

Das Membranverhalten der interepithelialen Lymphocyten des Darms

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung an Ruthenium-Rot gefärbtem Gewebe

Jan-Olaf Gebbers und Herwart F. Otto*

Pathologisches Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. G. Seifert)

Eingegangen am 28. Juni 1973

Membrane Behaviour of Interepithelial Lymphocytes of the Intestinum

Electron-Microscope Observations on Ruthenium Red-Stained Tissues

Summary. The membrane behaviour of interepithelial lymphocytes and epithelium cells of the digestive tract was investigated by electron microscopy with the aid of ruthenium red staining. Biopsy specimens of nonspecific proctitis, ulcerative colitis, Crohn's disease, Whipple's disease, chronic lymphadenosis with gastrointestinal involvement and various intestinal polyps and carcinomae were examined. The ruthenium red dye was prepared largely according to the method described by Luft (1971a). Ruthenium red stains the peri-lymphocytic areas in two different forms: First: the apical peri-lymphocytic area is usually characterized by homogeneous ruthenium red staining. The lateral boundaries of the epithelial cells above the lymphocytes are strikingly folded. Second: ruthenium red is deposited in the basal peri-lymphocytic area, predominantly in coarse granules. Epithelium-associated lymphocytes apparently cause local modifications to the character of the interstitium of the lamina epithelialis mucosae. The different affinity of the cell membranes of the lymphocytes for ruthenium red may indicate so-called "distortion alterations" of the cell membranes.

In Fortsetzung früherer Untersuchungen zur Morphologie und funktionellen Bedeutung epithel-assozierter (interepithelialer) Lymphocyten des Gastrointestinaltraktes (Otto, 1972a, b; Otto u. Walke, 1972) wird im folgenden über das lymphoepitheliale Membranverhalten mittels der Ruthenium-Rotmarkierung (RR) berichtet. Die immunologische Bedeutung der epithel-assoziierten Lymphocyten des Digestionstraktes gilt weitgehend als gesichert (Good, 1964; Fichtelius, 1967; Toner u. Ferguson, 1971; Collan, 1972; Nossal, 1972). Für den Ablauf immunologischer Reaktionen sind celluläre Interaktionen von entscheidender Bedeutung. Sie gehen vermutlich mit spezifischen Veränderungen der Zellmembran einher (Smithies, 1968; Fischer u. Mitarb., 1969).

RR ist ein Metallkomplex folgender Strukturformel: $[(\text{NH}_3)_5\text{—Ru—O—Ru—}(\text{NH}_3)_4\text{—O—Ru—}(\text{NH}_3)_5]^{6+}$ (Fletcher, 1961). Es präzipitiert als 6-wertiges Kation eine Vielzahl von Polyanionen. In tierischem Gewebe färbt RR vor allem extracelluläres Material, das wahrscheinlich aus sauren Mucopolysacchariden besteht. Ferner markiert RR saure Proteinpolysaccharide, aliphatische Polymere, saure Polypeptide und Lipide sowohl des Zellinneren als auch der Plasmamembranen (Cossel u. Mitarb., 1969; Luft, 1971a, b).

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

In der vorliegenden Studie wird mittels der RR-Markierung versucht, das Membranverhalten epithel-assozierter Lymphocyten des Intestinaltraktes bei verschiedenen Krankheitsbildern elektronenmikroskopisch darzustellen.

Material und Methode

Krankengut. Untersucht wurden Biopsiepräparate von Patienten mit unspezifischer Proctitis, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Morbus Whipple, chronischer Lymphadenose mit generalisierter gastrointestinaler Beteiligung, Adenocarcinomen des Rectum und Sigma sowie villösen und adenomatösen Rectumpolyphen.

Methode. Die Präparation des RR erfolgte nach der von Luft (1971a) angegebenen Methode.

Aufbereitung des RR. Verwandt wurde handelsübliches RR (Chroma, Bestell-Nr.: 31005). 100 mg dieser Substanz wurden mit einigen Tropfen destilliertem Wasser in einem Mörser zerrieben und mit 10 ml destilliertem Wasser in ein Zentrifugenröhren gespült. Diese Suspension wurde in einem Wasserbad 5 min unter ständigem Schütteln auf 60°C erwärmt, anschließend bei 1600 G 10 min zentrifugiert. Der Überstand ist die RR-Stammlösung mit einer Konzentration von weniger als 1% RR. Sie wurde bei 4°C aufbewahrt.

Färbung mit RR. Die Gewebspräparate wurden unmittelbar nach der Entnahme in maximal 1 mm³ große Blöcke zerlegt und in folgende Lösung überführt:

3,6% Glutaraldehyd	0,5 ml
0,2 M Cacodylatpuffer, pH 7,3	0,5 ml
RR-Stammlösung	0,5 ml

Bei Zimmertemperatur, zum Teil auch bei 4°C wurde 1 Std fixiert. Die Gewebsblöcke wurden anschließend 10 min in mehrfach gewechseltem 0,15 M Cacodylatpuffer gespült. Bei Zimmertemperatur und im Dunkeln wurde 3 Std in folgender Lösung nachfixiert:

5% OsO ₄	0,5 ml
0,2 M Cacodylatpuffer, pH 7,3	0,5 ml
RR-Stammlösung	0,5 ml

Anschließend wurden die Präparate kurz in Cacodylatpuffer gespült, üblicherweise in der aufsteigenden Äthanolreihe entwässert und in Epon 812 eingebettet. Teils doppelkontrastierte, teils nur Uranylkontrastierte Schnitte (Ultramikrotom Om U 2, Reichert) wurden mit dem Zeiss EM 9 A mikroskopiert.

Die benutzten Lösungen hatten eine Osmolarität von 260—270 mOsmol. Die RR-Konzentration in den Fixierlösungen betrug weniger als 0,33 g-%¹. Die Lösungen wurden jeweils neu angesetzt, da vor allem die RR-Lösung mit OsO₄ instabil sein soll.

Ergebnisse

Die epithel-assoziierten Lymphocyten liegen überwiegend im basalen Teil des interepithelialen Raumes der Lamina epithelialis mucosae (s. auch: Meader u. Landers, 1967; Otto, 1972a, b; Otto u. Walke, 1972). Bezüglich quantitativer Unterschiede zwischen den untersuchten Krankheitsbildern wird auf frühere Untersuchungen verwiesen (Otto, 1972b; Otto u. Walke, 1972).

Die Gewebe des verschiedenen Biopsiepräparate zeigen unter gleichen methodischen Voraussetzungen eine in sich unterschiedliche Affinität zu RR. Eindeutige Hinweise dafür, daß der unterschiedliche RR-Nachweis im Gewebe eine Folge methodischer Verfahren ist, ergaben sich nicht. Dort, wo RR nachweisbar ist,

¹ Die von anderen Autoren angegebenen Fixierlösungen enthalten RR in Konzentrationen von 0,05 g-% (Luft, 1971a, b), 0,083 g-% (Bondareff, 1967), 0,1 g-% (Anderson, 1968), 0,111 g-% (Fuchs, 1971), 0,2 g-% (Cossel u. Mitarb., 1971) und 0,2—0,3 g-% (Fasske u. Stein, 1965).

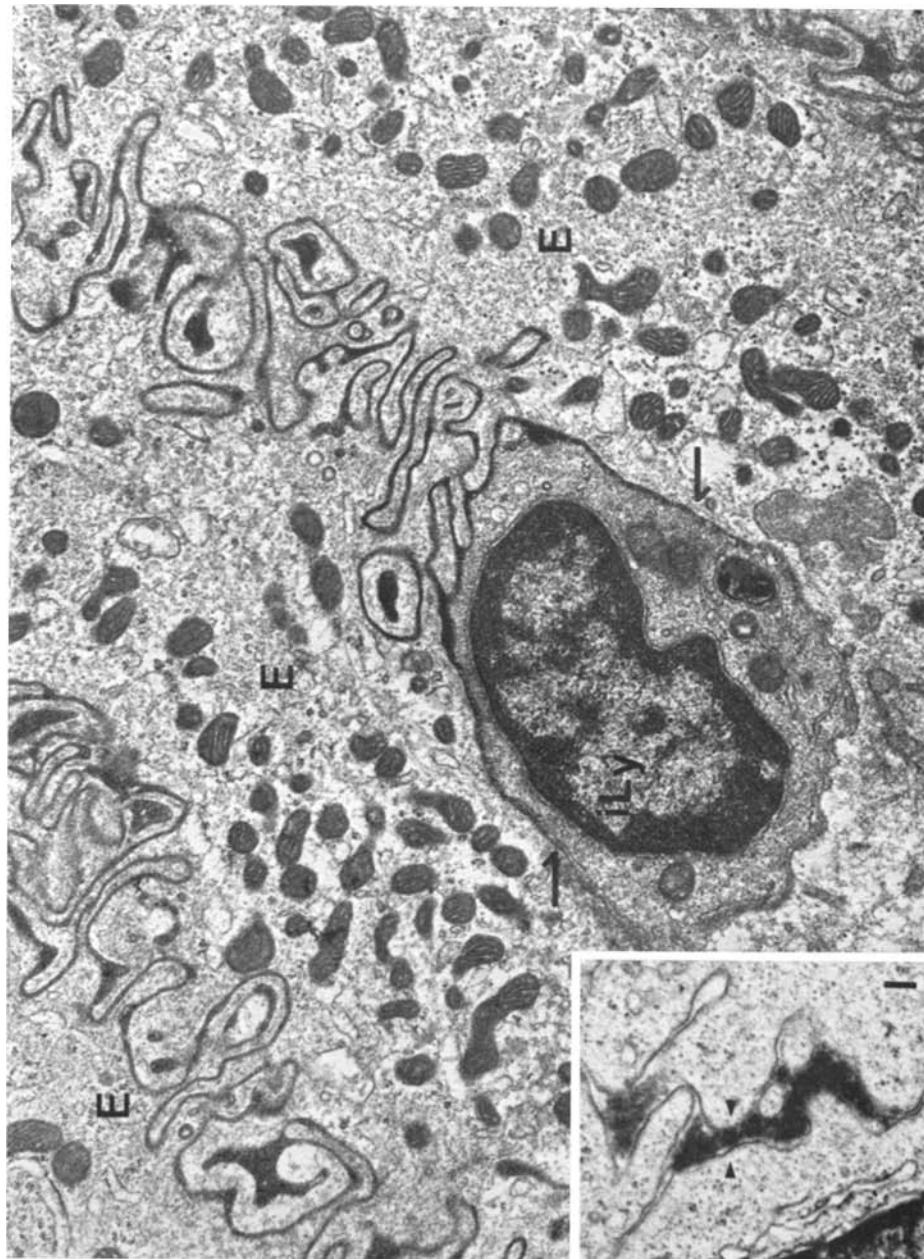


Abb. 1. Lamina epithelialis mucosae (E) des Sigma mit interepithelialen Lymphocyten (Ily) bei Colitis ulcerosa und chronischer Lymphadenose (J. Nr. 2454/72; Pathol. Inst., Univ. Hamburg). Homogene R.R.-Färbung des interepithelialen Raumes; partielle, basaiwärts abbrechende (Pfeile) R.R.-Färbung des perilymphocytären Raumes. Uranylacetat. $\times 15100$. Inset (I): Ausschnitt von 2 benachbart liegenden interepithelialen Lymphocyten mit R.R.-angefärbtem Interstitium (►) und tiefen cytoplasmatischen Verfingerrungen. Uranylacetat. $\times 22000$

stellt es sich teils homogen, teils fein- oder grobgranulär dar (Abb. 1—3). In der Regel überwiegt jeweils nur eine der Reaktionsformen.

Das pericelluläre Interstitium der epithel-assoziierten Lymphocyten wird durch RR unterschiedlich markiert. In keinem Falle fanden wir den gesamten perilymphocytären Raum durch RR angefärbt; partielle Anfärbungen sind



Abb. 2. Sigma bei Colitis ulcerosa und chronischer Lymphadenose (J. Nr. 2454/72; Pathol. Inst., Univ. Hamburg). Homogene RR-Anfärbung des apikalen perilymphocytären Raumes. Starke Faltungen (****) der apikal des interepithelialen Lymphozyten (*iLy*) gelegenen Epithelzellmembran. Stratum proprium (*Sp*) mit deutlich verbreiterter Basalmembran. Uranyl-acetat. $\times 14900$

die Regel. Es lassen sich hinsichtlich der Lokisationsorte und der Präzipitationsformen zwei Reaktionstypen abgrenzen: 1. Homogene, teils auch grob-granuläre Anfärbungen finden sich überwiegend im apikalen Anteil des perilymphocytären Raumes (Abb. 1 und 2). Sie setzen sich kontinuierlich in den interepithelialen Spaltraum fort. Das basalwärts gelegene Interstitium zwischen

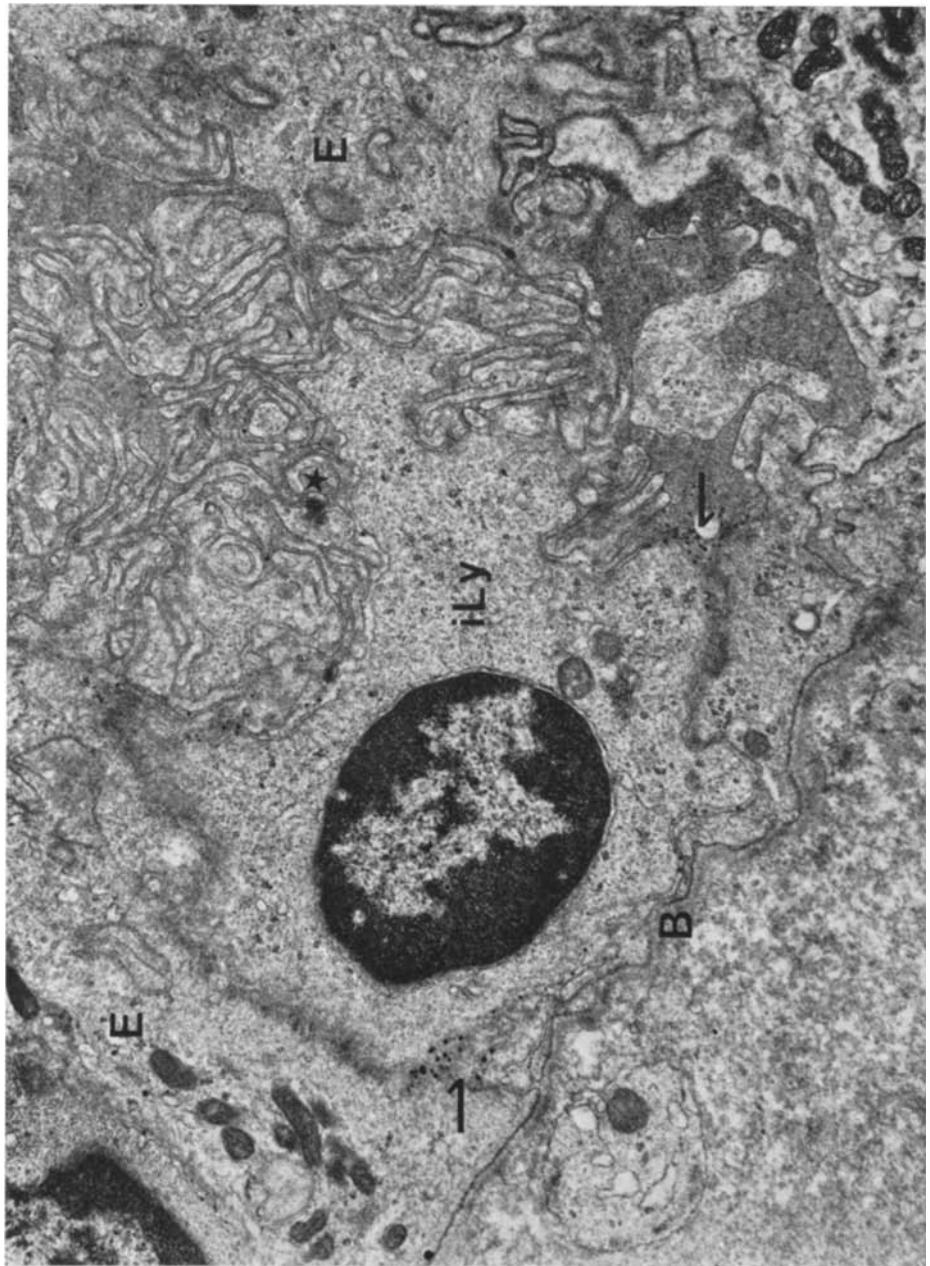


Abb. 3. Sigma biopsie bei Colitis ulcerosa und chronischer Lymphadenose (J. Nr. 2454/72; Pathol. Inst., Univ. Hamburg). Granuläre RR-Ablagerungen (Pfeile) im basalen perilymphocytären Raum. Apikal des Lymphocyt (iLy) ausgeprägte Membranfaltungen der Epithelzellen (E) mit z.T. angeschnittenen Desmosomen (*). Basalmembran (B). Uranylacetat. $\times 15400$

Lymphocyt und Epithelzellen bleibt frei von RR; 2. Granuläre, vor allem fein-granuläre RR-Markierungen finden sich vorwiegend im basalen Anteil des perilymphocytären Raumes (Abb. 3).

Homogenes, teils auch grobgranuläres RR wird auch zwischen gruppiert gelagerten interepithelialen Lymphocyten gefunden (Abb. 1; Inset). Dabei

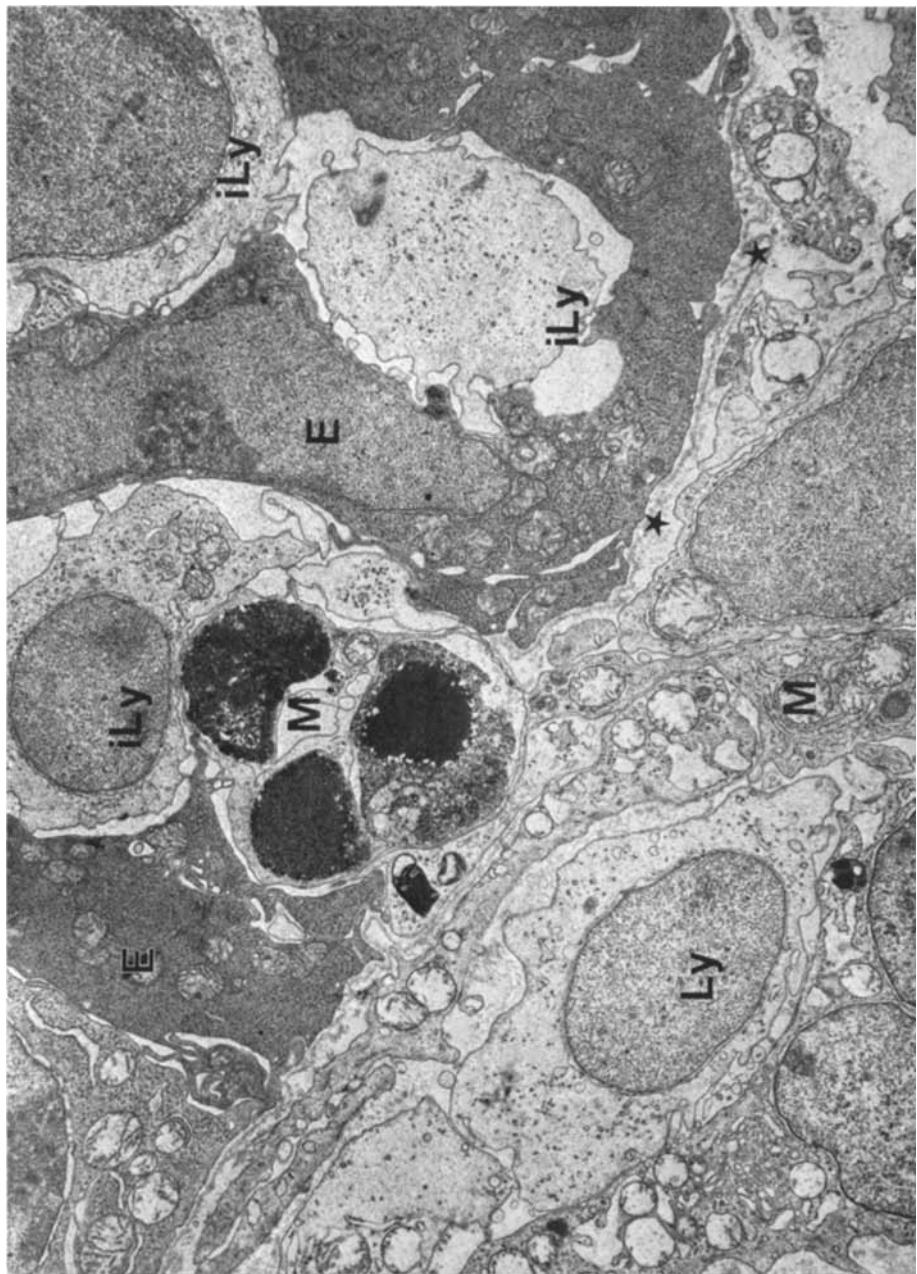


Abb. 4. Sigmoidbiopsie bei Colitis ulcerosa und Pseudopolyposis (071/72; Pathol. Inst., Univ. Hamburg). Interepithiale (iLY) und unmittelbar subepithelial gelegene Lymphozyten (Ly). Epithelzellen (E). In den interepithelialen Raum hineinragende Makrophagenausläufer (M) mit RR-markierten Phagolysosomen. Basalmembran (*). Daltonfixierung. Blockkontrastierung mit Uranylacetat. $\times 8400$

kommt es zu einer auffallend starken cytoplasmatischen Verfängerung zwischen den einzelnen Lymphozyten.

Partielle Unterschiede hinsichtlich der Intensität oder des räumlichen Ausmaßes des RR-Nachweises ergaben sich für die einzelnen Krankheitsbilder nicht. Lediglich die Anzahl der epithel-assoziierten Lymphozyten variiert stark.

Vielfach, insbesondere bei ulceröser und granulomatöser Colitis, finden sich in den interepithelialen Raum der Lamina epithelialis mucosae vorgeschobene Cytoplasmaarme von Makrophagen, in enger Membranbeziehung zu epithel-assoziierten Lymphocyten. Diese Cytoplasmaarme enthalten in sich unterschiedlich strukturierte, RR-markierte Phagolysosomen (Abb. 4). Dabei ist in der Regel der interepithelialen Raum selbst frei von RR.

Diskussion

RR imbibiert Membranlipide, Glykokalyxstrukturen und verschiedene, im interzellulären Raum gelegene Substanzen und führt dadurch zu einer starken Kontraststeigerung der Zellmembranen bzw. des interepithelialen Raumes. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen mit RR ist vor allem die kombinierte Anwendung von RR mit Osmiumtetroxyd während der Fixierung wichtig. Die alleinige Zugabe von RR zu Aldehydfixantien oder die RR-Färbung vor oder nach Osmiumfixation führt zu keinen befriedigenden Ergebnissen (s. auch: Luft, 1971 a).

In Übereinstimmung mit Befunden an der Niere (Cossel u. Mitarb., 1971; Fowler, 1970; Fuchs, 1971) und an der Leber (Cossel u. Mitarb., 1969) ist die RR-Affinität auch des Intestinaltraktes sehr variabel. Da durch RR in erster Linie Intercellularsubstanzen und/oder Membranen markiert werden, könnte die unterschiedliche, aktuelle Anfärbarkeit bedingt sein durch:

1. den Funktionszustand
2. den Polymerisationsgrad
3. den Ladungszustand
4. die Zusammensetzung
5. den Alterungszustand.

Cossel u. Mitarb. (1969) interpretieren den Befund des „herdförmigen unregelmäßigen Auftretens des Kontrastierung durch RR“ an Lebergewebe als „morphologischen Ausdruck einer herdförmig bestehenden vorübergehenden Situation des Stoffaustausches zwischen Parenchym und Blut“. Analog könnten die RR-markierten interepithelialen Räume der Lamina epithelialis mucosae Orte vermehrten Stoffaustausches oder -transportes in apiko-basaler, baso-apikaler oder zwischencellulärer Richtung sein. Hierbei könnte RR die Rolle einer Tracersubstanz spielen.

Durch das stete Vorkommen einer nur partiellen Anfärbung des perilymphocytären Raumes werden hier möglicherweise lokale Unterschiede des Interstitiums, der darin vorkommenden Substanzen und der mit der Zellmembran assoziierten Glykokalyx charakterisiert. Es stellt sich die Frage, ob dieser Befund als Zeichen variabler bzw. unterschiedlicher Funktionszustände oder einer (funktionell bedingten) unterschiedlichen Gestalt der Zellmembranen gedeutet werden könnte. Die Natur dieser möglichen lokalen Zustandsänderung der Zellmembran ist noch gänzlich ungewiß.

Wie aus der zusammenfassenden schematischen Darstellung (Abb. 5) hervorgeht, ist der Raum zwischen 2 benachbarten Epithelzellen in der Regel kontinuierlich RR-markiert. Benachbarte Epithelzellen werden offenbar von einem Interstitium *gleichen* Zustandes getrennt. Epithelassoziierte Lymphocyten

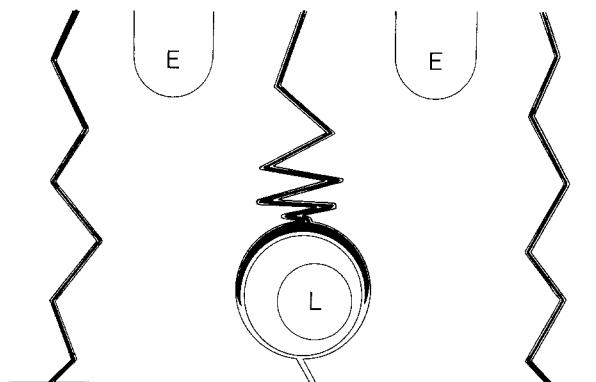


Abb. 5. Schematische Darstellung der verschiedenen RR-Ablagerungen und der starken, apikal des interepithelialen Lymphocytens (*L*) gelegenen Membranfaltung der Epithelzellen (*E*)

führen zu einer Änderung der RR-Affinität des jeweiligen interepithelialen Raumes. Die basalen perilymphocytären Areale sind gewöhnlich frei von RR. Oberhalb des interepithelialen Lymphocytens sind die Epithelzellmembranen besonders stark gefaltet, gleichsam gestaucht (Abb. 1, 2 und 5). Durch die aktive Lymphocytenemigration in den entero-epithelialen Zellverband (ebenso durch die umgekehrte Bewegungsrichtung) wird offensichtlich *lokal* der Charakter des Interstitiums der Lamina epithelialis mucosae verändert. Sind die basalen Anteile des perilymphocytären Interstitium RR-markiert, so überwiegend in der granulären Form. Diese gegensätzlichen Befunde könnten Hinweis auf eine unterschiedliche Migrationsphase bzw. -richtung, auf eine verschieden lange Verweildauer im Epithelverband, oder aber Zeichen eines unterschiedlichen Funktionszustandes des epithel-assoziierten Lymphocytens und/oder der begrenzenden Zylinderzellen sein.

Epithel-assoziierte Lymphocytens liegen ausschließlich intercellulär (Meader u. Landers, 1967; Fichtelius, 1969; Toner u. Ferguson, 1971; Otto, 1972b; Otto u. Walke, 1972). Der Stofftransport resorbierender, polar differenzierter Epithelzellen verläuft zum großen Teil durch die intercellulären Räume (Imai u. Coulston, 1968; Herzer u. Mitarb., 1969; Cornell u. Mitarb., 1971). Auf diesem transcellulären Weg werden offenbar auch antigene Substanzen transportiert (Imai u. Coulston, 1968). Die Kontaktmöglichkeiten zwischen diesen Antigenen und den epithel-assoziierten Lymphocytens sind auf diese Weise gleichsam ideal. Es wird angenommen, daß Vorgänge, die der Erkennung des Antigens folgen und eine Stimulierung immun-reaktiver Zellen auslösen, mit spezifischen Veränderungen der Zellmembran verbunden sein müssen (Smithies, 1968; Fischer u. Mitarb., 1969). Smithies (1968) vermutet, daß sich normalerweise die Membran antigen-reaktiver Zellen und die in ihr lokalisierten Rezeptorstrukturen in einem metastabilen Ruhezustand befinden. Durch die Bindung eines Haptens an die Rezeptorstrukturen wird dieser Zustand offenbar geändert. Dem Membran-Rezeptorsystem wird Energie zugeführt, die zu einer „Distorsion“ (Smithies, 1968) benachbarter Membranbezirke führt. Überschreitet die Energie einen

kritischen Schwellenwert („minimum requirement of distortion energy“), so wird die Zelle aktiviert. Unter diesem Aspekt und in Verbindung mit einer immer nur partiellen RR-Markierung der Lymphocytenmembran bzw. des perilymphocytären Raumes ergeben sich folgende hypothetische Überlegungen:

1. Eine lokale Abnahme der interstitiellen Mucopolysaccharidkonzentration und/oder unterschiedliche Assoziationsgrade der Glykokalyx mit Membranen könnten Orte bestimmter immunologischer Reaktivität sein. Dort könnte es zu dem geforderten intensiven Kontakt zwischen antigenen Substanzen und lymphocytären Membranen kommen. Diese Areale entsprächen dann den Antigenreceptor enthaltenden Anteilen der äußeren Zellmembran der epithel-assoziierten Lymphocyten.

2. Es könnte sich um den Ausdruck der angenommenen, im molekularen Bereich stattfindenden, lokalen „Membrandistorsionen“ während des Prozesses der Antigenerkennung handeln.

3. Als Hinweis auf Orte bestimmter Antigenakkumulation an den Membranoberflächen oder Antikörperkonzentrationen oder Antigen-Antikörper-Komplexen im Interstitium.

4. Es könnten Bereiche der Membran gekennzeichnet werden, an denen es zu intensiven cellulären Interaktionen kommt, wie z.B. durch die Änderung der Interzellulärsubscanz, die hier nicht trennende, sondern verbindende Funktion annähme, indem sie eine lokale Erhöhung des Stoffaustausches zwischen den angrenzenden Zellen zuließe. Bondareff (1967) nimmt an, daß durch selektive Ionenbindung der Interzellulärsubstanz der Ionentransport zwischen Zellen ermöglicht werden könnte. Zusätzlich könnten saure Mucopolysaccharide eine wäßrige Phase, die dem Cytoplasma entspräche, annehmen. Hierdurch könnte die extracelluläre Diffusion von Ionen, Metaboliten und möglicherweise auch antigenen Substanzen stattfinden (Gersh u. Catchpole, 1960).

5. Schließlich könnten lokalisierte intercelluläre Wechselbeziehungen durch die Ausbildung von Kommunikationsbrücken („cell junctions“) zwischen Lymphocyten und Epithelzellen oder auch anderen Zellformen, etwa Makrophagen (Abb. 4) durch die Orte der Membranveränderungen indirekt markiert werden. Diese für gleichartige Zellen funktionell nachgewiesenen zwischencellulären Verknüpfungselemente könnten nach einem Vorschlag von Fischer u. Mitarb. (1970) auch zwischen Zellen verschiedener Populationen zustande kommen.

Literatur

- Anderson, W A : Cytochemistry of sea urchin gamets. II. Rutheniumred staining of gamets membranes of sea urchins. *J. Ultrastruct. Res.* **24**, 322 (1968)
- Bondareff, W.: An intercellular substance in rat cerebral cortex. Submicroscopic distribution of ruthenium red. *Anat. Rec.* **157**, 527 (1967)
- Collan, Y.: Characteristics of nonepithelial cells in the epithelium of normal rat ileum. *Scand. J. Gastroent.* **7**, Suppl. 18, 1 (1972)
- Cornell, R., Walker, W. A., Isselbacher, K. J.: Small intestinal absorption of horseradish peroxidase. A cytochemical study. *Lab. Invest.* **25**, 42 (1971)
- Cossel, L., Weidenbach, H., Schulz, B.: Elektronenmikroskopische Befunde an der Leber bei Anwendung von Rutheniumrot. *Beitr. path. Anat.* **139**, 381 (1969)
- Cossel, L., Weidenbach, H., Schulz, B.: Elektronenmikroskopische Befunde an der Niere bei Anwendung von Rutheniumrot. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **114**, 554 (1971)

- Fasske, E., Stein, I.: Über die Anfärbarkeit saurer Mucopolysaccharide mit Rutheniumrot. *Z. wiss. Mikr.* **67**, 47 (1965)
- Fichtelius, K. E.: The mammalian equivalent to the Bursa Fabricii of birds. *Exp. Cell Res.* **46**, 231 (1967)
- Fichtelius, K. E., Sundström, C., Kullgren, B., Linna, J.: The lymphoepithelial organs of homo sapiens revisited. *Acta path. microbiol. scand.* **77**, 103 (1969)
- Fischer, H., Ax, W., Malchow, H., Zeiss, I.: Studies on the cytotoxicity of lymphocytes. *Bayer-Symposium I*, 113 (1969)
- Fischer, H., Rüde, E., Sellin, D.: Membranaspekte der Immunologie. *Naturwissenschaften* **57**, 507 (1970)
- Fletcher, J. M., Greenfield, B. F., Hardy, C. J., Scargill, D., Woodhead, J. L.: Ruthenium red. *J. chem. Soc.* (1961) 2000
- Fowler, B. A.: Ruthenium red staining of rat glomerulus. Perfusion of ruthenium red into normal and nephrotic rat kidney. *Histochemie* **22**, 155 (1970)
- Fuchs, U.: Kontinuierliche und granulär dargestellte Glykokalyx der Zellmembran. *Acta histochem. (Jena)* **41**, 229 (1971)
- Gersh, J., Catchpole, H. R.: The nature of ground substance of connective tissue. *Perspect. Biol. Med.* **3**, 282 (1960)
- Good, R. A., Papermaster, B. W.: Ontogeny and phylogeny of adaptive immunity. *Advanc. Immunol.* **4**, 1 (1964)
- Herzer, R., Merker, H. J., Habrich, F. J.: Resorptions- und Sekretionsstudien am Darm. III. Die Bedeutung der Interzellulärspalten für den Nettoflüssigkeitstransport am Dünndarm (Rattenversuche). *Z. ges. exp. Med.* **150**, 239 (1969)
- Imai, H., Coulston, F.: Ultrastructural studies of absorption of methoxychlor in the jejunal mucosa of the rat. *Exp. molec. Path.* **8**, 135 (1968)
- Kraehenbuhl, J. P., Gloor, E., Balnc, B.: Résorption intestinale de la ferritine chez deux espèces animales aux possibilités d'absorption protéique néonatale différentes. *Z. Zellforsch.* **76**, 170 (1967)
- Luft, J. H.: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanisms of action. *Anat. Rec.* **171**, 347 (1971a)
- Luft, J. H.: Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. *Anat. Rec.* **171**, 369 (1971b)
- Meader, R. D., Landers, D. F.: Electron and light microscopic observations on relationship between lymphocytes and intestinal epithelium. *Amer. J. Anat.* **121**, 763 (1967)
- Nossal, G. J. V.: The lymphocyte surface and its reactions to antigen. Proc. of the III. Le-petit Colloquium, London 1971. Amsterdam: North-Holland Publ. Co. 1972
- Otto, H. F.: Interepitheliale Lymphocyten bei Enteropathien. *Z. Gastroenter.* **10**, 173 (1972a)
- Otto, H. F.: The interepithelial lymphocytes of the intestinum. Morphological observations and immunological aspects of intestinal enteropathy. *Curr. Top. Pathol.* **57**, 81 (1972b)
- Otto, H. F., Walke, A.: Über lympho-epitheliale Beziehungen bei Enteropathien. *Virchows Arch. Abt. A* **355**, 85 (1972)
- Smithies, O.: Regulation of the antibody response. Springfield, Ill.: Charles C. Thomas 1968
- Toner, P. G., Ferguson, A.: Intraepithelial cells in the human intestinal mucosa. *J. Ultrastruct. Res.* **24**, 329 (1971)

Priv.-Doz. Dr. H. F. Otto
 Pathologisches Institut der Universität
 D-2000 Hamburg 20
 Martinstr. 52
 Bundesrepublik Deutschland