabhängig, während α -CD11bmAb (10 μ g/ml) keinen Effekt zeigte. Sowohl die CD95R- als auch die CD69R-vermittelte Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten erfolgt über einen bcl-2-abhängigen Signaltransduktionsmechanismus.

Molecular Signal Transduction Mechanism of CD95- und CD69-Receptor-Induced Apoptosis in Human Eosinophils. Effect on GM-CSF-mediated Viability and the Relationship to Intracellular bcl-2 Expression: Infiltration of eosinophils into the airways plays a central role in the pathophysiology of asthma. Human blood eosinophils express apoptosis-inducing receptors (e. g. CD95R and CD69R) regulating both viability and survival and, thus, the extent of eosinophil infiltration into the airways. Signal transduction processes induced by occupation of the CD69 receptor expressed by eosinophils are insufficiently known. Purified human peripheral blood eosinophils (MACS, purity > 99%) were pre-incubated with a GM-CSF for 18 h and

M. Förster, R. K. Braun, C. Kroegel

Pneumologie & Allergologie, Medizinische Klinik IV, Friedrich-Schiller-Universität, Jena

stimulated with α -CD69mAb (clon TP1/55), α -CD95mAb (clon CH-11), and as a control α -CD11bmAb (clon Bear-1). The specificity of receptor ligation was assessed using a blocking mAb (Klon ZB4). Phenotype, viability, apoptosis and bcl-2-expression were measured employing flow cytometry. α -CD95mAb (1 μ g/ml) induced apoptosis both in control and GM-CSF (10 ng/ml) treated eosinophils. Similarly, α -CD69mAb (10 μ g/ml) induced apoptosis of GM-CSF-stimulated CD69⁺ cells after an incubation period of 114 h which was not affected by a CD95 blocking mAb. Naive eosinophils showed a basale, bcl-2-expression, which decreased to 30% after 66 h. In the presence of GM-CSF, intracellular bcl-2-concentration remained unchanged. Following stimulation with α -CD69mAb or α -CD95mAb, a dose-dependent decline of the bcl-2-expression was detected, whereas α -CD11bmAb (10 μ g/ml) had no effect. The data suggest that both CD95R- and CD69R-induced apoptosis of human eosinophils involves a bcl-2-dependent signal transduction mechanism.

Einleitung

Die Apoptose (programmierter oder physiologischer Zelltod) dient der Elimination atypischer, ungewollter oder alternder Zellen ohne Störung der Homöostase und besitzt eine physiologische Bedeutung für die normale Embryogenese, die Erneuerung von Geweben oder Immunzellen sowie die Terminierung immunologischer Reaktionen. Störungen des physiologischen Zelltodes werden mit der Pathogenese bestimmter Krankheiten in Zusammenhang gebracht, zu denen neben einigen Karzinom- und Autoimmunerkrankungen auch allergische Erkrankungen, wie z. B. das Asthma bronchiale, zählen.

Der eosinophile Granulozyt spielt als Effektorzelle am distalen Ende der allergischen Immunreaktion eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathogenese des Asthma bronchiale [1, 2, 3]. Die Akkumulation eosinophiler Granulozyten in den Atemwegen asthmatischer Patienten beruht einerseits auf einer

¹ Die Arbeit wurde unterstützt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (01ZZ9602; VKF, Project 2.9) sowie von Forschungs-

² Herrn Prof. Dr. med. Heinrich Matthys zum 65. Geburtstag gewidmet

verstärkten Migration unter Einfluss verschiedener Mediatoren und andererseits auf der Erhöhung der Viabilität durch die Hemmung apoptotischer Mechanismen [4]. An der Regulation der Apoptose sind neben bestimmten Zytokinen (IL-10, TNF- α , u.a.) auch Agonisten beteiligt, die an definierte Rezeptoren auf der Oberfläche der Zelle binden. Das bekannteste Beispiel für einen solchen Agonisten bildet der CD95-Ligand (CD95L), der an den CD95-Rezeptor (CD95R) bindet. Die Ligation von CD95R auf eosinophilen Granulozyten durch monoklonale α -CD95-Antikörper (α -CD95mAb) induziert

eine Apoptose eosinophiler Granulozyten *in vitro* (Simon) und hemmt die Gewebeeinfiltration der Zellen nach Antigenstimulation in OVA-sensibilisierten Mäusen [5].

Ein anderer apoptosevermittelnder Rezeptor auf Eosinophilen ist der CD69-Rezeptor (CD69R). CD69R wird *in vivo* nur auf eosinophilen Granulozyten aus der bronchoalveolären Lavage von Asthmatikern exprimiert [6]. *In vitro* lässt sich die CD69-Expression auf naiven Bluteosinophilen durch Stimulation mit Ionomycin, Phorbol ester, IL-3, IL-5 oder GM-CSF induzieren [7]. Das Engagement von CD69R induziert eine Abnahme der Viabilität eosinophiler Granulozyten [7], während die Überlebenszeit von neutrophilen Granulozyten nicht beeinflusst wird [8]. Die zelltypspezifische Funktion des CD69R und seine auf aktivierte Zellen begrenzte Expression bietet perspektivisch die Möglichkeit einer selektiven Apoptose-Induktion zur Behandlung eosinophilenassoziierter Krankheiten. Die Signaltransduktionsprozesse des CD69R und die Beziehung zur Funktion des CD95R sind allerdings nicht bekannt.

Methoden

Isolation, Stimulation und Inkubation der eosinophilen Granulozyten

Eosinophile aus dem Vollblut wurden mittels Percoll-Dichtegradienten, hypotoner Lyse und negativer Selektion über die magnetische Separation mittels α -CD16mAb-Beads (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) isoliert (Reinheit $\geq 99\%$). Zur Induktion der CD69- bzw. CD95-Expression wurden die Zellen mit GM-CSF (CellConcept, Umkirch) bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Als Kulturmedium diente RPMI 1640/10% FCS. Die Ligation der Oberflächenantigene erfolgte 18 h nach Inkubationsbeginn entweder durch Addition eines α -CD69mAb (Klon Tp1/55) oder eines α -CD95mAb (Klon CH-11). Als Kontrolle diente ein α -CD11b-Antikörper (Klon Bear-1) (alle Maus- α -Human von Coulter-Immunotech, Hamburg).

Bestimmung des Phänotyps und der Zellviabilität

Die Analyse des Phänotyps sowie die Viabilitäts- bzw. Apoptosebestimmung erfolgen durchflusszytometrisch. Die Zellen wurden in PBS/2% FCS gewaschen und mit gesättigten Konzentrationen PE-konjugierter α -CD69mAb (Klon FN50), α -CD95mAb (Klon DX2) (beide Pharmingen, Hamburg) oder mit dem FITC-konjugierten α -CD11bmAb (Klon Bear-1, Coulter-Immunotech, Hamburg,) für 30 min bei 4°C inkubiert, in eiskaltem PBS/2% FCS gewaschen und mit Propidium-Iodid-Lösung (PI, 0,5 μ g/ml in PBS) gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines „Fluorescence-activated Cell Sorter“ (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Heidelberg), wie beschrieben [6]. Die gezählten Ereignisse wurden auf PI-negative viable Zellen bezogen und als Einparameter-Histogramme dargestellt. Die maximale Fluoreszenz jedes einzelnen Histogramms wurde zusätzlich als linearer Wert registriert.

Intrazelluläre Proteinbestimmung

Für die Durchflusszytometrie wurden die Eosinophilen nach Stimulation gewaschen und in 0,4% p-Benzochinon für 10 min fixiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 6 mg/ml n-octyl- β -D-Glukopyranosid für 6 min permeabilisiert und

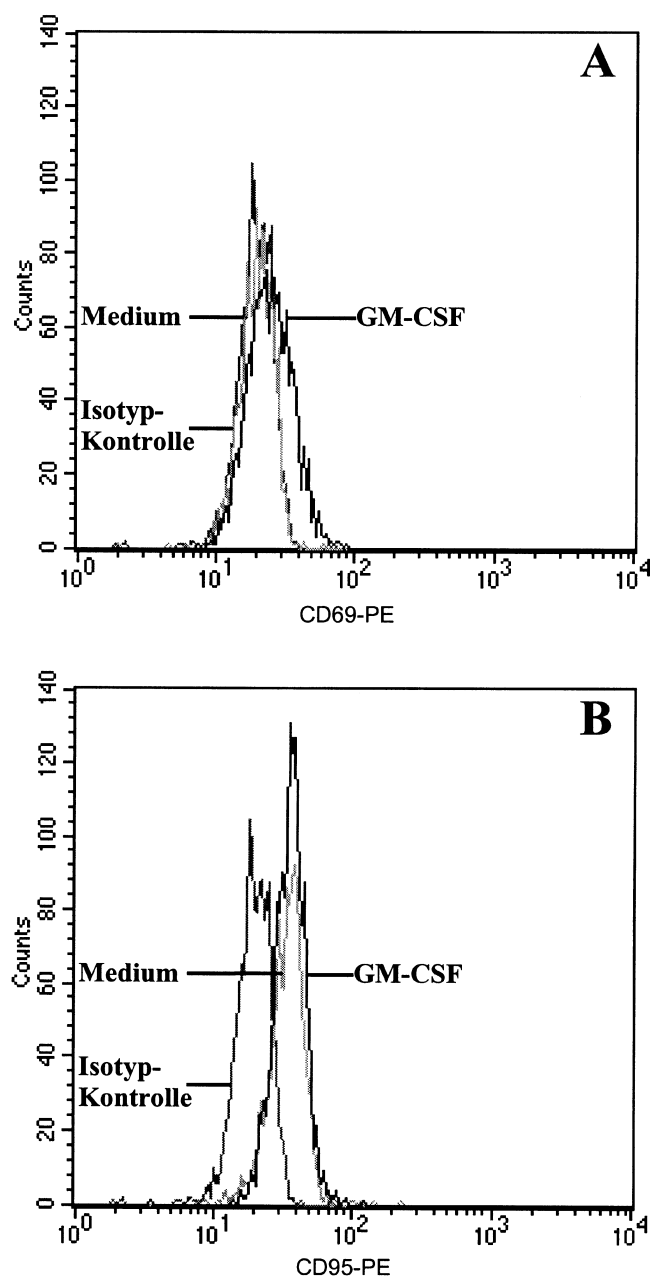


Abb. 1 Effekt von GM-CSF auf die CD95- bzw. CD69-Expression eosinophiler Granulozyten. Die Zellen wurden nur mit Medium oder mit GM-CSF (10 ng/ml) inkubiert. Die CD69- bzw. CD95-Expression wurde nach 66 h durchflusszytometrisch gemessen. Die Daten sind als Histogramm-Plot-Overlays mit der Fluoreszenzverteilung der Zellen eines von 5 Experimenten dargestellt (Isotyp-Kontrolle: mittelgraue Linie, Medium: hellgraue Linie, GM-CSF: schwarze Linie).

nach erneutem Waschen mit einem α -bcl-2-mAb (Klon 124, FITC-markiert, DAKO, Hamburg) bei Raumtemperatur über 15 min inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Ergebnisse

CD69R- und CD95R-Expression auf humanen eosinophilen Granulozyten

Naive eosinophile Granulozyten exprimierten keinen CD69R, auch nach Kultur in Medium über 66 h (Daten nicht gezeigt). Dagegen kam es in Gegenwart von GM-CSF zur Induktion des CD69R, dessen Expressionsdichte über einen Zeitraum von 66 h anstieg. Im Gegensatz dazu zeigten bereits naive, neu isolierte Eosinophile eine basale CD95R-Expression mit einer SMF von $11,6 \pm 3,2$, deren Niveau sich während der Kultur mit oder ohne GM-CSF nicht signifikant änderte (Abb. 1).

Modulation der Viabilität eosinophiler Granulozyten

Die Gegenwart von GM-CSF erhöht die Viabilität eosinophiler Granulozyten am Tag 2 von $7,2 \pm 1,2\%$ auf $55,3 \pm 8,8\%$ (7fach) und am Tag 4 von $1,03 \pm 0,3\%$ auf $40,7 \pm 1,1\%$ (39fach) verglichen mit der Medium-Kontrolle. Die Ligation sowohl des CD69R als auch des CD95R mittels rezeptorspezifischer mAb reduzierte die Viabilität der Zellen am Tag 4 um 6,9% bzw. 28,7%.

bcl-2-Protein-Expression in humanen peripheren Blut-Eosinophilen

Unstimulierte eosinophile Granulozyten zeigten eine basale bcl-2-Expression von $28,91 \pm 12,73$ SMF, die nach 18 h spontan auf $57,67 \pm 14,63$ anstieg, um nach 66 h unter den Ausgangswert auf $21,57 \pm 4,92$ abzufallen (Abb. 2). In Gegenwart von GM-CSF zeigte sich über einen Zeitraum von 18 h kein Effekt. Anschließend stieg die intrazelluläre bcl-2-Expression jedoch an und betrug nach 66 h für GM-CSF $54,02 \pm 23,76$ (Abb. 2A). In Gegenwart von α -CD11b mAb zeigte sich keine von der Medium-Kontrolle abweichende Änderung der bcl-2-Expression. Die Addition von α -CD69- und α -CD95 mAb reduzierte den Gehalt des intrazellulären bcl-2-Proteins stimulierter Zellen signifikant (GM-CSF + α -CD69-mAb: $38,53 \pm 20,73$; GM-CSF + α -CD95-mAb: $35,33 \pm 17,40$) (Abb. 2).

Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung des molekularen Mechanismus der agonistvermittelten Apoptose bei eosinophilen Granulozyten am Beispiel des CD69 und des CD95. Die oben vorgestellten Ergebnisse unterstreichen vorausgehende Untersuchungen [7,8,9,10] und zeigen, dass der CD69R ebenso wie der CD95R eine Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten induziert und somit funktionell an der Regulation der Viabilität dieses Zelltyps beteiligt ist. Die dargestellten Ergebnisse demonstrieren darüber hinaus erstmals, dass diese Funktion des CD69R an eine Reduktion der intrazellulären bcl-2-Expression gekoppelt ist. Diese Modulation des bcl-2-Proteins ließ sich ebenfalls nach Ligation des CD95R erkennen, nicht dagegen bei dem Kontrollantikörper α -CD11b.

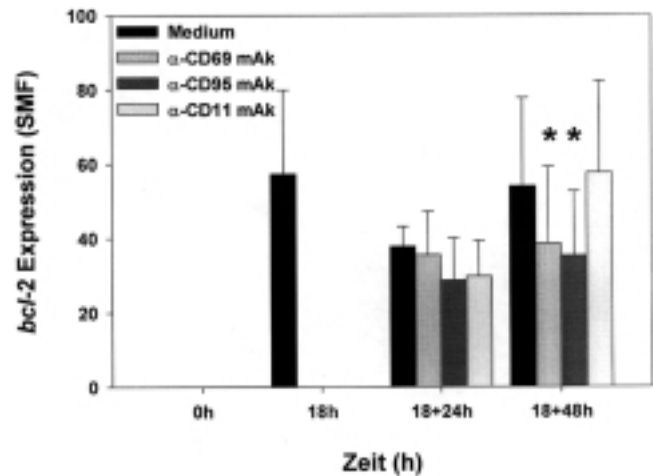


Abb. 2 Effekt von α -CD95 bzw. α -CD69 auf die bcl-2-Expression eosinophiler Granulozyten. Mit Medium bzw. GM-CSF (B) (10 ng/ml) stimulierte Zellen wurden nach 18 h zusätzlich mit Antikörpern gegen CD69 (10 μ g/ml), CD95 (1 μ g/ml) bzw. CD11b (10 μ g/ml) inkubiert. Die bcl-2-Expression wurde nach 0 h, 18 h, 42 h und 66 h durchflusszytometrisch gemessen. Die Werte repräsentieren die „Spezifische Mittlere Fluoreszenz“ (SMF) des spezifischen Antikörpers nach Subtraktion der SMF des unspezifischen Kontrollantikörpers \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle ohne Antikörper.

CD69 ist ein Typ-II-integrales Membranglykoprotein aus der C-Typ-Lektinfamilie [11], das von einer Vielzahl hämatopoetischer Zellen exprimiert wird [12]. Es besteht aus zwei 27 kD bzw. 33 kD großen Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [13]. Die Regulation der Expression und die Funktion des CD69-Oberflächenantigens ist abhängig vom jeweiligen Zelltyp. So führt die Kreuzvernetzung des CD69R auf B-Zellen zu einer Proliferationsverstärkung [14]. Im Gegensatz hierzu stehen die Beobachtungen an LPS-vorstimulierten Monozyten, bei denen der α -CD69-Antikörper eine Apoptose induziert [15]. Die hier dargestellten Untersuchungen zeigen, dass der auf Eosinophilen exprimierte CD69R funktionell bei der Regulation der Viabilität beteiligt ist. Diese Vielfalt der Funktionen des CD69 ist möglicherweise auf die intrazelluläre Domäne zurückzuführen, die allein zu kurz ist, um eine Fortleitung des Signals zu bewirken. Daher kann eine Assoziation mit je nach Zelltyp unterschiedlichen Proteinen zu einer zelltypspezifischen Reaktion führen.

Die Viabilität bzw. Apoptose einer Zelle wird u.a. durch die bcl-2-Proteinfamilie reguliert, die sich funktionell in zwei Gruppen einteilen lässt [16]. Zur ersten Gruppe gehören die sog. pro-apoptotischen Proteine, wie bad, bax, bik und bcl-x_s. Die gesteigerte Expression dieser Faktoren begünstigt eine Apoptose. Diesen Proteinen stehen sog. anti-apoptotische Moleküle gegenüber. Hierzu gehört neben dem bcl-x_l auch das bcl-2-Protein. Eine hohe intrazelluläre Expression dieser Faktoren verhindert einen vorzeitigen Zelltod und verlängert somit die zelluläre Überlebenszeit. Die Ligation sowohl des CD95R als auch des CD69R geht mit einer Abnahme der intrazellulären bcl-2-Expression einher und verschiebt auf diese Weise das Gleichgewicht der die Apoptose regulierenden Signalmoleküle zugunsten der pro-apoptotischen Faktoren.

Über diese Moleküle hinaus sind an der Regulation der Apoptose Cystein-Proteasen (Caspasen) [17] und bestimmte Transkriptionsfaktoren (c-fos, c-myc und p53) [18] beteiligt. Die Interaktion zwischen den genannten Faktoren bei Induktion und Ablauf der Apoptose in jeder Zelle ist unterschiedlich umgesetzt und deshalb für bestimmte Zelltypen, Zellzyklen sowie Apoptose-Induktoren spezifisch. Für den Eosinophilen zeigen die vorgestellten Ergebnisse, dass trotz unterschiedlicher Rezeptoren, CD95 und CD69 den bcl-2-Pool in vergleichbarem Ausmaß beeinflussen. Warum das CD95-induzierte Signal, verglichen mit dem des CD69, trotzdem zu einer deutlicheren Apoptose führt, könnte an der Aktivierung anderer Signalmoleküle liegen.

Die Beeinflussung der Apoptose durch Verabreichung spezifischer Apoptose-Induktoren bietet perspektivisch die Möglichkeit einer Behandlung eosinophilenassoziierter Krankheiten. Apoptoseauslösende Membranrezeptoren sind im Gegensatz zu den intrazellulären Faktoren durch extern zu verabreichende Medikamente leichter zugänglich. Die Gabe von α -CD95-mAb reduziert zwar die Anzahl der Eosinophilen in OVA-sensibilisierten Mäusen [5], führt aber konzentrationsabhängig zu einer Lungenfibrose [19]. Dieser Effekt geht auf den Umstand zurück, dass CD95 von nahezu allen Zelltypen exprimiert wird und die Apoptose verschiedener Zellen die immunologische Homöostase stört. Für den therapeutischen Einsatz ist es deshalb erforderlich, spezifische Apoptoseauslösende Rezeptoren zu identifizieren, die exklusiv einzelne oder nur wenige Zelltypen adressieren.

Die Unterbrechung der Atemwegsinfektion durch eosinophile Granulozyten stellt ein zentrales therapeutisches Prinzip beim Asthma bronchiale und anderen Eosinophilenassozierten Erkrankungen dar. Neben der Gabe von Kortikosteroiden oder Zytokin-Rezeptorantagonisten verspricht auch eine gezielte Induktion der Apoptose, die pathogenetische Rolle der Eosinophilen zu hemmen. Da CD69 nur auf aktivierten Eosinophilen exprimiert wird, bietet dieses Oberflächenantigen die besten Voraussetzungen für die Umsetzung eines solchen Therapieansatzes. Die therapeutische Umsetzung dieses Ansatzes bedarf jedoch eines über den gegenwärtigen Wissensstand hinausgehenden detaillierten Verständnisses der CD69-abhängigen zellulären und funktionellen Konsequenzen sowie einer Prüfung der klinischen Relevanz.

Literatur

- 1 Backman KS, Greenberger PA, Patterson R. Airways obstruction in patients with long-term asthma consistent with "irreversible asthma". *Chest* 1997; 112: 1234–1240
- 2 Warner JA, Julius P, Luttmann W, Kroegel C. Matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid following antigen challenge. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 318–320
- 3 Kroegel C, Virchow Jr JC, Luttmann W, Walker C, Warner JA. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur Respir J* 1994; 7: 519–543
- 4 Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997; 158: 3902–3908
- 5 Tsuyuki S, Bertrand C, Erard F, Trifilieff A, Tsuyuki J, Wesp M, Anderson GP, Coyle AJ. Activation of the Fas receptor on lung

- eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *J Clin Invest* 1995; 96: 2924–2931
- 6 Kroegel C, Julius P, Matthys H, Virchow Jr JC, Luttmann W. Endobronchial secretion of interleukin-13 following local allergen challenge in atopic asthma: relationship to interleukin-4 and eosinophil counts. *Eur Respir J* 1996; 9: 899–904
 - 7 Luttmann W, Knoechel B, Foerster M, Matthys H, Virchow Jr JC, Kroegel C. Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability. *J Immunol* 1996; 157: 1678–1683
 - 8 Walsh GM, Williamson ML, Symon FA, Willars GB, Wardlaw AJ. Ligation of CD69 induces apoptosis and cell death in human eosinophils cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1996; 87: 2815–2821
 - 9 Luttmann W, Opfer A, Dauer E, Foerster M, Matthys H, Eibel H, Schulze-Osthoff K, Kroegel C, Virchow JC. Differential regulation of CD95 (Fas/APO-1) expression in human blood eosinophils. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2057–2065
 - 10 Foerster M, Knoechel B, Julius P, Luttmann W, Kroegel C. Transkription, Expression und Engagement des CD69-Antigens. Identifikation eines neuen Apoptose-transduzierenden Oberflächenantigens. *Med Klinik* 1997; 107: 107
 - 11 Lopez Cabrera M, Santis AG, Fernandez Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez Mateos P, Sanchez Madrid F. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med* 1993; 178: 537–547
 - 12 Ziegler SF, Levin SD, Johnson L, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Baker E, Sutherland GR, Feldhaus AL, Ramsdell F. The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. *J Immunol* 1994; 152: 1228–1236
 - 13 Sanchez Mateos P, Sanchez Madrid F. Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2317–2325
 - 14 Risso A, Cosulich ME, Rubartelli A, Mazza MR, Bargellesi A. MLR3 molecule is an activation antigen shared by human B, T-lymphocytes and T-cell precursors. *Eur J Immunol* 1989; 19: 323–328
 - 15 Ramirez R, Carracedo J, Zamzami N, Castedo M, Kroemer G. Pertussis toxin inhibits activation-induced cell death of human thymocytes, pre-B leukemia cells and monocytes. *J Exp Med* 1994; 180: 1147–1152
 - 16 Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322–1326
 - 17 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312–1316
 - 18 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305–1308
 - 19 Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, Kaneko Y, Hara N. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 272–278

Dr. M. Förster

Pneumologie und Allergologie
Medizinische Klinik IV
Friedrich-Schiller-Universität
Erlanger Allee 101
07740 Jena

E-mail: martin.foerster@med.uni-jena.de