

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**In situ Phänotypisierung von Makrophagen in akuten
Entzündungsreaktionen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anne Petrick, geb. Noack
Tierärztin aus Lauchhammer

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4317

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopfleisch

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopfleisch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Sonja Bröer

Dritter Gutachter: PD Dr. Michael Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, animal models, laboratory methods, macrophages, acinetobacter baumannii,
staphylococcus aureus, skin, lungs, pneumonia, histology, immunohistochemistry

Tag der Promotion: 01.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	9
1.1 Makrophagen - Geschichte und Herkunft.....	9
1.2 Makrophagenpolarisation – Vorstellung der M1/M2-Dualität und Nomenklatur.....	12
1.3 Differenzierungskriterien von Makrophagen.....	15
1.3.1 Polarisierung des Metabolismus und metabolische Polarisierung.....	15
1.3.2 Funktionen und Genexpression.....	17
1.3.3 Makrophagenmarker.....	19
1.4 Polarisierung und Pathologie -M1/M2-assoziierte Erkrankungen.....	27
1.5 Lungenmakrophagen.....	29
1.6 Pneumoniemodell <i>Acinetobacter baumannii</i>	31
1.7 Pneumoniemodell <i>Staphylococcus aureus</i>	32
1.8 Pneumoniemodell <i>Legionella pneumophila</i>	33
1.9 Makrophagen in Fremdkörperreaktionen der Haut durch Biomaterialimplantate....	34
2 Grundüberlegung und Arbeitshypothese.....	35
3 Material und Methoden.....	37
3.1 Mausmodelle.....	37
3.1.1 Evaluierung geeigneter Mausmodelle.....	37
3.1.2 Versuchsablauf des Hautimplantatmodells.....	38
3.1.3 Versuchsablauf der Pneumoniemodelle.....	39
3.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung.....	39
3.3 Immunhistochemie-Protokoll.....	40

3.4	Immunfluoreszenz-Färbung.....	41
3.5	Antikörperetablierungsverfahren für die Immunhistochemie- bzw. Immunfluoreszenzfärbung:.....	42
3.5.1	Anti-CD68 Antikörper (ab125212, Kaninchen, polyklonal)	42
3.5.2	Anti-iNOS Antikörper (ab15323, Kaninchen, polyklonal).....	42
3.5.3	Anti-Leber Arginase Antikörper (ab91279, Kaninchen, polyklonal).....	43
3.5.4	Anti-CD163 Antikörper [EPR19518] (ab182422, Kaninchen, monoklonal).....	43
3.5.5	Exkludierte Antikörper.....	43
3.6	Pathomorphologische Beurteilungen	47
3.6	Digitale Analyse und Quantifizierung	48
3.7	Statistische Analyse.....	49
4	Ergebnisse	51
4.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	51
4.1.1	Tatsächliche Gruppengröße	51
4.1.2	Modellspezifische histopathologische Kennzeichen der <i>Acinetobacter</i> -Pneumonie.....	51
4.1.3	Anteil der affected Area.....	52
4.1.4	CD68.....	55
4.1.5	Arg1	57
4.1.6	iNOS	59
4.1.7	CD163.....	61
4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	63
4.2.1	Tatsächliche Gruppengröße	63
4.2.2	Histopathologische Beurteilung.....	63
4.2.3	Anteil der affected Area.....	64
4.2.4	CD68.....	66
4.2.5	Arg1	67

4.2.6	iNOS	68
4.2.7	CD163.....	70
4.3	Antikörper im Vergleich.....	72
5	Diskussion.....	73
5.1	Makrophagen-Markeretablierung in der IHC und IF.....	73
5.2	Marker im Acinetobacter-Modell.....	74
5.2.1	CD68.....	74
5.2.2	Arg1	76
5.2.3	iNOS	77
5.2.4	CD163.....	79
5.3	Marker im Staphylokokken-Modell.....	82
5.3.1	CD68.....	82
5.3.2	Arg1	83
5.3.3	iNOS	85
5.3.4	CD163.....	86
5.4	Die 4 Antikörper im Vergleich	88
5.5	Limitationen der Studie	88
6	Schlussfolgerung.....	90
7	Zusammenfassung.....	93
8	Summary.....	96
9	Literatur.....	99
10	Anhang.....	126
	Danksagung.....	129
	Selbstständigkeitserklärung	130

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Exemplarische Darstellung der digitalen Analyse.....	49
Abb. 2: Makrophageninfiltration in der Lunge bei der Acinetobacter-Pneumonie.....	52
Abb. 3: Affected Area im Acinetobacter-Modell -Antikörper Vergleich.....	53
Abb. 4: Anteil der affected Area an der Gesamtschnittfläche der Lunge im Acinetobacter-Modell	54
Abb. 5: Exemplarisches Übersichtsbild der Lunge im Acinetobacter-Modell	54
Abb. 6: Beispielhafte IHC-Färbungen im Acinetobacter-Modell	55
Abb. 7: Ergebnisse der IHC für CD68 im Acinetobacter-Modell.....	56
Abb. 8: Ergebnisse der IHC für Arg1 im Acinetobacter-Modell.....	58
Abb. 9: Ergebnisse der IHC für iNOS im Acinetobacter-Modell.....	60
Abb. 10: Ergebnisse der IHC für CD163 im Acinetobacter-Modell.....	62
Abb. 11: Histopathologie der Staphylokokken-Pneumonie	64
Abb. 12: Affected Area im Staphylokokken-Modell -Antikörper Vergleich.....	65
Abb. 13: Anteil der affected Area an der Gesamtschnittfläche der Lunge im Staphylokokken-Modell	65
Abb. 14: Beispielhafte IHC-Färbungen im Staphylokokken-Modell.....	66
Abb. 15: Ergebnisse der IHC für CD68 im Staphylokokken-Modell.....	67
Abb. 16: Ergebnisse der IHC für Arg1 im Staphylokokken-Modell	68
Abb. 17: Ergebnisse der IHC für iNOS im Staphylokokken-Modell.....	69
Abb. 18: CD163 IHC-Färbungen im Staphylokokken-Modell.....	70
Abb. 19: Ergebnisse der IHC für CD163-positive Zellen im Staphylokokken-Modell.....	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der Literatur publizierte Makrophagen-Marker.....	26
Tabelle 2: Getestete Färbungen weiterer Pan-Makrophagen-Marker.....	44
Tabelle 3: Getestete Färbungen weiterer M1-Makrophagen-Marker.....	44
Tabelle 4: Getestete Färbungen weiterer M2-Makrophagen-Marker.....	46
Tabelle 5: Gruppengröße Acinetobacter-Modell.....	51
Tabelle 6: Phagen- vs. Pufferbehandlung -CD163-positive Zellen/mm ² Lungenparenchymfläche im Acinetobacter-Modell.....	63
Tabelle 7: Gruppengröße Staphylokokken-Modell	63
Tabelle 8: Antikörper im Vergleich im Acinetobacter-Modell.....	72
Tabelle 9: Antikörper im Vergleich im Staphylokokken-Modell.....	72
Tabelle 10: Einstellungen der verwendeten Algorithmen im AcB-Modell.....	126
Tabelle 11: Einstellungen der verwendeten Algorithmen im Staph-Modell.....	127
Tabelle 12: Phagen- vs. Pufferbehandlung -CD68-positive Zellen/mm ² affected Area im AcB- Modell	128
Tabelle 13: Phagen- vs. Pufferbehandlung –Arg1-positive Zellen/mm ² affected Area im AcB- Modell	128
Tabelle 14: Phagen- vs. Pufferbehandlung -iNOS-positive Zellen/mm ² affected Area im AcB- Modell	128

Abkürzungsverzeichnis

3R -engl. Replace, Reduce, Refine

A. baumannii -*Acinetobacter baumannii*

Abb. -Abbildung

ABC - engl. Avidin-Biotin-Complex

AcB -*Acinetobacter baumannii*

A. dest. -Aqua destillata

AK -Antikörper

AM -Alveolar Makrophagen

BALF -Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit

BSA -Bovines Serumalbumin

CCL -CC-Chemokinligand

CCR -CC-Chemokinrezeptor

CD -Cluster of Differentiation

COPD -Chronisch obstruktive Lungenerkrankung, engl. Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CP -Citrat Puffer

CREG-1 -engl. Cellular Repressor of E1A-stimulated Genes 1

Cre/loxP -Rekombinationssystem, engl. Cyclization Recombination / Locus of X-over P1

CSF -engl. Colony-stimulating Factor

CXC -CXC-Chemokin

CXCL -CXC-Chemokinligand

CyTOF -Massenzytometrie, engl. Cytometry by Time of Flight

DAB -3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid

DZ -dendritische Zellen

EDTA -Ethylendiamintetraacetat

EGF -epidermaler Wachstumsfaktor, engl. Epidermal Growth Factor

EMR1 -engl. EGF-like Module-containing Mucin-like Hormone Receptor 1

eNOS -endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase, engl. Endothelial Nitric Oxide Synthase

FELASA -engl. Federation of European Laboratory Animal Science Associations

FFPE -engl. Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue

Foxp3+ -Forkhead-Box-Protein P3, engl. Forkhead Box P3

G-CSF -Granulocyte Colony-stimulating Factor

Geom. MW -geometrischer Mittelwert

GISA -Glycopeptid-insensitive *S. aureus*

GLUT1 -Glucosetransportprotein Typ 1
GM-CSF -Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor
GS -Glutamin Synthetase
Hb -Hämoglobin
Hb-Hp -Hämoglobin-Haptoglobin
HE -Hämatoxylin und Eosin
HIF1 α -Hypoxie-induzierte Faktor Alpha
IDSA -engl. Infectious Diseases Society of America
IF -Immunfluoreszenz
IFN -Interferon
IHC -Immunhistochemie
IL -Interleukin
IM -Interstitielle Makrophagen
iNOS -induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase, engl. Inducible Nitric Oxide Synthase
IQA -Interquartilsabstand
IRF -engl. Interferon Regulatory Factor
KI -Konfidenzintervall
Leg -*Legionella pneumophila*
L. pneumophila -*Legionella pneumophila*
LPS -Lipopolysaccharide
Mac -Makrophagen
M-CSF -engl. Macrophage Colony-stimulating Factor
MerTK -Protoonkogen-Tyrosin-Protein-Kinase MER, engl. Mer Tyrosine Kinase
MHCII -Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II, engl. Major Histocompatibility Complex Class II
MPS -Mononukleär-phagozytierendes System
mRNA -Boten-Ribonukleinsäure, engl. messenger Ribonucleic Acid
MRSA -Methicillin-resistente *S. aureus*
MW -Mikrowelle
MyD88 -engl. Myeloid Differentiation Primary Response 88
NADPH -reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphats
NF -Neufuchsin
NK -Negativkontrolle
NK-Zellen -natürliche Killerzellen
nNOS -neuronale Stickstoffmonoxidsynthase, engl. Neuronal Nitric Oxide Synthase
NO -Stickstoffmonoxid
NOD-like receptors -engl. Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors

ns -nicht signifikant
oVB -ohne Vorbehandlung
PBS -Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. Phosphate Buffered Saline
PEI -Polyetherimide
p. inf. -post infectionem
PPDO -Poly-p-dioxanone
PROT -Protease
PRR -Mustererkennungsrezeptoren, engl. Pattern Recognition Receptors
PVDF -Polyvinylidene-fluoride-co-hexafluoropropene
RES -Retikuloendotheliales System
RIG1 -engl. Retinoic Acid-inducible Gene 1
RNA -Ribonukleinsäure, engl. Ribonucleic Acid
ROS -Reaktive Sauerstoffspezies, engl. Reactive Oxygen Species
RT -Raumtemperatur
S. aureus - *Staphylococcus aureus*
SCID - schwerer kombinierter Immundefekt, engl. severe combined immunodeficiency
SOCS -engl. Suppressors Of Cytokine Signaling
SPF -spezifisch pathogenfrei
SREBPs -engl. sterol regulatory binding proteins
Staph -*Staphylococcus aureus*
STAT -engl. Signal Transducer and Activator of Transcription Protein
pSTAT -engl. Phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription Protein
Tab. -Tabelle
TAM -Tumor-assoziierte Makrophage, engl. Tumor Associated Macrophage
TEP -TRIS-EDTA-Puffer
TGF -Transformierender Wachstumsfaktor, engl. Transforming Growth Factor
TGM -Transglutaminase 2
Th1 -Typ1-T-Helferzellen
Th2 -Typ2-T-Helferzellen
TLR -Toll-like-Rezeptor
TNF -Tumornekrosefaktor
Treg -regulatorischer T-Zellen
TRIS -Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWEAK -engl. TNF-related Weak Inducer of Apoptosis
VEGF -vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren, engl. Vascular Endothelial Growth Factor
VRSA -Vancomycin-resistente *S. aureus*
(+Z)/mm² -stark positive Zellen pro Quadratmillimeter

1 Einleitung

Makrophagen stellen spezialisierte Immunzellen dar, die eine Schlüsselrolle bei der körpereigenen, angeborenen Immunabwehr und Entzündungsreaktionen einnehmen. Neben der namensgebenden Phagozytoseeigenschaft durch die apoptotische Zellen aber auch körperfremde Strukturen wie z.B. Viren oder Bakterien aufgenommen und anschließend durch reaktive Sauerstoffspezies wie Stickstoffmonoxid (NO) inaktiviert werden können, übernehmen Makrophagen zahlreiche weitere Funktionen im Körper. Hierzu zählen u.a. die Präsentation von Antigenen, eine Beteiligung bei Gewebsumbauprozessen im Körper sowie die Erhaltung körpereigener Homöostasen (Sica & Mantovani, 2012). Von zentraler Bedeutung sind sie auch bei akuten oder chronischen Entzündungsprozessen, bei denen sie proinflammatorische Zytokine sezernieren, Endothelzellen aktivieren und weitere Immunzellen rekrutieren, aber auch, was zunächst konträr erscheinen mag, antiinflammatorische Mediatoren freisetzen und die Kollagenbildung steuern (Viola et al., 2019). Mit dieser hohen funktionellen Diversität geht auch eine starke Plastizität und Ausprägung verschiedenster Phänotypen einher, sodass Wissenschaftler Makrophagen nicht länger als eine homogene Zellpopulation ansehen, wie zunächst angenommen und was über viele Jahrzehnte hinweg das gültige Kredo war, sondern sich hingegen ein ganzes Spektrum an verschiedensten Aktivierungszuständen und Funktionen der Makrophagen präsentiert (Guillot & Tacke, 2019).

1.1 Makrophagen - Geschichte und Herkunft

Die Entdeckungsgeschichte der Makrophagen beginnt bereits 1866 als sie von dem Forscher Kranid Slavjansky (ein Schüler von Rudolf Virchow) erstmals beschrieben wurden. In einem Tierversuch instillierte er eine Zinnober-Lösung in die Luftröhre von Kaninchen und konnte histologisch in der Lunge Zellen erkennen, die Zinnober enthielten und morphologische sowie funktionelle Ähnlichkeiten mit weißen Blutkörperchen hatten. Zudem beschrieb er auch bereits die Migration der Zellen aus dem Blut ins Gewebe (Slavjansky, 1866).

14 Jahre später entdeckte der russische Zoologe Ilja Metschnikow phagozytierende Zellen in Seesternen und somit die Funktion und Bedeutung der Phagozytose. Er bezeichnete diese Zellen erstmals als „Makrophagen“. Zusammengesetzt aus dem altgriechischen *makrós*, - ‚groß‘ und *phagein*, - ‚essen‘, so sind sie auch bekannt als „Riesenfresszellen“ (Metschnikow, 1880).

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts bezeichnete man amöboid phagozytotische Zellen in verschiedenen Geweben als Histiozyten, im ZNS als Mikroglia und im Blut als Monozyten

(Dunning & Furth, 1935). Weitere ebenfalls organspezifisch bezeichnete Zellen dieser Gruppe stellen die Kupffer Zellen in der Leber (1876 entdeckt von Karl Wilhelm von Kupffer) und die Langerhans-Zellen in der Epidermis dar, welche 1868 von Paul Langerhans entdeckt, aber fälschlicherweise zunächst als Neuronen identifiziert wurden (Collin & Milne, 2016; Dixon et al., 2013; Stinglet et al., 1977). 1924 wurde der Begriff des Retikuloendothelialen Systems (RES) durch den deutschen Pathologen Ludwig Aschoff geprägt. Er fasste dabei alle Zellen in seinem System zusammen, die in der Lage waren einen Vitalfarbstoff intrazellulär aufzunehmen (durch Phago- aber auch Pinozytose). Dazu gehörten Endothelzellen, Fibrozyten, Retikularzellen von Milz und Lymphknoten, Retikuloendothelialzellen der Lymph- und Blut-Sinusoiden (inkl. Kupffer Zellen), Histozyten, Splenozyten und Monozyten. Im engeren Sinne wurden später nur noch die Retikularzellen der Milz und Lymphknoten sowie die Retikuloendothelialzellen zum RES gezählt (Aschoff, 1924). 1969 wurde erstmals der Begriff des Mononukleär-phagozytierenden Systems (MPS) vorgeschlagen, zu dem alle stark phagozytotisch-aktiven, mononukleären Zellen sowie deren Vorläufer gezählt wurden (Vorläuferzellen, Promonozyten, Monozyten und Makrophagen). Der Begriff des MPS wurde später noch um dendritische Zellen (DZ) erweitert. Über die Jahrzehnte entwickelte sich auch die Definition der Histozyten weiter, so dass der Begriff aktuell als übergreifende Bezeichnung für dendritische Zellen und Makrophagen gilt (Moore, 2014).

1968 propagierte van Furth die Theorie, dass alle Gewebsmakrophagen aus im Blut zirkulierenden Monozyten hervorgehen (van Furth & Cohn, 1968). Dieser Grundsatz stellte viele Jahrzehnte lang das allgemein gültige Konzept für die Herkunft der Gewebsmakrophagen dar und wurde durch verschiedenste Studien z.B. mit Hilfe radioaktiv markierter Knochenmarkstransplantationen (Volkman, 1966; Volkman & Gowans, 1965) oder auch geschlechtlich fehlgepaarten Knochenmarkstransplantationen und anschließendem Nachweis der Spender-Y-Chromosomen in Alveolar-Makrophagen gestützt (Thomas et al., 1976). Dieser Ansatz stand jedoch bereits längere Zeit im Konflikt mit mehreren Beobachtungen. So blieb in mehreren Studien trotz einer Reduktion der zirkulierenden Monozytenzahl, z.B. durch Inaktivierung des monozytären, C-C-Chemokin-Rezeptor Typ 2 (CCR2-) Rezeptors, der nach seiner Aktivierung für eine Freisetzung von Monozyten aus dem Knochenmark sorgt oder aber auch bei Patienten mit einer Monozytopenie, die Anzahl der Gewebsmakrophagen relativ konstant, besonders in der Lunge, dem Peritoneum und der Leber (Fang et al., 2018; Hashimoto et al., 2013; Bigley et al., 2011).

Erst vor wenigen Jahren gelang es Forschern durch moderne Rückverfolgungsstudien die Diversität der originären Herkunft der Makrophagen aufzudecken. Neben den bisher beschriebenen monozytär-abgeleiteten Makrophagen konnten dabei die sogenannten „echten“ gewebsständigen Makrophagen identifiziert werden, deren Ursprung im Ektoderm des embryonalen Dottersackes (Mikroglia, Langerhans-Zellen) bzw. später nach dem Auswandern der

Progenitorzellen in der fetalen Leber (Langerhans-Zellen) liegt. Von dort aus besiedeln Vorläuferzellen während der Embryogenese bzw. Fetalperiode das cephalische Mesenchym und Neuroepithel bzw. die Haut, wo sie sich anschließend mittels Teilung fortlaufend selbst erneuern. So konnte die Arbeitsgruppe von Ginhoux in ihrer Studie belegen, dass 95 bis 80 % der Mikroglia adulter Mäuse nicht monozytären Ursprunges, sondern von primitiven myeloiden Progenitorzellen abstammen und bereits vor dem embryonalen Tag 8 einwandern. Yona et al. zeigten mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems, dass viele residente Makrohagenpopulationen wie Kupffer Zellen, Alveolarmakrophagen, Milz- und Peritonealmakrophagen bereits vor der Geburt in den jeweiligen Geweben angesiedelt werden und durch einen stammzellähnlichen Charakter ihre eigene Homöostase im Erwachsenenalter unabhängig von einwandernden Blutmonozyten halten können (Yona et al., 2013; Schulz et al., 2012; Ginhoux et al., 2010). In der Herkunft der Makrophagen zeigt sich somit eine weitere Facette der Diversität dieser Zellpopulation, die mit funktionellen sowie phänotypischen Unterschieden einhergeht und beispielsweise bei Mäusen anhand der unterschiedlichen Expression des Oberflächenmarkers F4/80 (F4/80^{high} bei embryonaler vs. F4/80^{low} bei monozytärer Vorläuferzelle) unterschieden werden kann (Schulz et al., 2012).

Während unter homöostatischen Bedingungen die monozytäre Beteiligung in vielen Geweben relativ gering ist, kann sie hingegen bei Entzündungsprozessen durch Migration der Blutmonozyten stark ansteigen (Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013; Davies et al., 2011; Volkman et al., 1983). Der Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) oder auch M-CSF (macrophage-CSF) genannt, ist hauptverantwortlich für die homöostatische Kontrolle, Proliferation und Differenzierung der mononukleären Phagozyten. Diese besitzen einen CSF-1-Rezeptor, der freies CSF-1 bindet, wodurch die Zellfunktionen und Morphologie reguliert wird (Chitu & Stanley, 2006). Ginhoux et al. konnten zusätzlich belegen, dass nicht nur monozytär abgeleitete Makrophagen sondern auch Makrophagen embryonalen Ursprungs und Mikroglia einen CSF-1-Rezeptor besitzen und ein Fehlen des Rezeptors mit einer deutlichen Reduktion der beiden Zellpopulationen einhergeht, bei gleichzeitigem Nachweis zirkulierender Blutmonozyten (Ginhoux et al., 2010). Neben dem M-CSF sind noch 2 weitere CSFs bekannt, der GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, auch als CSF-2 bezeichnet) und der G-CSF (granulocyte-CSF, oder CSF-3). Zusätzlich zu der namensgebenden Fähigkeit Kolonien reifer Knochenmarksvorläuferzellen zur Proliferation und Differenzierung in die jeweiligen Zellkolonien *in vitro* anzuregen, haben CSFs noch weitere Funktionen im Rahmen von Entzündungsprozessen, so konnte z.B. eine proinflammatorische Aktivierung von Makrophagen durch GM-CSF beobachtet werden (Fleetwood et al., 2009).

1.2 Makrophagenpolarisation – Vorstellung der M1/M2-Dualität und Nomenklatur

1992 tauchten erstmals Beschreibungen von Makrophagen mit zwei unterschiedlichen Aktivierungsarten auf. Dabei wurden murine Peritonealmakrophagen mit Interleukin-4 (IL-4, ein Th-2-Lymphozyten Produkt) oder Interferon-gamma (IFN- γ , ein Th1- Lymphokin) und/oder Lipopolysaccharide (LPS) stimuliert. Die Zellen zeigten dabei nach IL-4 Stimulation eine Transkription und Expression des Makrophagen Mannose Rezeptors und sie wurde erstmals als „alternativ“ aktivierter Phänotyp bezeichnet. IFN- γ hingegen führte zu einer reduzierten Produktion proinflammatorischer Zytokine (Stein et al., 1992).

Mills et al. schlug erstmals angelehnt an die Th1-/Th2- Nomenklatur eine dichotome Polarisierung von Makrophagen zu M1-/M2-Subtypen vor. Seine Theorie basierte auf dem Vorwissen, dass bestimmte Inzucht-Stämme eine betonte Th1-Immunantwort (C57BL/6, B10D2) oder Th2-Immunantwort (BALB/c, DBA/2) zeigten. Eine Stimulation mit IFN- γ oder LPS führte vergleichsweise zu einer stärkeren Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in den Th1-Stämmen. Dem gegenüber zeigten die Th2-Stämme eine verstärkte Metabolisierung von Arginin zu Ornithin. Bereits bekannt war die zellteilungshemmende Wirkung des NO gegenüber dem teilungsfördernd wirkenden Ornithin. Demnach detektierte er also zwei konträre metabolische Aktivierungszustände der Makrophagen. Zudem erkannte er eine regulatorische Bedeutung des Transforming Growth Factors Beta 1 (TGF- β 1), welcher die NO-Synthase hemmt und Arginase stimuliert. Die Aktivierung war zudem unabhängig von B oder T-Lymphozyten, so konnte bei immundefizienten Nacktmäusen (NUDE) oder SCID (severe combined immunodeficiency) Mäusen ebenfalls eine M1-/M2-Aktivierung nachgewiesen werden. Er zeigte somit, dass M1/M2 nicht bloß als aktivierte und deaktivierte Makrophagen, sondern vielmehr als Zellen mit zwei spezifischen, metabolischen Programmen angesehen werden können, welche den Verlauf von Entzündungsreaktionen in entgegengesetzte Richtungen steuern können. Gleichzeitig räumte er jedoch auch bereits ein, dass es sich bei seinem Modell um eine allzu starke Vereinfachung handeln könnte und es evtl. ein ganzes Kontinuum verschiedenster Phänotypen zwischen M1 und M2 geben könnte, womit er nicht unrecht haben sollte (Mills et al., 2000).

Bereits kurze Zeit später kam erste Kritik an dem Modell von Mills auf. Die Forschergruppe von Stout konnte in ihren Versuchen belegen, dass Makrophagen in vitro durch Stimulation mit den Zytokinen IL-12 / IFN- γ (inflammatorisch wirkend) vs. IL-4 / IL-10 (antiinflammatorisch wirkend) vor und nach Aktivierung der Makrophagen mit LPS unterschiedliche Zytokinproduktionsmuster zeigten und diese auch bei Veränderung der Stimulierung dynamisch anpassen konnten. Demnach kamen sie zu dem Schluss, dass die Aktivierung von Makrophagen eher

als ein „model of functional adaptivity“ angesehen werden sollte, also eine kontinuierliche, funktionelle Anpassung an die Mikroumgebung (sog. Microenvironment) stattfindet (Stout & Suttles, 2004). Neben der ursprünglichen Stimulierung mit LPS / IFN- γ wurden immer weitere Stimuli für eine Makrophagenaktivierung detektiert und die Gruppe der M2-Makrophagen in die Subtypen M2a, M2b und M2c unterteilt. M2a wird dabei durch IL-4 und IL-13 induziert und wirkt mit seinen sezernierten Mediatoren, Zyto- und Chemokinen (IL-10, TGF- β , CCL17, CCL18, CCL22, CCL24) antiinflammatorisch sowie v.a. bei Gewebsumbauprozessen mit. M2b kann durch Immunkomplexe mit IL-1 β oder LPS getriggert werden, hat durch die Ausschüttung von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und CCL1 immunoregulatorische Funktionen und führt zur Th2-Aktivierung. M2c wird durch IL-10, Glucocorticoide oder TGF- β aktiviert, hat besondere Bedeutung bei der Phagozytose apoptotischer Zellen und setzt IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18 und CXCL13 frei (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Röszer, 2015; Martinez, 2008; Mantovani et al., 2004). Später wurde noch ein vierter Subtyp „M2d“ ergänzt, welcher sich auf die bislang als Tumor assoziierten Makrophagen (TAMs) bezieht, die durch Toll-like Rezeptor (TLR)-Liganden, A2-Adenosin-Rezeptor-Agonisten oder durch IL-6 induziert werden können. Diese Gruppe schüttet hohe Mengen an TGF- β , IL-10 und VEGF (vascular endothelial growth factor) aus, ist somit an der Angiogenese beteiligt und nimmt eine zentrale Rolle bei der Regulation, Progression und Metastasierung von Tumoren ein (Viola et al., 2019; Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Duluc et al., 2007; Mantovani et al., 2002).

Verreck et al. isolierten in ihren Versuchen humane Blutmonozyten und kultivierten diese mit GM-CSF oder M-CSF und bezeichneten die somit gewonnen Makrophagen als M1- respektive M2-polarisierte Makrophagen (Verreck et al., 2004). Andere Forschergruppen griffen diesen Ansatz auf und bezeichneten vom Knochenmark abgeleitete Makrophagen nach in vitro Stimulation mit GM-CSF als „M1-ähnlich“ (IL-12^{high}, IL-23^{high}, IL-10^{low}) und M-CSF als „M2-ähnlich“ (IL-12^{low}, IL-23^{low}, IL-10^{high}), jedoch wurde keine direkte Zuordnung zu M1 oder M2 durch diese Stimuli nachgewiesen (Fleetwood et al., 2007, 2009).

Einige Forscher verwendeten noch eine andere Terminologie bei der M2a als „alternativ aktivierte“ Makrophagen, M2c als „deaktivierte“ Makrophagen im Sinne einer Deaktivierung der in vitro zuvor stimulierten M1-Makrophagen und M2b als Typ 2 Makrophagen bezeichnet wurden (Röszer, 2015; Porcheray et al., 2005). So wurden die Begriffe klassische Aktivierung und M1(LPS+) bzw. alternative Aktivierung und M2(LPS-) von vielen Forschern häufig fälschlicherweise synonym verwendet. Die ursprüngliche M1/M2 Terminologie bezieht sich jedoch nur auf die in vivo Stimulation im Gegensatz zum klassischen/alternativen Phänotyp, welcher in vitro getriggert wird. Orecchioni et al. verdeutlichten dies 2019 bei ihrem Vergleich der Transkriptomanalysen von mit LPS stimulierten Peritonealmakrophagen in vivo mit vom Knochenmark abgeleiteten Makrophagen in vitro und zeigten dabei deutliche Unterschiede zwischen den

exprimierten Oberflächenmarkern auf, sodass keine direkte Translation der in vitro auf in vivo Ergebnisse möglich ist (Orecchioni et al., 2019).

In den letzten 10 Jahren entdeckten viele Forschergruppen immer neue Stimuli, die den verschiedenen Aktivierungszuständen der Makrophagen zugeschrieben wurden. Neben diesen konnten mittels neuer Techniken, wie der polychromatischen Durchflusszytometrie (flow cytometry) und der Massenzytometrie (cytometry by time of flight, CyTOF), immer mehr Oberflächenmarker detektiert werden, sodass neue Subtypen phagozytierender Zellen publiziert wurden, was zu einer zunehmenden Unübersichtlichkeit in dem Feld führte (Bassler et al., 2019). Dabei muss neben den unterschiedlichen Stimulationsfaktoren z.B. auch der Versuchsablauf streng in die Interpretation der Daten mit einbezogen werden. Fand die Stimulation in vitro oder in vivo statt? Handelt es sich um Versuche mit menschlichen oder murinen Makrophagen und wie wurden diese gewonnen? Für humane Zellkultur-Versuche werden Makrophagen vorrangig in vitro durch Stimulation zirkulierender Blutmonozyten gewonnen. Bei Maus-Experimenten hingegen nutzt man häufiger Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder Peritonealmakrophagen, deren Population sowohl monozytären als auch embryonalen Ursprungs sein kann. Murray et al. empfahlen daher eine einheitliche Nomenklatur und normierte Versuchsläufe. So definieren sie als Standard bei humanen in vitro Versuchen die Verwendung monozytär-abgeleiteter Makrophagen aus dem Blut und bei murinen Ansätzen Makrophagen aus dem Knochenmark sowie eine genaue Benennung der verwendeten Stimulation z.B. M(LPS) oder M(IL-4) usw. (Murray et al., 2014). Diese Terminologie erweist sich jedoch gerade bei in vivo Versuchen z.T. als wenig praktikabel, da der genaue Vorgang der Stimulation im Körper oft (noch) unklar und das vorherrschende Microenvironment sehr komplex ist (Jablonski et al., 2015).

In den letzten Jahren gerat das bipolare Modell von Mills et al. aus dem Jahr 2000 zunehmend in die Kritik der Forscher, da es wie bereits auch von Mills selbst diskutiert zu einer zu starken Vereinfachung der komplexen Makrophagen-Diversität führt (Thapa & Lee, 2019). Neben den oben genannten Verfahren wie der Massenzytometrie gelangen zunehmend auch Einzelzell-RNA-Analysen (single cell RNA sequencing) in den Fokus der Wissenschaftler. Xue et al. zeigten mittels neuerer Transkriptom-basierter Netzwerkanalysen, dass ein ganzes Spektrum an unterschiedlichen Aktivierungszuständen existiert, welches abhängig von der jeweiligen Stimulation der Makrophagen auslösbar ist. Dabei testeten sie 28 verschiedene Stimuli, darunter Pattern Recognition Receptor (PRR)-Liganden, Zytokine und metabolische Reize und untersuchten die jeweiligen Transkriptome der stimulierten Makrophagen. Die so ermittelten 299 Transkriptome ergaben nach weiteren Clusteranalysen und Netzwerkmodellen mindestens neun unterschiedliche Aktivierungsprogramme der Makrophagen (Xue et al., 2014). Bei derartige Untersuchungen entstehen enorme Datensätze, deren Interpretationen herausfordernd sind, eine spezielle Analyse-Software benötigen und deren Einsatz v.a. bei humanen

Proben noch weit von einem routinemäßigem Gebrauch entfernt ist (Bassler et al., 2019). Darüberhinausgehend führt diese enorme Komplexität wiederum zu einer zunehmenden Unübersichtlichkeit in dem Feld. Die Kritik an dem als zu stark vereinfacht angesehenen, bipolaren Model von Mills ist demnach einerseits gut begründet, andererseits besaß und besitzt es auch seine Berechtigung (Price & Vance, 2014). Es stellt ein hilfreiches Tool dar um komplexe Immunvorgänge besser verstehen zu können und ist aber, wie andere Modelle auch eben nur ein Modell, also eine Abstraktion der Realität, die in ihrer enormen Komplexität nur schwer greifbar ist. Dabei darf man bei der Interpretation von Ergebnissen nicht dem Irrtum erliegen ein Modell eins zu eins mit der Realität gleichsetzen zu können. Im weiteren Textverlauf wird zum besseren Verständnis die Terminologie der proinflammatorischen „M1“ und antiinflammatorischen „M2“ Makrophagen verwendet, in der Annahme, dass diese in ihrer Aktivierung die zwei gegensätzlichsten Extreme darstellen und dabei wohlwissend, dass zwischen ihnen ein ganzes dynamisches Spektrum weiterer Aktivierungszustände existiert.

1.3 Differenzierungskriterien von Makrophagen

Wie bereits verdeutlicht erlaubt die enorme Diversität und Plastizität der Makrophagenpopulation keine Pauschalaussagen und erfordert einen systematischen Differenzierungsansatz. Hierfür können neben dem bereits beschriebenen ontogenetischen Ursprung und der induzierenden Stimuli auch der Metabolismus, die Funktion und Genexpression sowie klassische Oberflächenmarker als weitere Differenzierungskriterien herangezogen werden (Klopffleisch, 2016), welche im Folgenden näher beschrieben sind.

1.3.1 Polarisierung des Metabolismus und metabolische Polarisierung

Der Immunmetabolismus von Makrophagen ist in den letzten 10 Jahren zunehmend in das Interesse der Forschung gerückt, denn auch in diesem Punkt gibt es neben dem Arginin-Stoffwechsel charakteristische Unterschiede zwischen den diversen Subtypen, die mit der Wahrnehmung der vielfältigen Funktionen Hand in Hand gehen. Zugleich hat aber auch die Stoffwechsellage der Umgebung als Teil des Microenvironments einen großen Einfluss auf die Polarisierungsrichtung der Makrophagen (Thapa & Lee, 2019; Baardman et al., 2018; Langston et al., 2017). Charakteristische Unterschiede zwischen M1 und M2 zeigen sich dabei insbesondere in der Energiegewinnung und Biosynthese durch Bevorzugung unterschiedlicher Stoffwechselwege des Glukose-, Fett- und Aminosäuremetabolismus. Aber auch in anderen

Punkten wie z.B. dem Eisenstoffwechsel konnten deutliche Unterschiede beobachtet werden. Der folgende Abschnitt soll einen kurzen Einblick in das komplexe Gebiet der metabolischen Differenzierung der Makrophagen geben.

M1-Makrophagen sind im Gegensatz zu M2-Makrophagen primär gekennzeichnet durch eine gesteigerte aerobe Glykolyse und der Aktivierung des Pentosephosphatweges (Haschemi et al., 2012). Über die aerobe Glykolyse kommt es dabei zu einer vermehrten Produktion von Laktat und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species), obwohl ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht (Freemerman et al., 2014). Für eine Sauerstoff-unabhängige Aktivierung dieses Stoffwechselweges der M1-Makrophagen spielt der Hypoxie-induzierte Faktor HIF 1 α eine zentrale Rolle. Dieser reguliert die Expression von Enzymen der Glykolyse sowie die intrazelluläre Glucoseaufnahme durch den Glucose Transporter GLUT1. Zudem konnte in der Studie von Wang et al. gezeigt werden, dass gentechnisch veränderte Mäuse mit einer myelospezifischen Überexpression von HIF 1 α eine verstärkte proinflammatorische M1 Polarisation der Makrophagen aufweisen, die mit einer Steigerung der Glykolyse Aktivität und des Pentose-Phosphatweges einhergeht (Wang et al., 2017). Die Glykolyse ist zwar verglichen mit der Atmungskette durch eine geringere ATP-Ausbeute gekennzeichnet, jedoch generieren M1-Makrophagen damit vermehrt wichtige Metabolite, wie bspw. Glucose-6-Phosphat. Dieses wird über den Pentosephosphatweg weiter zu NADPH umgesetzt. Das NADPH, welches an einer Vielzahl biosynthetischer Prozesse beteiligt ist, wird u.a. zur Produktion von ROS und NO genutzt (Recalcati et al., 2019; Viola et al., 2019; Baardman et al., 2018; Koo et al., 2018). Bei der metabolischen Anpassung und Polarisation hin zu einem inflammatorischen Phänotyp spielt die Glucose-Verfügbarkeit eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass eine Unterdrückung des Glucosemetabolismus zu einer reduzierten Expression inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β führt und auch die Migrationsaktivität der Makrophagen verringert (Semba et al., 2016). Demgegenüber nutzen M2-Makrophagen die Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) für ihren Energiestoffwechsel. Diese ist bei M1-Makrophagen zu großen Teilen gestört, sodass der Elektronentransport nicht regulär abläuft und vermehrt Elektronen frei gesetzt werden, die mit dem Sauerstoff der Umgebung reagieren und zu einer gesteigerten Produktion von ROS führen (Viola et al., 2019).

Ein weiterer großer Unterschied zeigt sich beim Citratzyklus, welcher bei M1-Makrophagen gestört ist und zu einer Akkumulation von Citrat und Succinat führt. Succinat steigert ebenfalls die IL-1 β Produktion (Tannahill et al., 2013) und eine erhöhte Citratproduktion führt wiederum zur Generierung von NO, ROS und Prostaglandinen (Infantino et al., 2011). Zusätzlich ist auch für NO eine Hemmung des Elektronentransportes der Atmungskette beschrieben (van den Bossche et al., 2016). M2-Makrophagen nutzen hingegen für ihre Energiegewinnung den Citratzyklus sowie eine gesteigerte β -Oxidation zum Fettsäureabbau (Viola et al., 2019). Im Gegensatz dazu zeigen M1-Makrophagen eine gesteigerte Lipid-Biosynthese, mit der Aktivierung

von sterol regulatory binding proteins (SREBPs), welche zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 führen (Im et al., 2011).

Ein zentrales Kennzeichen der Makrophagen-Polarisierung stellt der bereits kurz angeführte Arginin-Metabolismus dar. M1-Makrophagen zeigen eine erhöhte iNOS (inducible nitric oxide synthase) Expression und wandeln Arginin so in NO und Citrullin um. Demgegenüber haben M2-Makrophagen eine hohe Arginase-1/-2 Aktivität, wodurch Arginin zu Ornithin metabolisiert wird. Ornithin wiederum wird für die Prolin- und Polyaminsynthese und damit für die Kollagenbildung, Proliferation und Zelldifferenzierung benötigt (van den Berg et al., 2018; Rath et al., 2014; Durante et al., 2007).

Ein weiteres Beispiel für einen unterschiedlichen Aminosäure-Metabolismus ist Glutamin. Glutamin, eine proteinogene α -Aminosäure, wird von Makrophagen sowohl aufgenommen als auch bei M2- im Gegensatz zu M1-Makrophagen durch eine hohe Expression der Glutamin Synthetase (GS) selbst aus Glutamat und Ammoniak produziert. Palmieri et al. zeigten zudem, dass eine gesteigerte GS Aktivität ein Mediator der pro-angiogenetischen, immunsuppressiven und pro-metastatischen Funktionen der M2-Makrophagen darstellt (Palmieri et al., 2017). Während M1-Makrophagen Glutamin vorrangig über den γ -Aminobuttersäure-Shunt in den Citratzyklus einschleusen um Succinat zu bilden, nutzen M2-Makrophagen die Glutaminolyse um Glutamin in α -Ketoglutarat umzuwandeln, welches für die Atmungskette und β -Oxidation benötigt wird. Zudem inhibiert es durch Aktivierung der Prolyl-Hydroxylase den Hypoxie-induzierten Faktor HIF1 α (Thapa & Lee, 2019; Viola et al., 2019).

Die Betrachtung des Eisenstoffwechsels verdeutlicht ebenfalls den konträr laufenden Metabolismus der M1-/M2-Makrophagen. So zeigen M1-Makrophagen durch eine reduzierte Expression des Eisen-Exporters Ferroportin und eine Erhöhung des Eisenspeicherstoffes H-Ferritin eine erhöhte Akkumulation des essentiellen Spurenelementes und verringern dadurch das frei verfügbare Eisen, was einen bakteriostatischen Effekt bewirkt. M2-Makrophagen zeigen hingegen eine starke Ferroportin-Expression und eine unterdrückte H-Ferritin und Hämoxigenase Expression und haben somit einen sehr geringen intrazellulären Eisengehalt, da sie vermehrt Eisen freisetzen, welches das Wachstum benachbarter Zellen anregt und somit die Wundheilung, Gewebeumbauprozesse aber auch ein Tumorwachstum fördern kann (Recalcati et al., 2010, 2012, 2019).

1.3.2 Funktionen und Genexpression

Makrophagen sind überlebensnotwendig für den Menschen und alle Wirbeltiere (Mills & Ley, 2014). Unabhängig von ihrer Beteiligung in Entzündungsreaktionen übernehmen sie wichtige Funktionen zur Erhaltung der Homöostase und bei Gewebeumbauprozessen des Körpers.

Dies umfasst sowohl Prozesse der Ontogenese, wie bspw. die Phagozytose apoptotischer Zellen der mesenchymalen Zwischenräume der Zehen und Finger bei der Ausbildung der Extremitäten, als auch Vorgänge im Erwachsenenalter, wie z.B. beim Knochenumbau (Wynn et al., 2013). Bei ihrem Job als „universelle Reinigungskraft“ des Körpers, erfüllen Makrophagen ihre Aufgaben ohne oder zumindest nur mit einer minimalen Sekretion inflammatorischer Zytokine (Mosser & Edwards, 2008; Kono & Rock, 2008). Sie übernehmen eine Wächterfunktion im Gewebe und können Zelldebris, tote oder sterbende Zellen aber auch körperfremde Stoffe und Lebewesen durch ihre PRRs erkennen. Oberflächen-PRRs wie Toll-like Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren, C-Typ Lektin-Rezeptoren sowie intrazelluläre PRRs wie retinoic acid-inducible gene 1 (RIG1)-ähnliche Proteine und NOD-like Rezeptoren erkennen diese und können über die Kommunikation mit Phagozytose-Rezeptoren die Phagozytose initiieren (Murray & Wynn, 2011; Geissmann et al., 2010a).

Eine zentrale Rolle haben Makrophagen aber auch bei Entzündungsreaktionen, bei denen sie wie bereits kurz geschildert verschiedenste Aktivierungszustände annehmen können. Modellhaft stehen sich dabei zwei Extreme in ihren Funktionen konträr gegenüber: die proinflammatorisch wirkenden M1-Makrophagen auf der einen Seite und die antiinflammatorischen und heilungsfördernden M2-Makrophagen auf der anderen Seite. Zwischen diesen Extremen existiert jedoch ein ganzes Kontinuum an funktionellen sowie phänotypischen Variationen (Sica & Mantovani, 2012; Mosser & Edwards, 2008). Zu den zentralen Unterscheidungsmerkmalen zählt zum einen der oben bereits genannte Arginin-Metabolismus und zum anderen die Stimulierung der T-Zell-Antwort (Mills & Ley, 2014; Mills et al., 2000). So zeigen M1-Makrophagen ihre proinflammatorische Funktion und fördern die Th1-Antwort. Sie setzen große Mengen inflammatorischer Mediatoren frei, wie CXCL9, CXCL10, IL-12, IL-23, TNF- α , IFN- β und iNOS, welche u.a. T-Zellen zur Produktion von Th1-stimulierenden Zytokinen (z.B. IFN- γ) anregen und dadurch zytotoxische T-Zellen aktivieren sowie gleichzeitig mehr M1-Makrophagen generieren (Mills & Ley, 2014; Biswas & Mantovani, 2010). Sowohl M1- als auch M2-Makrophagen sind phagozytotisch aktiv, wobei M1-Makrophagen phagozytierte Pathogene innerhalb weniger Stunden mit Hilfe verschiedenster ROS und NO abtöten können und eine starke und effiziente Antigen-Präsentation zeigen (Mills & Ley, 2014; de Oliveira-Junior et al., 2011). Über die Produktion von IL-1 und TNF werden zusätzlich Th17-Zellen und neutrophile Granulozyten rekrutiert. Zudem locken sie auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an und steigern deren Aktivität durch Sekretion der Zytokine IL-2, IL-12 und IFN- α (Bryceson et al., 2006). Makrophagen spielen zusätzlich auch bei der Onkogenese eine Rolle. M1-Makrophagen haben dabei durch die Produktion von NO eine tumorhemmende Wirkung im Gegensatz zu den u.a. aufgrund ihrer Ornithinproduktion tumorfördernden M2-Makrophagen (Mills et al., 1992). Intrazelluläre Pathogene wie Protozoen aber auch Bakterien und Viren werden durch M1-Makro-

phagen effizient abgetötet. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Freisetzung von proinflammatorisch wirkenden Interferonen, wie bspw. IFN- γ durch Th1-Zellen, da sie zur Verstärkung der intrazellulären Immunität bei Wirbeltieren durch eine Aktivierung der Interferon-stimulierten Gene führen, deren Funktion jedoch noch nicht komplett aufgedeckt ist (MacMicking, 2012; Biswas & Mantovani, 2010; Stempin et al., 2010).

Konträr dazu übernehmen M2-Makrophagen immunregulatorische Aufgaben und zeigen einen IL-10^{high}, TGF- β ^{high} und IL-12^{low} antiinflammatorischen Phänotyp (Martinez & Gordon, 2014). Sie fördern durch Ausschüttung verschiedener Chemokine (CCL17 (Mensch und Maus); CCL18 (Mensch); CCL22, -24 (Maus)) die Th2-Immunantwort indem sie T-Zellen zur Produktion von IL-4 und TGF- β anregen, so die Antikörperproduktion durch B-Zell-Proliferation stimulieren und für eine weitere IL-10-Ausschüttung sorgen (Murray et al., 2014; Mills & Ley, 2014). Sie sind für die Wundheilung essentiell und an vielen Gewebeumbauprozessen beteiligt. Durch ihre Sekretion von IL-8 und verschiedenen VEGFs, wie VEGF-A und -C und des epidermalen Wachstumsfaktors (Epidermal Growth Factor, EGF), übernehmen sie pro-angiogenetische und lymphangiogenetische Funktionen, fördern zugleich jedoch auch die Tumorprogression und Metastasierung (Biswas & Mantovani, 2010; Fantin et al., 2010; Lin et al., 2006). Sie haben große Mengen an Oberflächen-PRRs z.B. Scavenger-Rezeptoren aber auch C-Typ Lektin-Rezeptoren (Calcium abhängige Glykorezeptoren) wie Mannose- oder Galaktose-Rezeptoren und können somit sowohl Bakterien als auch tote Zellen binden und anschließend aufnehmen (Sica & Mantovani, 2012). Sie sind bei Allergien sowie beim Einkapseln und Entfernen von Parasiten beteiligt, können aber auch das intrazelluläre Überleben und die Proliferation von Parasiten und anderen Pathogenen fördern, da sie die Th1-Immunantwort hemmen (Stempin et al., 2010).

1.3.3 Makrophagenmarker

Wie bereits angedeutet stehen viele Erkrankungen in einem engen Zusammenhang mit einer übermäßigen Polarisierung der Makrophagen hinzu M1 oder M2, wie es im nächsten Abschnitt „Polarisierung und Pathologie -M1/M2-assozierte Erkrankungen“ noch ausführlicher dargelegt wird. Grundstein für eine selektive immunmodulatorische Therapie dieser ist demnach eine genaue deskriptive Darstellung der unterschiedlichen Makrophagen-Phänotypen und Funktionen in situ. Die Nutzung spezifischer Oberflächenmarker zur Phänotypisierung von Zellen stellt ein klassisches Differenzierungskriterium dar. Mittels der Durchfluss- und Massenzytometrie konnten zwar bislang zahlreiche Oberflächenmarker der Makrophagen detektiert we-

den, jedoch erlauben diese Analyse keine bis wenig Aussagen zu den genauen Gegebenheiten in den jeweiligen Organen. Zusätzliche Informationen, wie z.B. die genaue Verteilung der Phänotypen, bleiben dabei weitgehend im Verborgenen. Beispielsweise befinden sich bei tuberkulösen Granulomen M1-Makrophagen vorrangig zentral im Granulom in der Nähe lebensfähiger Mykobakterien, wohingegen M2-Makrophagen eher peripher gelegen sind (Mattila et al., 2013). Zudem sind Gewebsmakrophagen sehr fragil und nur schwer aus soliden Organen zu isolieren (Geissmann et al., 2010b). Die Immunhistochemie (IHC) und die Immunfluoreszenz (IF) erlauben dagegen eine Analyse und Darstellung der Phänotypen *in situ*. Die Färbequalität wird jedoch von vielen Faktoren, wie z.B. unterschiedlichen Fixierungsbedingungen stark beeinflusst. Gleichwohl rückt v.a. die Darstellung der *in vivo* Situation wieder zunehmend in das Interesse der Makrophagen-Forschung. Die *in vitro* Generierung von Makrophagen mit Hilfe selektiver Stimuli (meist M-CSF) ist als stark artifiziell zu werten, da *in vivo* keine Vorläuferzelle einem einzigen isolierten Stimulus ausgesetzt ist und auch keine eindeutigen Entsprechungen zu diesen stimulierten Zellen *in vivo* existieren. Zudem können *in vitro* Analysen auch zu artifiziellen Ergebnissen führen, so zeigen z.B. Kupffer Zellen kein CD11b (Integrin α -M) *in situ*. Hält man sie in der Zellkultur exprimieren sie CD11b jedoch bereits nach kurzer Zeit. Ein weiteres Beispiel hierfür zeigt sich bei den *in vivo* runden und nur schwach adhärennten Alveolarmakrophagen, die in der Zellkultur durch die Adhärenz an der Zellkulturkunststoffplatte eine starke Änderung ihrer Morphologie aufweisen. Dies verdeutlicht die Relevanz und Notwendigkeit für *in situ* Analysen (Geissmann et al., 2010b). Die meisten Oberflächenmarker, die *in vitro* detektiert wurden, können jedoch nicht auf *in vivo* Situationen angewendet werden und zuverlässige *in vivo* Marker müssen erst noch entdeckt werden (Orecchioni et al., 2019).

Erschwerend kommt hinzu, dass sich die Makrophagen verschiedener Organe (z.B. Lunge, Gehirn, Roter Milzpulpa und Peritoneum) bei Mäusen stark unterscheiden wie Gautier et al. in ihrer Genexpressions-Studie zeigen konnten. Sie fanden nur einige Hundert mRNA-Transkripte, die für Makrophagen explizit waren und somit auch die Abgrenzung dendritischer Zellen erlaubten. Viele davon konnten aber nicht in allen Organen nachgewiesen werden. Als spezifische und universelle Makrophagenmarker identifizierten sie Mer tyrosine kinase (MerTK) und CD64, sowie neue Marker wie TCEF3, C/EBP α , BACH1 und CREG-1 (Gautier et al., 2012). Neben universellen Pan-Makrophagen-Markern, die alle Subtypen erfassen sollen, sind M1-/M2-spezifische Marker von großem Interesse. Jedoch zeigt sich auch hier ein nicht einheitlicher Gebrauch der Marker. So beschrieben beispielsweise Zizzo et al. MerTK als spezifischen Marker für M2c Makrophagen und konnten ihn nicht in allen Makrophagen-Subtypen nachweisen. Ihre Studie fand im Gegensatz zur *ex vivo* Maus-Studie von Gautier et al. *in vitro* an humanen, von peripheren Blutmonozyten abgeleiteten und mit M-CSF oder GM-CSF differenzierten Makrophagen statt, die anschließend mit IFN- γ (M1) bzw. IL-4, IL-10, TGF- β oder Dexamethason (M2) stimuliert wurden (Zizzo et al., 2012). Dieses Beispiel verdeutlicht die

Schwierigkeiten bei der Translation von Forschungsergebnissen von *in vitro* auf *in vivo* sowie zwischen verschiedenen Spezies.

Im Folgenden wird näher auf die im Rahmen dieser Dissertation intensiver untersuchten Marker CD68, Arg1 (Arginase 1), iNOS und CD163 eingegangen.

1.3.3.1 *CD68*

CD68 ist ein wertvoller Monozyten- und Makrophagenmarker, der standardmäßig und häufig verwendet wird (Murray & Wynn, 2011). Als orthologer Vertreter des CD68 ist bei der Maus das Macrosialin bekannt, welches sehr eng mit CD68 verwandt ist und in seiner Aminosäuresequenz zu 80,6% mit seinem humanen Vertreter übereinstimmt. Neben Monozyten und Makrophagen kommt CD68 auch auf dendritischen Zellen vor. In sehr geringen Mengen konnte es bei Menschen auch auf lymphoiden Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen und auch auf Tumorzellen detektiert werden (Chistiakov et al., 2017; Ferenbach & Hughes, 2008; Gottfried et al., 2008). Die genaue Funktion und Rolle von CD68 im Rahmen von Entzündungen bzw. seine Beteiligung am Immunsystem ist noch unbekannt. Eine Rolle bei der Verarbeitung und Präsentation von Antigenen wird diskutiert. CD68 bindet *in vitro* oxidierte low-density Lipoproteine, Phosphatidylserine, welche Bestandteile biologischer Membranen sind, sowie apoptotische Zellen. CD68 ist mit 85-90% größtenteils intrazellulär in Endo- und Lysosomen lokalisiert, wird jedoch schnell an die Oberfläche geleitet (Chistiakov et al., 2017). Es wird bei Mäusen in hohen Mengen von Alveolarmakrophagen sowie dendritischen Zellen exprimiert und in etwas geringeren Mengen auch von interstitiellen Lungenmakrophagen sowie Monozyten (Zaynagetdinov et al., 2013). Zudem konnten Barros et al. zeigen, dass nicht alle Makrophagen immer positiv für CD68 sind, sodass seine alleinige Verwendung zu einer Unterschätzung der wahren Makrophagenanzahl führen kann (Barros et al., 2013).

1.3.3.2 *Arg1*

Die Expression von Arginase wird als ein Hauptkriterium der M2 Polarisierung der Makrophagen angesehen, sodass sie auch als Marker vielfache Verwendung findet (Palmieri et al., 2017; Semba et al., 2016; van den Bossche et al., 2016; Porta et al., 2015; Röszer, 2015; Martinez & Gordon, 2014; Veremeyko et al., 2013; Sica & Mantovani, 2012; Biswas & Mantovani, 2010; Satoh et al., 2010). Makrophagen exprimieren Arginase um Arginin in Ornithin und Harnstoff zu hydrolysieren. Da Ornithin eine Vorstufe des Prolins darstellt, welches essentiell für die Kollagensynthese ist, kommt der Aktivierung der Arginase-Expression eine zentrale Rolle bei Gewebsumbauprozessen zu. So konnten auch in verschiedenen Studien

erhöhte Arginase Werte in fibrotischen Arealen nachgewiesen werden, z.B. in einem murinen Herpesvirus-assoziierten progressiven Lungenfibrose-Modell, bei humanen fibrotischen Lungenerkrankungen und Asthma (Rath et al., 2014; Maarsingh et al., 2011; Kitowska et al., 2008; Mora et al., 2006).

Arginase reguliert und verringert zudem auf verschiedene Weise die Produktion von NO, indem sie z.B. um das Substrat L-Arginin mit NOS konkurriert, durch die Produktion von Harnstoff die iNOS-Aktivität hemmt und die Stabilität und Translation des iNOS Proteins reduziert bzw. unterdrückt (Durante et al., 2007). Es existieren 2 Isoenzyme der Arginase in Säugetieren, Arginase 1 und 2, die die gleiche biochemische Reaktion katalysieren, aber in unterschiedlichen zellulären sowie intrazellulären Lokalisationen vorkommen und auch unterschiedlich reguliert werden. Arginase 1 kommt in größeren Mengen zytosolisch in den Hepatozyten vor und ist dort wichtiger Bestandteil des Harnstoffzyklus, zudem konnte bei Ratten gezeigt werden, dass es im Pankreas und in geringen Mengen auch im ZNS, Magen, Darm, Niere, Lunge (hier in Alveolarmakrophagen, Alveoli und Bronchialepithel) und Milz nachweisbar war (Choi et al., 2012).

Arginase 2 hingegen ist in den Mitochondrien verschiedener Organe in geringeren Mengen nachweisbar, besonders in den Nieren, der Prostata, dem Dünndarm und in laktierenden Milchdrüsen (Munder, 2009). Makrophagen exprimieren beide Isoenzyme (Mori et al., 1998). Kung et al. beschrieben 1977 erstmals die Unterdrückung der zytotoxischen Immunantwort durch Makrophagen mit einer erhöhten Arginase-Aktivität und konsekutiv stark reduzierten Gehalt an Arginin im Microenvironment bei murinen Zellkulturversuchen (Kung et al., 1977). IL-4/IL-13, IL-10 und TGF- β erhöhen die Arg1 Expression in humanen und murinen Makrophagen (Eapen et al., 2017; Röszer, 2015; Munder et al., 1998). Arg1 wird demnach üblicherweise eine antiinflammatorische und heilungsfördernde Wirkung zugeschrieben, jedoch gibt es auch Berichte über eine proinflammatorische Aktivität im Zusammenhang mit autoimmunen Entzündungen des ZNS, wie anhand von Versuchen im Rückenmark von Mäusen in einem experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis-Modell oder aber in den Glia und Mikroglia bei einem endotoxininduzierten (LPS) Uveitis-Modell dargestellt werden konnte (Röszer, 2015; Zhang et al., 2009; Xu et al., 2003).

Die Expression von Arg1 wird in M2-Makrophagen durch die Th2-assoziierten STAT6-Proteine (Signal Transducers and Activators of Transcription) initiiert. Zusätzlich entdeckten Kasmi et al. 2006 eine von STAT6-unabhängige und durch intrazelluläre Pathogene wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Toxoplasma gondii* ausgelöste Aktivierung der Arg1 Expression in Makrophagen über eine Aktivierung des Toll-like-Rezeptor-Adaptor Proteins MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88) und STAT3 Aktivierung. Dabei konnten sie auch zeigen, dass die Aktivierung von Arg1 für das Überleben der Pathogene vorteilhaft war und diese den TLR-pathway als immunologisches Schlupfloch für sich nutzen (El Kasmi et al., 2008). Demnach

werteten Murray und Wynn Arg1 als Kontext-abhängigen Marker, der sowohl über den STAT6 als auch STAT3 pathway, sowie durch intrazelluläre Pathogene induziert werden kann (Murray & Wynn, 2011). Barros et al. wiesen zudem daraufhin, dass bislang kein bekanntes Antigen als ein single-Marker für polarisierte Makrophagen identifiziert werden konnte, sodass auch die alleinige Verwendung von Markern wie Arg1, iNOS oder CD163 nur eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt, da das Antigen auch von anderen Zellen exprimiert werden kann (Barros et al., 2013). Zudem exprimieren auch nicht alle M2-Subtypen Arg1 gleichermaßen, wobei in der Literatur hierzu variable Angaben zu finden sind. Röszer et al. zählen Arg1 als Marker für M2a und gewebsständige M2-Makrophagen, Wang et al. für M2a und M2c. Gensel et al. nennen Arg1 jedoch nur als Marker für M2a und beschreiben zusätzlich eine Reduzierung von Arg1 bei M2c (Wang et al., 2019a; Gensel & Zhang, 2015; Röszer, 2015), sodass es in diesem Feld noch weiterer Forschung bedarf (Murray et al., 2014).

1.3.3.3 *iNOS*

iNOS ist ein anerkannter und häufig verwendeter Marker für M1-Makrophagen und klassisch aktivierte Makrophagen (Wang et al., 2019a; Orecchioni et al., 2019; Eapen et al., 2017; Gensel & Zhang, 2015; Mills & Ley, 2014; Biswas & Mantovani, 2010). M1-Makrophagen exprimieren iNOS um L-Arginin in reaktives NO und L-Citrullin umzuwandeln. Neben iNOS, welches auch auf Epithelzellen von Colon und Lunge und in Hepatozyten vorkommt, können noch zwei weitere, dauerhaft exprimierte Isoenzyme von NOS unterschieden werden: die endotheliale NOS (eNOS) in den Blutgefäßen und neuronale NOS (nNos) in inhibitorischen, nonadrergen, noncholinergen Neuronen. Die 3 Enzyme katalysieren die gleiche Reaktion, unterscheiden sich jedoch in ihrer Verteilung, Regulierung, Syntheseleistung und Struktur (van den Berg et al., 2018; Rath et al., 2014). NO hat eine starke zytotoxische und zytostatische Wirkung. Es ist klein, sehr lipophil und kann so biologische Membranen durchdringen und dient damit als primärer und effektiver Schutzmechanismus der Makrophagen gegen Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten und Tumorzellen. Jedoch ist NO in seiner Wirkung nicht sehr spezifisch, sodass Kollateralschäden an gesunden, umliegenden Wirtszellen bei der Abwehr der Pathogene billigend in Kauf genommen werden. Die streng regulierte Steuerung der Expression der NOS ist demnach essentiell um schwere Schäden am Wirt zu vermeiden. Eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration führt zur Aktivierung von nNOS und eNOS, welche anschließend relativ geringe Mengen an NO produzieren und somit wichtige Funktionen für die Erhaltung der Homöostase eines gesunden Wirts-Organismus, wie bspw. die Blutdruckregulierung übernehmen. iNOS hingegen setzt nach ihrer calciumunabhängigen Aktivierung

durch proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , IL-1 β oder TNF- α , LPS und Hypoxie aufgrund ihrer hohen Synthesekapazität in kurzer Zeit große Mengen an NO frei (van den Berg et al., 2018; MacMicking et al., 1997; Modolell et al., 1995). Antiinflammatorische Zytokine wie TGF- β , IL-4 und IL-10 unterdrücken hingegen die Expression von iNOS (Rath et al., 2014; Modolell et al., 1995).

In murinen Modellen ist die proinflammatorische Bedeutung der iNOS in Makrophagen vielfach untersucht und belegt, beim Menschen hingegen wird ihre Rolle noch kontrovers diskutiert, da humane Makrophagen nach einer entsprechenden Stimulierung deutlich geringere Mengen an iNOS exprimieren. Gross et al. führten dies auf eine epigenetische Unterdrückung der Expression durch starke Methylierung zurück (Gross et al., 2014). Jedoch konnte beispielsweise bei einer Studie in der die bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF) von Tuberkulose-Patienten untersucht wurde bei 65% der Alveolarmakrophagen eine iNOS-Expression detektiert werden, im Gegensatz dazu zeigten sich nur 10% der Alveolarmakrophagen iNOS positiv bei der gesunden Kontrollgruppe (Nicholson et al., 1996). Es bedarf demnach weiterer Forschungen um die Funktion und Bedeutung von iNOS beim Menschen zu klären.

1.3.3.4 *CD163*

CD163 ist ein membranständiges Protein, welches zur Gruppe B der scavenger receptor cystein-rich superfamily gehört und als exklusiver Marker für Makrophagen und Monozyten gilt. Makrophagen in verschiedensten Organen (Lunge, Leber, Rote Milzpulpa, Thymus, Lymphknoten, Gehirn, Haut) exprimieren CD163 in einem hohen Maß. Außerdem konnte es bei unter 50% der peripheren Blut-Monozyten in geringen bis moderaten Mengen nachgewiesen werden (Sulahian et al., 2000). Zusätzlich berichten Maniecki et al. von einigen wenigen CD163-positiven, monozytär-abgeleiteten, humanen dendritischen Zellen und van den Heuvel et al. im geringen Umfang von schwach positiven Signalen bei reifen dendritischen Zellen des Blutes beim Menschen (Maniecki et al., 2006; van den Heuvel et al., 1999).

CD163 ist ein multi-ligand-scavenger Rezeptor, der neben Hämoglobin-Haptoglobin (Hb-Hp)-Komplexen auch TWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis) Protein, grampositive und gramnegative Bakterien sowie einige Viren binden kann und somit wichtige immunmodulatorische Eigenschaften hat (Kneidl et al., 2012; Fabrick et al., 2007). Insbesondere der spezifischen Bindung der Hb-Hp-Komplexe wird eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben, da dabei reaktives, proinflammatorisch wirkendes, freies Hb gebunden wird und es zusätzlich zur Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 kommt (Philippidis et al., 2004).

Eine vermehrte Aktivierung von CD163 konnte in der späten antiinflammatorischen Phase bei akuten und chronischen Entzündungen nachgewiesen werden (Moestrup & Moller, 2004; Zwadlo et al., 1987). So ordnet auch Mosser et al. CD163 als Marker für „alternativ aktivierte“ Makrophagen ein (Mosser, 2003). Zudem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass IL-6, IL-10 und Glucocorticoide zu einer verstärkten Expression von CD163 führen, wohingegen proinflammatorische Signale wie LPS, IFN- γ und TNF- α die Expression unterdrücken (Gaïni et al., 2008; Buechler et al., 2000; van den Heuvel et al., 1999; Högger et al., 1998). Mantovani et al. und Murray et al. ordnen CD163 als M2-Marker ein (Murray et al., 2014; Mantovani et al., 2002). Eine spezifischere Zuordnung wird von Röszer genannt, er führt CD163 als Marker für M2a, M2c, TAM, residente M2-Gewebsmakrophagen und sog. atypische Makrophagen an, die durch Mykobakterien oder IL-33 stimuliert werden (Röszer, 2015). Alvarado-Vazquez et al. vermuten sogar, dass CD163 einen starken Einfluss auf den Phänotypenwechsel humaner Makrophagen von M1 hinzu M2 nimmt (Alvarado-Vazquez et al., 2017). Jedoch wird eine eindeutige Zuordnung des Markers CD163 für M1- oder M2-polarisierte Makrophagen teils auch kontrovers diskutiert, da für CD163 auch proinflammatorische Eigenschaften beschrieben sind. Beispielsweise kann CD163 Bakterien detektieren und lokale Entzündungsprozesse durch eine gesteigerte Produktion von TNF- α initiieren (Fabriek et al., 2009). Barros et al. wiesen in ihrer Studie nach, dass CD163-positive Zellen sowohl bei Th1-dominierten Erkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn, als auch bei Th2-dominierten Erkrankungen, wie z.B. Wundheilungsprozessen oder Fremdkörpergranulomen, nachgewiesen werden konnten und CD163 somit nicht als verlässlicher Marker für M2 angesehen werden kann, wenn er einzeln eingesetzt wird (Barros et al., 2013).

1.3.3.5 *Weitere Makrophagen-Marker*

In der Tabelle 1 sind alle Antikörper gelistet, die im Rahmen dieses Dissertationsprojektes getestet wurden. Sie wurden vielfach in der Literatur als Makrophagen-Marker verwendet, wobei sich jedoch teilweise auch kontroverse Angaben hinsichtlich ihrer Spezifität ergaben, die ebenfalls in der Tabelle dargestellt sind.

Tabelle 1: In der Literatur publizierte Makrophagen-Marker

Marker	publiziert als / spezifisch für	Quelle
CD68	Pan-Marker	(Garaicoa-Pazmino et al., 2019; Gordon et al., 2014; Wynn et al., 2013; Badylaket al., 2008; Gottfried et al., 2008; Biswas, 2006)
	M1	(Shapouri-Moghaddam et al., 2018)
F4/80 (murin)	Pan-Marker (humanes Ortholog „EMR1“ aber nur auf eosinophilen Granulozyten)	(Wynn et al., 2013; Geissmann et al., 2010b; Hamann et al., 2007; Biswas, 2006)
MHCII	M1, M2a und M2b	(Röszer, 2015; Martinez & Gordon, 2014; Lech & Anders, 2013; Hao et al., 2012)
	M1	(Shapouri-Moghaddam et al., 2018)
MerTK	Pan-Marker, Mac-spezifisch (ex vivo murin)	(Gautier et al., 2012)
	Nur M2c (in vitro human)	(Zizzo et al., 2012)
iNOS	M1	(Garaicoa-Pazmino et al., 2019; Wang et al., 2019a; Orecchioni et al., 2019; Eapen et al., 2017; Gensel & Zhang, 2015; Mills & Ley, 2014; Biswas & Mantovani, 2010)
CD80	M1	(Viniestra et al., 2018; Mills & Ley, 2014; Mantovani et al., 2002)
CD86	M1	(Mills & Ley, 2014; Mantovani et al., 2002)
	M1 und M2b	(Wang et al., 2019a; Röszer, 2015; Martinez & Gordon, 2014)
CCR7	M1	(Jablonski et al., 2015; Martinez et al., 2006; Mantovani et al., 2002)
SOCS3	M1	(Wilson, 2014; Murray & Wynn, 2011; Whyte et al., 2011; Liu et al., 2008)
Arg1	M2	(Palmieri et al., 2017; Semba et al., 2016; van den Bossche et al., 2016; Jablonski et al., 2015; Porta et al., 2015; Röszer, 2015; Martinez & Gordon, 2014; Veremeyko et al., 2013; Sica & Mantovani, 2012; Biswas & Mantovani, 2010; Satoh et al., 2010)
	M2a	(Gensel & Zhang, 2015)
	M2a und residente Gewebsmakrophagen	(Röszer, 2015)
	M2a und M2c	(Wang et al., 2019a)
CD163	M2	(Murray et al., 2014; Mantovani et al., 2002)
	M2c:	(Wang et al., 2019a)
	M2a, M2c, TAM, residente M2-Gewebsmakrophagen, atypische Makrophagen*	(Röszer, 2015)
SOCS1	M1 (human)	(Martinez & Gordon, 2014)
	M2 (murin in vitro + vivo)	(Whyte et al., 2011)
SOCS2	M2	(Jablonski et al., 2015; Wilson, 2014; Murray & Wynn, 2011)
CD206	M2a (human)+ M2c (human und murin)	(Wang et al., 2019a)
	M2a, M2c, TAM, residente Gewebsmakrophagen	(Röszer, 2015)
	M2	(Beljaars et al., 2014; Mills & Ley, 2014; Martinez et al., 2006; Mantovani et al., 2002)
TGM2	M2	(Martinez & Gordon, 2014; Beljaars et al., 2014)
	M2a	(Röszer, 2015)
	Alternativ aktivierte Mac	(El Kasmī et al., 2014)

Fortsetzung Tabelle 1: In der Literatur publizierte Makrophagen-Marker

Marker	publiziert als / spezifisch für	Quelle
Ym1/2	M2 (mouse, in vitro + vivo)	(Raes et al., 2002)
	M2 (mouse, in vitro + vivo, (IL4/IL13)	(Martinez & Gordon, 2014; Beljaars et al., 2014; Sica & Mantovani, 2012; Gordon, 2003)
	M2a (IL4)	(Mosser & Edwards, 2008)
	M2a(IL4) und atypische Makrophagen*	(Röszer, 2015)
pSTAT6	Alternativ aktivierte Mac	(El Kasmi et al., 2014)
	M(IL4)	(Murray et al., 2014; Martinez & Gordon, 2014; Sica & Mantovani, 2012; Welch et al., 2002)
pSTAT3	M2c	(Wynn & Vannella, 2016; Murray et al., 2014; Martinez & Gordon, 2014)
	M(IL-10) (mouse)	(Sica & Mantovani, 2012)
RELM- α	M2	(Martinez & Gordon, 2014)
	M2a	(Röszer, 2015)
	Alternativ aktivierte Mac	(Wynn & Barron, 2010; Nair et al., 2009)

Abkürzungen: CCR7 (C-C-Chemokinrezeptor Typ 7), EMR1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor 1), Mac (Makrophagen), Suppressors Of Cytokine Signaling (SOCS), MHC II (major histocompatibility complex), pSTAT3/6 (phosphorylated Signal Transducers and Activators of Transcription 3/6), RELM- α (Resistin-like Molecule alpha), TAM (Tumor associated Macrophage), TGM2 (Transglutaminase 2),
 *atypische Gewebsmakrophagen: aktiviert durch Stimulation mit IL-33 / Mykobakterien

Neben den in der Tabelle 1 genannten Markern sind in der Literatur noch viele weitere Marker, insbesondere für die unterschiedlichen Subtypen beschrieben. Dazu zählt als Pan-Marker: CD64; für M1: pSTAT 1 und 5, IL-1RI, TLR2, IRF5 (Interferon regulatory factor 5), IL-12^{high}, IL-23^{high}, TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL, CXCL, CD64; für M2a: Scavenger-Rezeptoren, Interleukin-1-Rezeptor, Polyamine, CCL, TGF- β ; für M2b: IL-1, IL-6, IL-10, CCL1, TNF- α ; für M2c: IL-10, TGF- β und für M2d: VEGF-A, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β (Klopffleisch, 2016; Röszer, 2015; Martinez & Gordon, 2014; Bain et al., 2013; Gautier et al., 2012).

1.4 Polarisierung und Pathologie -M1/M2-assoziierte Erkrankungen

Das Immunsystem des Körpers kann Pathogene effizient abwehren. Bei der Initiation und Erhaltung einer Entzündungsreaktion dominieren die proinflammatorisch wirkenden M1 -Makrophagen. Sie erkennen Pathogene und können große Mengen proinflammatorischer Zytokine sowie reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies freisetzen, welche eine hohe mikrobizide sowie zytotoxische Wirkung haben und so sowohl extra- als auch intrazelluläre Infektionserreger wirkungsvoll bekämpfen können, jedoch auch zum Untergang umliegender Wirtszellen führen. Eine strenge Regulierung der Makrophagenaktivität ist somit notwendig um eine übermäßige

Schädigung der Wirtszellen zu verhindern und die Entzündungsreaktion nach Beseitigung der Noxe zu beenden, sodass es im weiteren Verlauf zu einer zunehmenden Polarisierung hin zu den antiinflammatorischen und heilungsfördernden M2-Makrophagen kommt und die Gewebshomöostase wieder hergestellt werden kann (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Störungen bei diesem Phänotypen-Wechsel oder eine übermäßige und anhaltende Dominanz der M1- oder M2-Makrophagen konnten in den letzten zwei Jahrzehnten als Ursache oder als wichtiger Treiber der Pathogenese für immer mehr infektiöse sowie nicht-infektiöse Krankheiten nachgewiesen werden (Sica & Mantovani, 2012; Murray & Wynn, 2011; Laskin et al., 2011; Benoit et al., 2008). Dazu zählt beispielsweise eine übermäßige Aktivierung der M1-Makrophagen im Rahmen *E. coli* assoziierter schwerer Septikämien oder *Streptococccen* induzierter Pneumonien, die mit einer erhöhten Mortalität korreliert (Sica & Mantovani, 2012; Benoit et al., 2008; Smith et al., 2007). Jedoch kann auch eine verstärkte Induktion der M2-Makrophagen ebenso einen verheerenden Effekt mit sich bringen, indem sie beispielsweise das Überleben intrazellulärer Pathogene wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Toxoplasma gondii* fördern und es somit zu persistierenden Infektionen kommt. Die effektiven Abwehrmechanismen der M1-Makrophagen, insbesondere die Freisetzung von NO, werden dabei durch ein immunologisches Schlupfloch umgangen. Die Erreger lösen unter anderem über den Toll-like-Receptor-Pathway eine erhöhte (M2-typische) Arginase-Expression aus und verringern somit die NO-Produktion in den Makrophagen. Zudem konnte gezeigt werden, dass Arg-1-defizite Makrophagen in Knockout-Modellen verglichen mit dem Wildtypen eine verstärkte Eliminationsfähigkeit der genannten Erreger in vitro und in vivo besitzen (Montoya et al., 2019; Shi et al., 2019; Qualls et al., 2010; El Kasmi et al., 2008). Auch im Rahmen schwerer Verläufe der neu aufgetretenen SARS-Cov-2-Infektion (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2) werden Imbalance sowohl einer verstärkten M1-ähnlichen Makrophagen-Aktivität, die mit einer erhöhten, lebensbedrohlichen Zytokinausschüttung (sog. cytokine storm) einhergeht, als auch im weiteren Krankheitsverlauf eine erhöhte M2-ähnliche Makrophagen-Aktivität diskutiert, welche zu einer vermehrten Lungenfibrose und so einer dauerhaften Beeinträchtigungen überlebender Patienten führt (Gracia-Hernandez et al., 2020).

Ein anderes Beispiel einer M1-assoziierten Pathologie stellt der Nachweis einer übermäßigen Einwanderung und Aktivierung von M1-Makrophagen bei adipösen Mäusen und Menschen im Fettgewebe dar, welche mit einer erhöhten Produktion von TNF- α und iNOS einhergeht. TNF- α induziert in Adipozyten eine Insulin-Resistenz, sodass es zu metabolischen Störungen wie Obesitas-assoziierten Entzündungen und Diabetes kommen kann. Residenten Fettgewebs-Makrophagen der nicht-adipösen Kontrollgruppen zeigen im Gegensatz dazu einen betonten antiinflammatorischen M2-Phänotyp, der mit einer verstärkten Expression von IL-10, Arg-1 und Ym1 einhergeht, wobei insbesondere IL-10 einen protektiven Effekt auf die Adipozyten hat

und so die Insulin-Sensitivität fördert (Peterson et al., 2018; Sica & Mantovani, 2012; Murray & Wynn, 2011; Lumeng et al., 2007).

Bei einigen anderen Pathologien wird die genaue Beteiligung der Subtypen derzeit noch kontrovers diskutiert, wie beispielsweise beim Asthma, bei dem M2-Makrophagen sowohl schädigende als auch schützende Wirkungen zugeschrieben werden (Murray & Wynn, 2011).

In der Literatur finden sich darüber hinaus zahlreiche weitere M1/M2-assoziierte Pathologien wie z.B. die Tumorentstehung, auf die bereits zuvor an anderen Stellen kurz eingegangen wurde oder aber auch Atherosklerose, Arthritis, Allergien, atopische Dermatitis, Herzinfarkte und Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn oder Multiple Sklerose (Cheng & Rong, 2018; Sica & Mantovani, 2012).

Die vielfältige Beteiligung der Subtypen bei zahlreichen Pathologien verdeutlicht auch die klinische Relevanz der Makrophagenphänotypisierung, da sich so sowohl neue prognostische Marker als auch neue therapeutische Ansätze bieten (Anders et al., 2019; Mills et al., 2016; Sica & Mantovani, 2012). Insbesondere immunmodulatorische Medikamente, die eine gezielte Phänotypen-spezifische Wirkung haben, sind dabei in das Interesse der Forscher gerückt. Wobei neben der durch Apoptose ausgelösten gezielten Depletion der Makrophagen, besonders eine Steuerung der Zytokinproduktion beispielsweise durch gene silencing (Gen-Stilleung) oder Modifikation der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden vielversprechend erscheinen (Peterson et al., 2018).

1.5 Lungenmakrophagen

Das Immunsystem der Lunge ist über die Atemluft einer kontinuierlichen Exposition zur Außenwelt ausgesetzt. Residente Lungenmakrophagen bilden dabei die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen inhalierte Pathogene und Partikel (Morales-Nebreda et al., 2015). Sie können Pathogene und zellulären Debris entfernen und verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernieren. Dabei können sie starke Entzündungsprozesse induzieren um pathogene Erreger zu eliminieren. Andererseits ist insbesondere ihre antiinflammatorische Wirkung für die Erhaltung der Lungenfunktion unerlässlich, da sie eine Vielzahl an inhalierten Partikeln entfernen, ohne dass es dabei zu entzündlichen Prozessen kommt, sodass durch ihre Beteiligung an der Immuntoleranz der effektive Gasaustausch sichergestellt wird (Patel & Metcalf, 2018). Sie sezernieren antiinflammatorisch wirkende Prostaglandine sowie TGF- β , welche die T-Zellaktivierung hemmen und fördern zusätzlich die Generierung von Foxp3+ (forkhead box P3) regulatorischer T-Zellen (Treg), die eine Aktivierung des Immunsystems unterdrücken und so zur Immuntoleranz beitragen (Hussell & Bell, 2014; Soroosh et al., 2013).

Residente Lungenmakrophagen lassen sich grundsätzlich anhand ihrer Lokalisation, Morphologie und Funktion in zwei große Untergruppen einteilen: größere Alveolarmakrophagen (AM) und kleinere interstitielle Makrophagen (IM). AM sind in den Lumina der Alveolen lokalisiert und unter homöostatischen Bedingungen zahlenmäßig stärker vertreten (ca. doppelt bis dreimal mehr) als IM (Ardain et al., 2020; Reddy & Mehta, 2017). Sie können zudem weiter unterteilt werden in bewegliche und festhaftende AM, wie die Forschergruppe von Westphalen et al. in situ mittels real time alveolar imaging darstellen konnte. Dabei kommt den beweglichen AM eine Sentinel-Funktion zu. Sie patrouillieren zwischen den Alveolen und induzieren bei Kontakt mit pathogenen Antigenen starke Entzündungsreaktionen. Im Gegensatz dazu stehen die am Alveolarepithel anhaftenden AM im ständigen kommunikativen Austausch mit den Epithelzellen und unterdrücken Immunreaktionen (Westphalen et al., 2014). IM hingegen können im bronchialen Interstitium lokalisiert werden, sind weniger phagozytotisch aktiv, haben aber ebenfalls wichtige immunregulatorische Funktionen. So konnte Bedoret et al. zeigen, dass IMs durch hohe IL-10-Sekretionen eine von den dendritischen Zellen ausgelöste Th2-Immunantwort unterdrücken und so die Entwicklung von allergischem Asthma hemmen. Die DZ wurden dabei zuvor mit geringen LPS-Konzentrationen und harmlosen Antigenen in der Luft konfrontiert. Zudem führte auch eine in vivo Elimination der IMs zu verstärkten asthmatischen Reaktionen (Bedoret et al., 2009).

Neben funktionellen Unterschieden konnten verschiedenste Marker zur Phänotypisierung von AM und IM identifiziert werden, wobei murine AM u.a. durch einen CD11c+, CD11b- CD16-, CD200R+, CD169+, CD206+ und IM durch einen CD11c-, CD11b+, CD16+, CD200R+, CD169-, CD206+ Phänotyp gekennzeichnet sind (Patel & Metcalf, 2018; Hussell & Bell, 2014). IMs können zudem in 3 weitere Subgruppen unterteilt werden: IM1 (CD206+MHCII-), IM2 (CD206+MHCII+) und IM3 (CD206-CD11c+) (Gibbins et al., 2017).

Sowohl AM als auch IM können sich stammzellähnlich selbst erneuern, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. AM sind unter homöostatischen Bedingungen relativ langlebig, zeigen im Gegensatz zu IM nur eine geringe turnover rate von ca. 40 % im Jahr und erneuern sich unabhängig von Monozyten oder hämatopoetischen Vorläuferzellen (Hashimoto et al., 2013; Maus et al., 2006). Bei akuten Schädigungen der Lunge kann es jedoch zu einer vermehrten Einwanderung zirkulierender Monozyten kommen, die sich zu AM differenzieren. So wurden beispielsweise bei C57BL/6J Mäusen 2 Monate nach einer intratrachealer LPS Behandlung bis zu 85% der residenten AM-Population durch monozytär-abgeleitete AM ersetzt (Cai et al., 2014; Maus et al., 2006). Die Population der IM hingegen wird unter homöostatischen Bedingungen zu einem Großteil durch einwandernde Blutmonozyten wieder aufgefüllt. Nur ein geringer Anteil an peripheren und perivaskulär lokalisierten IM leitet sich vom embryonalen Dottersack ab und kann sich selbst durch Teilung erneuern (Ardain et al., 2020; Tan & Krasnow, 2016; Cai et al., 2014).

In der Lungenforschung stellt die Analyse der BALF eine häufige und routinemäßig eingesetzte Untersuchungsmethode dar. Jedoch muss dabei bedacht werden, dass die Makrophagen in der Lavage-Probe aufgrund der anatomischen Lokalisation nur die AM enthalten und somit die heterogene Makrophagenpopulation der Lunge nicht widerspiegeln (Morales-Nebreda et al., 2015; Cai et al., 2014). Forscher diskutieren noch kontrovers ob AM unter homöostatischen Bedingungen in der Lunge einem M1- oder M2-ähnlichen Phänotyp zugeordnet werden können. So konnte in einigen Studien bei Analysen der BALF gezeigt werden, dass zwischen 8 und 50% der AM den M2-assoziierten Marker CD206 exprimieren (Hussell & Bell, 2014). Auch bei den mit dem Menschen nah verwandten Rhesus-Affen konnte bei den AM eine hohe Expression von CD206 bestätigt werden, im Gegensatz zu den IM und Monozyten (Cai et al., 2014). Zudem zeigen AM eine verstärkte Produktion von IL-10 und TGF- β sowie eine geringe Produktion reaktiver Oxidantien (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). In einer anderen Studie konnte hingegen mittels Transkriptom-Analysen der AM in der gesunden Kontrollgruppe eine leicht verstärkte M1-assoziierte Genexpression festgestellt werden (Shaykhiev et al., 2009). Weiterhin nimmt auch das komplexe Microenvironment der Lunge, welches durch eine Vielzahl an Zellen beeinflusst wird eine besondere regulatorische Rolle ein (Mayer et al., 2008), sodass eine eindeutige Zuordnung der residenten Lungenmakrophagen als M1- oder M2-Makrophagen unwahrscheinlich erscheint und so auch eher das Vorliegen gemischter Phänotypen vermutet werden kann (Patel & Metcalf, 2018).

Neben den bereits genannten akuten, M1-assoziierten Lungenschädigungen wurden auch viele chronische Erkrankungen der Lunge meist mit einem M2-assoziierten Phänotyp in Verbindung gebracht, wie insbesondere bei der Zystischen Fibrose, der idiopathischen Lungenfibrose oder auch bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) (Laskin et al., 2011).

1.6 Pneumoniemodell *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii (AcB) ist ein fakultativ pathogenes, gramnegatives Bakterium, das ubiquitär vorkommt. Weltweit steigende Inzidenzen haben dazu geführt, dass *A. baumannii* zu einem der wichtigsten Klinik-assoziierten Erreger geworden und für bis zu 17 % aller nosokomialen Infektionen verantwortlich ist, wobei insbesondere immunsupprimierte Menschen und Patienten auf Intensivstationen betroffen sind. Infektionen gehen dabei mit hohen Mortalitätsraten einher (Munier et al., 2019). Zumeist treten Beatmungs-assoziierte Pneumonien auf, aber auch Meningitiden, Septikämien, Infektionen der Haut, des Harntraktes oder anderer Organe werden regelmäßig beobachtet. *A. baumannii* entwickelt schnell Resistenzen gegen An-

tibiotika, sodass die Therapie bei multiresistenten Stämmen sehr schwierig und zumeist langwierig ist (McConnell et al., 2013). 1997 wurde erstmals von Joly-Guillou die Entwicklung eines Modells für akute Acinetobacter-induzierte Pneumonie in der Maus beschrieben (Joly-Guillou et al., 1997). Seither wurden murine, akute Pneumonie-Modelle mit intratracheal oder intranasal applizierten Bakterienstämmen routinemäßig zur Erforschung der Acinetobacter-Infektionen eingesetzt, insbesondere hinsichtlich der Immunantwort, Histologie, relevanter Virulenzfaktoren sowie zur Antibiotikaevaluierung (McConnell et al., 2013). Eine Infektion mit *A. baumannii* führt über die Stimulation von PRRs zur Aktivierung der angeborenen Immunabwehr, wobei es zu hochgradigen Infiltrationen mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen kommt, welche hauptverantwortlich für die Abwehr der Erreger sind (Chen, 2020). Bereits 4 h post infectionem sind große Mengen phagozytierter Acinetobacter in den AM nachweisbar, sodass residente AM über die Limitation der initialen Bakterienreplikation, aber auch durch die Freisetzung von chemotaktischen sowie inflammatorischen Zytokinen den Infektionsverlauf prägen. Nach 24 h sind hochgradige Entzündungszellinfiltrate mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nachweisbar (Qiu et al., 2012). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von Alveolarmakrophagen mit einer vermehrten Bakterienlast sowie einer reduzierten Produktion inflammatorischer Zytokine einhergeht und zu einer erhöhten Mortalität der experimentell infizierten Mäuse führt (Lee et al., 2020; Qiu et al., 2012).

1.7 Pneumoniemodell *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus kann als opportunistischer Erreger verschiedensten Organsysteme befallen. Dabei sind insbesondere Infektionen der Lunge oder des Blutes mit hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten verbunden (Lacoma et al., 2017). *S. aureus* ist das am häufigsten nachgewiesene grampositive Bakterium bei Patienten auf Intensivstationen, jedoch treten Infektionen auch häufig nicht-Klinik-assoziiert auf (Tong et al., 2015; Kapetanovic et al., 2010). Insbesondere die steigenden Prävalenzen multiresistenter Staphylokokken-Stämme (Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), Glycopeptid-insensitive *S. aureus* (GISA) und Vancomycin-resistente *S. aureus* (VRSA)) stellen eine zunehmende Gefährdung dar und verdeutlichen den hohen Forschungsbedarf in dem Feld (Kubica et al., 2008). Wardenburg et al. beschrieben 2007 erstmals ein durch transnasale Applikation von *S. aureus* (Stamm Newman) induziertes akutes Pneumoniemodell, mit dem die histopathologischen Veränderungen von *S. aureus*-induzierten, humanen Pneumonien sehr gut wiedergespiegelt werden konnten. Die Lungen infizierter Tiere zeigten sich dabei makroskopisch heterogen dunkelrot verfärbt und verfestigt.

Histologisch war 24 h post infectionem eine Destruktion der physiologischen Lungenarchitektur sichtbar, mit starken Entzündungszellinfiltraten, großen Staphylokokken-Ansammlungen und proteinreichen, alveolären Ödemen. Nach 48 h waren die Bakterienherde reduziert oder nicht mehr nachweisbar und die Alveolen wieder vermehrt belüftet (Wardenburg et al., 2007). Die Lungen derartig infizierter Mäuse zeigen eine multifokale, großflächig verteilte Bronchopneumonie. Die Entzündungszellinfiltrate setzen sich dabei in der frühen Phase (24 - 48 h) der Infektionen vorrangig aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zusammen und später (7 Tage p. inf.) aus Lymphozyten und Plasmazellen (Dietert et al., 2017; Kapetanovic et al., 2010).

In murinen Modellen konnte auch gezeigt werden, dass eine Depletion der AM zu einer erhöhten Mortalität und vermehrten Bakterienlast in der Lunge führt (Pidwill et al., 2021). Makrophagen sind somit maßgeblich an der Elimination der Staphylokokken beteiligt, jedoch spielen sie auch bei der Immunevasion der Erreger eine Rolle. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Bakterien mehrere Tage in intrazellulären Vakuolen humaner Makrophagen überleben ohne eine Immunantwort auszulösen und erst bei ihrer Freisetzung ins Zytoplasma zur Lyse der Makrophagen führen (Kubica et al., 2008). Des Weiteren ermittelten Foster et al. in ihren Mausstudien, dass Makrophagen mit phagozytierten Staphylokokken zur Erregerverteilung im Körper beitragen (Foster, 2009).

Sowohl *S. aureus* als auch *A. baumannii* werden aufgrund ihrer Resistenzlage von der amerikanischen Gesellschaft für Infektionskrankheiten, der IDSA (Infectious Diseases Society of America), zu den 6 wichtigsten Erregern gezählt (*ESKAPE: Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.*), für die kaum noch therapeutische Möglichkeiten verfügbar sind und sehr dringend neue Therapieoptionen gefunden werden müssen (Boucher et al., 2009). Neben innovativen Antibiotika stehen dabei insbesondere auch immunmodulatorische Medikamente im Fokus der Forschung, wofür eine genaue Kenntnis der Abläufe und Zusammenhänge der Immunantwort des Wirtes essentiell ist (Chen, 2020; Wang et al., 2019b).

1.8 Pneumoniemodell *Legionella pneumophila*

Das gramnegative Stäbchen-Bakterium *Legionella pneumophila* kommt weltweit in Oberflächengewässern und Grundwasser vor und kann durch Inhalation kontaminierter Aerosole zu schweren Pneumonien (Legionärskrankheit) führen (Jung et al., 2016; Albert-Weissenberger et al., 2007). Beim Menschen repliziert sich *L. pneumophila* vorrangig intrazellulär in den Al-

veolarmakrophagen und umgeht dabei durch eine Vielzahl an Virulenzfaktoren die Immunabwehr des Wirtes. Im Gegensatz dazu sind die Alveolarmakrophagen von Inzucht-Mausstämmen weitestgehend resistent gegenüber intrazellulären Infektionen. Einzige Ausnahme stellt dabei der ebenfalls empfindliche A-Mausstamm (auch als „A/J Stamm“ bekannt) dar (Newton et al., 2010). In den letzten 40 Jahren wurden dennoch zahlreiche Studien in unterschiedlichen Mausstämmen mit Legionellen-induzierten Pneumonien durchgeführt bei denen wichtige Komponenten der effektiven Immunabwehr einer Legionelleninfektion identifizieren werden konnten. Diese weisen auf eine betonte Th-1-Immunantwort hin mit einer vermehrten Produktion von IFN- γ , TNF- α und IL-12, sowie die Beteiligung von neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen (Newton et al., 2010). Die genaue Rolle von M1-/M2-polarisierten Makrophagen bleibt größtenteils noch unklar, jedoch konnten Kusaka et al. 2018 in ihrem Modell zeigen, dass eine vermehrte Aktivität von M2-ähnlichen Makrophagen zu einer erhöhten Legionellen-induzierten Letalität führt (Kusaka et al., 2018). Im transnasal induzierten Modell in C57BL/6 Mäusen zeigt sich die Infektion 48 h post infectionem als multifokale, interstitielle, histiozytäre Pneumonie, welche nach 6 Tagen einen granulomatösen Charakter annimmt (Dietert et al., 2017).

1.9 Makrophagen in Fremdkörperreaktionen der Haut durch Biomaterialimplantate

Die Wundheilung der Haut ist durch 3 Hauptphasen gekennzeichnet, die dynamisch ineinander übergehen und sich auch überschneiden: zu Beginn zeigt sich eine primäre, entzündliche Reaktion, anschließend folgt die Granulationsgewebsbildung, Wundkontraktion und die Ablagerung extrazellulärer Matrix und als drittes Gewebeumbauprozesse (Gurtner et al., 2008). Im Verlauf dieses Heilungsprozesses konnten in zahlreichen Studien spezifische Makrophagensubtypen zeitlich zugeordnet werden. Die primäre, entzündliche Reaktion lässt sich noch weiter in eine frühe und späte Phase untergliedern. Die frühe Phase tritt 1 - 4 Tage nach der Schädigung auf und ist v.a. durch Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und proinflammatorischen, monozytär-abgeleiteten M1-Makrophagen gekennzeichnet, welche durch das Microenvironment des geschädigten Gewebes aktiviert werden und Zelldebris sowie Pathogene beseitigen (Galli et al., 2011). In der späten entzündlichen Phase (ca. 5 – 7 Tage nach der Schädigung) kommt es vermehrt zur Aktivierung der M2-Makrophagen, welche durch ihre Zytokine (v.a. IL-10) und Wachstumsfaktoren (VEGF, EGF, TGF- β) immunregulatorisch und wundheilungsfördernd wirken, indem sie u.a. Fibroblasten sowie Endothelzellen anlocken und

aktivieren (Brown et al., 2014). Gewebeumbauprozesse beginnen dann ca. 2 – 3 Wochen nach der Schädigung und können 1 Jahr oder länger andauern (Gurtner et al., 2008).

Nahtmaterial wird routinemäßig zur Versorgung chirurgischer Wunden der Haut eingesetzt und stellt ein wichtiges Anwendungsbeispiel von Biomaterialien dar. Ziel dabei ist es möglichst biokompatible Fäden zu entwickeln, die einerseits eine ausreichende Reiß- und Zugfestigkeit besitzen, andererseits nur eine moderate Fremdkörperreaktion des Körpers auslösen. Fremdkörperreaktionen werden vom Körper bei längerem Kontakt mit biologisch nicht oder nur schwer abbaubaren Stoffen initiiert und können in 5 Phasen eingeteilt werden: Proteinadsorption, akute und chronische Entzündung, Fremdkörperriesenzellbildung und Fibrose. Sowohl M1- und M2-Makrophagen, als auch Fremdkörperriesenzellen, deren Herkunft noch konträr diskutiert wird (Fusion von M1, M2 oder Monozyten?), spielen bei der Integration von nicht-resorbierbaren Biomaterialien sowie dem Abbau von resorbierbaren Nahtmaterialien eine essentielle Rolle. Moderne Biomaterialien zielen sowohl durch ihre chemische als auch physikalische Zusammensetzung darauf ab den Makrophagen-Phänotyp günstig zu beeinflussen und insbesondere eine chronische Dominanz oder das Fehlen eines Subtypens zu vermeiden, da dies mit Wundheilungsstörungen assoziiert ist (Kloppfleisch, 2016). Für die Etablierung neuer Biomaterialien werden vorrangig murine Hautimplantatstudien genutzt, bei denen sowohl die Wundheilung als auch die Fremdkörperreaktion des Körpers zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilt werden kann.

2 Grundüberlegung und Arbeitshypothese

Makrophagen zeigen eine enorme funktionelle Diversität, welche insbesondere durch das umgebende, komplexe Microenvironment geprägt wird. Eine weitreichende Beteiligung verschiedener Subtypen wird für immer mehr Pathologien beschrieben und bietet somit auch die Chance für neue, zum Teil sehr dringend benötigte Therapieoptionen. Eine gezielte immunmodulatorische Therapie erfordert jedoch eine möglichst genaue Kenntnis der Subtypen im Gewebe selbst. Zwar konnten viele Oberflächenmarker in vitro oder ex vivo mittels verschiedener Zytometrieverfahren detektiert werden, diese geben jedoch keinen Aufschluss über die genaue Verteilung der Entzündungszellen im Gewebe und viele der in vitro generierten Ergebnisse sind nicht immer auf die Situation in vivo übertragbar. Die in situ Phänotypisierung verschiedener Makrophagen-Subtypen anhand ihrer Oberflächenmarker stellt Forscher jedoch bislang vor große Herausforderung, da die IHC und IF abhängig vom untersuchten Organ, dem verwendeten Marker und den Fixierungsbedingungen des Gewebes relativ anfällig für Artefakte sind. Zudem sind viele kommerziell erhältliche Marker bislang nur in der Zellkultur beschrieben oder nur für zytometrische Messungen etabliert. Dies hat dazu geführt, dass die

Charakterisierung polarisierter Makrophagen in situ sich bislang als äußerst schwierig erweist, bekannte Marker uneinheitlich verwendet werden und in der Literatur nur wenige umfassendere Ansätze zur immunhistochemischen Phänotypisierung von Makrophagen zu finden sind (Barros et al., 2013; Zaynagetdinov et al., 2013).

Sowohl Gewebeschädigungen, wie beispielsweise mechanische Traumata, als auch akute Infektionen führen vorrangig ausgelöst durch gewebständige Makrophagen zu einer Entzündungsreaktion des Körpers. Bei physiologischem Ablauf dieser Entzündungsreaktion kommt es dabei in einer primären proinflammatorischen Phase zur Abwehr eingedrungener Erreger und der Entfernung von Zelldebris, sowie in der sich anschließenden antiinflammatorischen und reparativen Phase zur Wiederherstellung der Homöostase und damit auch der Funktion des Gewebes (Medzhitov, 2008). Die Aktivierung der verschiedenen Makrophagen-Subtypen folgt dabei ebenfalls diesem zeitlichen Wechsel von den primär dominierenden proinflammatorischen M1-Makrophagen, die eingedrungene Pathogene abwehren, weitere Entzündungszellen rekrutieren und nekrotisches Material beräumen, hin zu den antiinflammatorischen und heilungsfördernden M2-Makrophagen, sodass ein Zeit-assoziiertes Phänotypenwechsel stattfindet. Darauf aufbauend wurde die folgende Arbeitshypothese entwickelt.

Arbeitshypothese: Akute Entzündungsreaktionen zeigen zu einem frühen Zeitpunkt in situ eine vermehrte Expression M1-spezifischer Marker, die im zeitlichen Verlauf jedoch abnimmt. Bei der Expression M2-spezifischer Marker verhält es sich genau umgekehrt, sodass diese einen Anstieg zu einem späteren Zeitpunkt der Entzündungsreaktion zeigen.

Grundlegendes Ziel der Arbeit war zudem eine umfangreiche, immunhistochemische Etablierung von publizierten, subtypenspezifischen Makrophagenmarkern im Mausmodell. Sowohl bei den Entzündungsvorgängen im Biomaterialimplantat-Modell der Haut, als auch bei den beschriebenen Pneumoniemodellen (*S. aureus*, *A. baumannii* und *L. pneumophila*) sind Makrophagen im besonderen Maße beteiligt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Gewebe nachweisbar, sodass sie zur Etablierung der Marker bzw. Evaluierung der Arbeitshypothese genutzt wurden. Die Auszählung positiver Zellen sollte mit Hilfe einer digitalen Analyse-Software erfolgen um eine reproduzierbare und möglichst objektive Auswertung der Färbungen zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Mausmodelle

Alle verwendeten Proben stammen aus Archivmaterial von Tierversuchen, die für einen anderen Zweck als diese Dissertation durchgeführt und deren Ergebnisse zum Teil bereits an anderer Stelle publiziert wurden (Naujoks et al., 2016; Dietert et al., 2014). Die erneute Nutzung der vorhandenen Gewebeproben im Rahmen dieses Dissertationsprojektes trägt somit zur Reduzierung von Tierversuchen bei, welche einen der 3 Teilaspekte des 3 R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine) von Russel und Burch darstellt (Russell & Burch, 1959).

Alle Tierversuche wurden vom Ethik Komitee der Berliner Charité und der zuständigen staatlichen Behörde, dem Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Genehmigungs-ID für *S. aureus*: G 0358/11; *A. baumannii*: A 0299/15 ; *L. pneumophila*: G0175/12) genehmigt. Die Versuche wurden unter strikter Einhaltung der Leitlinien zur tiergerechten Haltung und Verwendung von Labortieren der FELASA durchgeführt.

3.1.1 Evaluierung geeigneter Mausmodelle

Der primäre Untersuchungsansatz dieser Arbeit war die in situ Phänotypisierung von Makrophagen in dermalen Fremdkörperreaktionen, die durch Biomaterialimplantaten bei Mäusen ausgelöst wurden und zu unterschiedlichen post operativen Zeitpunkten evaluiert werden sollten. Zur Etablierung stand bereits Archivmaterial von Gewebeproben mit verschiedenen Hautbiomaterialimplantaten zu 2 verschiedenen Zeitpunkten (7 Tage und 21 Tage post OP) zur Verfügung. Leider kam die geplante Kooperation mit dem Hersteller des Biomaterials nicht zu Stande, sodass für die Fragestellung andere Modelle evaluiert werden mussten. Die im Rahmen der Antikörper-Etablierung bereits getesteten immunhistochemischen Färbungen des Hautmodells sind im Folgenden und den Tabellen 2 - 4 beschrieben und wurden als erste Anhaltspunkte für die weitere Testung der Antikörper berücksichtigt.

Als 2. Option wurde Archivmaterial von einem Mausinfektionsversuch mit akuter Pneumonie ausgelöst durch *L. pneumophila* in Betracht gezogen. Diese zeigte eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten, aber auch histiozytären Zellen. In den IHC-Vorversuchen stellten sich die Proben vielversprechend dar, sodass auch bei diesem Modell umfangreiche Etablierungsversuche unternommen wurden (siehe Tabelle 2 – 4). Bei der systematischen Färbung der kompletten Gruppen zeigten sich jedoch auffallend starke Varianzen in der Färbequalität zwischen

den Schnitten. Besonders die zum Teil sehr stark schwankende, unspezifische Hintergrundfärbung erschwerte eine korrekte, reproduzierbare, quantitative Auswertung der Proben, sodass auch dieses Modell als ungeeignet eingestuft werden musste.

Alternativ zu dem Legionellen-Pneumonie-Modell gelangten zwei andere Maus Pneumonie-Modelle, Infektion mit *A. baumannii* bzw. mit *S. aureus* aus neueren Studien in das Hausarchiv des Institutes für Tierpathologie. Diese wiesen ebenfalls eine starke histiozytäre Zellinfiltration auf. Eine Auswahl der zuvor getesteten Antikörper wurde daran nochmals neu evaluiert (siehe Tabelle 2 – 4) und alle Proben mit gutem Ergebnis gefärbt und anschließend ausgewertet.

3.1.2 Versuchsablauf des Hautimplantatmodells

Für den Versuch wurden 8 bis 10 Wochen alte, männliche C57Bl/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit Isofluran anästhesiert. Die Narkose wurde mit einem Inhalationsgerät und einer 1,5%igen Isofluran-Inhalationsnarkose bei einer Sauerstoffzufuhr von 100% fortgeführt. Die Tiere wurden auf einer beheizten OP-Matte mit Hilfe des Leica Präparier-Mikroskops (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) operiert. Ca. 2 cm unterhalb des Nackens wurde ein 1,5 cm langer Schnitt gesetzt und eine ca. 1 cm lange, subkutane Tasche oberhalb der Inzision stumpf präpariert. Die Biomaterialfilme (ca. 0,8 x 0,8 cm²) wurden in die subkutane Tasche eingebracht. Der Hautschnitt wurde mit einer 6.0 Prolene Naht verschlossen. 7 bzw. 28 Tage post operationem wurden die Mäuse anästhesiert und das jeweilige Implantat wurde samt umliegendem Gewebe entfernt und über Nacht in 4%igem, PBS-gepufferten Formalin fixiert. Anschließend wurden die Proben nach Standardprotokoll in Paraffin eingebettet, auf dem Mikrotom geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Im Rahmen der Antikörper-Etablierung wurden jeweils 2 Proben der verschiedenen Zeitpunkte post OP verwendet. Die Auswahl erfolgte anhand morphologischer Kriterien, wobei histiozytäre Entzündungszellen und Polymeranteile sichtbar sein sollten. Zudem wurden Proben mit unterschiedlichen Polymeren gewählt, um die Färbeeigenschaften der verschiedenen Biomaterialien einschätzen zu können. Für Tag 7 wurde eine Probe mit PVDF (Polyvinylidene-fluoride-co-hexafluoropropene) als klinisch etabliertes Material (=Kontrolle) und eine Probe mit Polyetherimide (PEI), für Tag 28 ebenfalls PVDF und eine Probe mit PPDO (Poly(*p*-dioxanone)) für die Antikörperetablierung genutzt.

3.1.3 Versuchsablauf der Pneumoniemodelle

Bei allen Pneumoniemodellen wurden weibliche, 8-12 Wochen alte C57BL/6N Mäuse (*A. baumannii*) bzw. C57BL/6J Mäuse zufällig in Gruppen eingeteilt. Sie wurden in individuell ventilierten Käfigen unter spezifisch pathogenfreien (SPF) und standardisierten Haltungsbedingungen gehalten (konstante Raumtemperatur von 22± 2°C bei 45% – 65% Luftfeuchtigkeit, konstantes Lichtregime mit 12 stündiger Hell- und 12 stündiger Dunkelphase). Ein Maus-Standard-Pellet-Futter und Leitungswasser standen ad libitum zur Verfügung.

Für die Infektion wurden die Tiere intraperitoneal mit einem Ketamin-Xylazin-Gemisch anästhesiert und der jeweilige Erreger intranasal appliziert. Dabei wurden als Infektionsdosis für *Staphylococcus aureus* 5×10^7 CFU (*Staphylococcus aureus* Newman; NCTC 10833), für *Acinetobacter baumannii* 5×10^8 CFU (RUH 2037) und für *Legionella pneumophila* 1×10^6 CFU (Serogruppe 1 Stamm JR32) verwendet. Die Bakterienkolonien wurden zuvor in 20 µl bzw. in 40 µl (*L. pneumophila*) phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, phosphate-buffered saline) resuspendiert. Die Kontrolltiere erhielten in entsprechender Weise reines PBS.

Bei dem AcB-Modell erhielten die Tiere zusätzlich 12 h post infectionem nach orotrachealer Intubation 25 µl einer Phagen- bzw. einer entsprechenden Kontrolllösung mittels intratrachealer Aerosolisation unter Isofluran-Inhalationsnarkose (Wienhold et al., 2018a, Wienhold et al., 2018b; Wienhold et al., 2018c).

Die Tiere wurden nach 24 bzw. 48 h intraperitoneal anästhesiert, heparinisiert und über die *Vena cava caudalis* entblutet. Um einen Alveolarkollaps zu verhindern wurde bei allen Tieren die Trachea ligiert, die Lunge vorsichtig entnommen und sofort in 4 %igen Formalin (pH 7,0) fixiert. Nach 24 - 48 h wurde das Gewebe gemäß einem Standard-Routineprotokoll in Paraffin eingebettet.

3.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Eine umfangreiche pathomorphologische Untersuchung der Mäuselungen wurde bereits im Rahmen der zuvor erfolgten Studien an Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Schnitten von erfahrenen Pathologen des Instituts für Tierpathologie der FU Berlin durchgeführt. Die HE gefärbten Schnitte aus dem Archiv wurden für diese Studie erneut gesichtet.

3.3 Immunhistochemie-Protokoll

Das Formalin fixierte und in paraffineingebettete Gewebe (FFPE Material) wurde mit einer Schnittdicke von 2 µm auf dem Mikrotom geschnitten, auf adhesive SuperFrost® Objektträger (Engelbrecht) aufgezogen und anschließend 20 min bei 60 °C getrocknet. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert. Dann wurde die Endogene Peroxidase mit 3%igem Wasserstoffperoxid in PBS für 15 min gehemmt und anschließend in A. dest. gespült. Die Antigen-Demaskierung wurde routinemäßig mit einem Citratpuffer (CP, pH 6,0) in der Mikrowelle (600 Watt) für 12 min durchgeführt. Bei der Etablierung der Färbungen wurde als alternative Antigen-Demaskierung auch ein TRIS-EDTA-Puffer (TEP, pH 9,0) in der Mikrowelle (600 Watt, 12 min), eine Behandlung mit Protease (PROT; 50 ml PBS + 0,05 g Protease, 10 min, 37°C) oder auch Färbungen ohne Vorbehandlung (oVB) getestet. Die Schnitte wurden in Coverplates montiert und die unspezifische Antikörper-Bindung wurde mittels Roti-Immunoblock (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 20 % Ziegen-Normal-Serum (30 min, Raumtemperatur (RT)) blockiert. Anschließend wurden die jeweilige Primärantikörper, die zuvor mit PBS/BSA (Bovines Serum Albumin) auf die jeweilige Konzentration verdünnt wurden, aufgetragen: Anti-CD68 Antikörper (1:200, Kaninchen, polyklonal, ab125212, abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich), Anti-Leber Arginase Antikörper (1:500, Kaninchen, polyklonal, ab91279, abcam), Anti-iNOS Antikörper (1:600, Kaninchen, polyklonal, ab15323, abcam), Anti-CD163 Antikörper [EPR19518] (1:250, Kaninchen, monoklonal, ab182422, abcam). Als Negativkontrolle (NK) wurde jeweils ein Schnitt mit Biogenex Negative Control Serum der entsprechenden Spezies (Kaninchen HK408, Maus HK119-7M oder Ratte HK407-5T, BioGenex, Fremont, USA) in der gleichen Konzentration wie der Primärantikörper mitgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlschrank. Anschließend wurde der jeweils passende Sekundärantikörper (Goat anti Rabbit, Goat anti Rat oder Goat anti Mouse, IgG Antikörper, biotinyliert, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) in der Verdünnung 1:200 aufgetragen und für 30 min bei RT inkubiert.

Zur Farbentwicklung wurde eine Avidin-Biotin-Complex (ABC) Peroxidase Lösung (Vectastain® Elite ABC Kit, PK-6100; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) eingesetzt und anschließend mit 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) als Peroxidasechromogen für 8 min bei RT angefärbt.

Um die unspezifischen Signale zu reduzieren wurde bei einigen Antikörpern anstelle eines der oben genannten Zweitantikörper auch die Färbung mittels Immuno-Peroxidase Polymer (N-Histofine® Simple Stain Mouse MAX Po R, Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan) getestet. Das Polymer wurde für 30 min bei RT inkubiert und daran anschließend wurde mit DAB gefärbt. Die Behandlung mit ABC-Lösung entfiel dabei.

Bei den 2 aus der Maus stammenden Antikörpern Anti-CD68 [KP1] (monoklonal (ab 955)) und Anti-Transglutaminase 2 [CUB 7402] (monoklonal (ab2386)) wurde zudem eine Färbung mit dem N-Histofine® Mousestain Kit (414321F, Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan) getestet. Unspezifische Antikörper-Bindungen wurden dabei mittels der dazugehörigen Block-Reagenzien A und B unterdrückt (Inkubation 60 bzw. 10 min bei RT). Anschließend wurde das Immuno-Enzym Polymer (Simple Stain Mouse MAX PO (M)) aufgetragen und für 10 min bei RT inkubiert. Das Polymer ersetzt somit den Sekundärantikörper. Daran anschließend wurde standardmäßig mit DAB gefärbt, jedoch ohne vorherige Behandlung mit ABC-Lösung.

Bei der Etablierung wurde als alternatives Chromogen auch eine Anfärbung mittels Neufuchsin getestet. Zur Farbentwicklung wurden die Schnitte dafür mit einer Avidin-Biotin-Complex (ABC) Lösung (Vectastain® ABC Kit, AK-5000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) für 30 min inkubiert. Zur Herstellung der Neufuchsin-Färbelösung wurden zunächst 3 verschiedene Lösungen frisch angemischt. Lösung 1 wurde aus 0,1 g Na-Nitrit und 2,5 ml A. dest. hergestellt, Lösung 2 aus 0,1 g Naphtol-AS-BI-Phosphat und 1200 µl N.-N.-Dimethylformamid und Lösung 3 aus 100 ml TRIS Puffer (pH 8,7, 0,05 M) und 600 µl Levamisol. Dann wurden 500 µl der Lösung 1 mit 20 µl Neufuchsin (5%ig) vermischt, 60 Sekunden geschüttelt und anschließend mit 100 ml der Lösung 3 vermischt. Im letzten Schritt wurde 600 µl der Lösung 2 dazugegeben und die so entstandene Färbelösung einmal filtriert. Die Schnitte wurden dann 20 min bei RT unter leichtem Schwenken darin gefärbt.

Eine Gegenfärbung erfolgte mittels Hämatoxylin (1 min, RT). Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol gereinigt und mit Deckgläschen versiegelt.

3.4 Immunfluoreszenz-Färbung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde bis zum Auftragen des Primärantikörpers standardmäßig wie bei der Immunhistochemie verfahren. Die Primärantikörper wurden mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die getesteten Verdünnungen sind im Folgenden und in den Tabellen 2 - 4 genannt. Die Negativkontrolle erhielt anstelle des Primärantikörpers PBS. Als Zweitantikörper wurde Alexa Fluor® 488 (Goat anti Rabbit; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) auf eine Konzentration von 1:200 mit PBS verdünnt, im abgedunkelten Raum aufgetragen und für 45 min bei RT inkubiert. Als Kerngegenfärbung und Eindeckmedium wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (Roti®-Mount FluorCare DAPI, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet und die Schnitte anschließend mit Deckgläschen versiegelt.

3.5 Antikörperetablierungsverfahren für die Immunhistochemie- bzw. Immunfluoreszenzfärbung:

Im Rahmen des Etablierungsverfahrens wurden 23 verschiedene Antikörper in den Mausmodellen getestet. Dabei konnten 4 Antikörper (Anti-CD68, Anti-Leber-Arginase-1, Anti-iNOS und Anti-CD163) erfolgreich etabliert werden und im Acinetobacter-(AcB-) und Staphylokokken-(Staph-)Modell angewendet werden.

3.5.1 Anti-CD68 Antikörper (ab125212, Kaninchen, polyklonal)

Im Hautimplantat-Modell wurde eine Verdünnung von 1:800 und 1:1000 getestet, sowie 1:500 mit Polymer. Mit Polymer konnte das Hintergrundsignal reduziert werden. Des Weiteren zeigte der Antikörper auch in einer Immunfluoreszenzfärbung (1:500) im Hautimplantat ein spezifisches, kräftiges Signal. In den Lungenproben des Legionellenmodells wurde der Antikörper 1:1000 (G-a-Rabbit) bzw. 1:500 (mit Polymer) eingesetzt. In der IF (1:100) mit CP sowie PROT zeigte sich ein spezifisches Signal, welches insgesamt jedoch nur mäßig stark fluoreszierte und mit der Protease Vorbehandlung sehr unsauber war. In dem Staph- und dem AcB-Modell wurde der Antikörper in der IHC mit 1:2000 eingesetzt und brachte ein stark positives und sehr sauberes Signal. Als Positivkontrolle wurde murine Milz verwendet.

3.5.2 Anti-iNOS Antikörper (ab15323, Kaninchen, polyklonal)

Der AK wurde im Legionellen-Modell mit CP 1:100 und 1:200 getestet, zeigte dabei zwar ein spezifisches Signal, jedoch auch viel Hintergrundfärbung. Ein weiterer Versuch erfolgte mit 1:50 sowie 1:100 mit Polymer und DAB sowie mit NF. Bei NF zeigte sich lediglich ein ganz schwaches Signal, beim Polymer war kein Signal mehr erkennbar. Dann wurden nochmals alle Vorbehandlungen (oVB/CP/TEP/PROT) in der Verdünnung 1:150 getestet. Die Schnitte mit TEP waren positiv in der Negativkontrolle, Schnitte oVB waren negativ und die Lungen mit CP zeigten weniger unspezifischen Hintergrund, als die mit Protease demaskierten Schnitte. Die IF mit 1:20 war ohne Signal. Bei einer Wiederholung mit 1:10 war nur ein sehr blasses Signal erkennbar, welches nicht für eine Doppelfärbung geeignet war. Im AcB- und Staph-Modell wurde der AK 1:600 mit CP eingesetzt und zeigte auf den AcB-Schnitten ein gutes Ergebnis, bei den Staph-Schnitten war er jedoch nur schwach positiv und nicht jeder Schnitt wurde angefärbt. Milzgewebe der Maus wurde als Positivkontrolle bei den Färbungen mitgeführt.

3.5.3 Anti-Leber Arginase Antikörper (ab91279, Kaninchen, polyklonal)

Der AK wurde im Hautimplantatmodell 1:100 und 1:500 oVB sowie mit CP getestet. Mit CP zeigte sich ein gutes Signal bei 1:500. Im Hautimplantat färbten sich auch die Riesenzellen positiv an. Im Legionellen-Modell wurde 1:100 und 1:500 mit CP gefärbt. Bei 1:500 zeigten sich stark- sowie schwach-positive Zellen. Eine IF wurde mit 1:10 getestet, das Ergebnis war mäßig. Im AcB- und Staph-Modell konnte mit 1:500 (CP) eine gute Färbequalität erzielt werden. Als Positivkontrolle diente murines Lebergewebe.

3.5.4 Anti-CD163 Antikörper [EPR19518] (ab182422, Kaninchen, monoklonal)

Der AK wurde mit TEP 1:500 im Hautimplantatmodell sowie 1:500 und 1:250 mit TEP und CP im Legionellen-Modell getestet. Beste Ergebnisse ergaben sich mit CP und 1:250-facher Verdünnung. Eine IF im Legionellenmodell mit 1:25 (CP) brachte nur vereinzelt schwach-positive Signale. Im AcB- und Staph-Modell konnten mit CP und 1:250-facher Verdünnung gute Ergebnisse erzielt werden.

3.5.5 Exkludierte Antikörper

Die nachfolgenden 19 Antikörper (Tabelle 2 - 4) wurden im Rahmen des Etablierungsverfahrens exkludiert, da die Färbungen qualitativ unzureichende Ergebnisse in den getesteten Proben lieferten. Zumeist war zwar ein spezifisches Signal erkennbar, jedoch konnte die Hintergrundfärbung nicht ausreichend reduziert werden, sodass die Färbungen weder digital noch analog zuverlässig auswertbar waren. Neben unterschiedlichen Antikörper-Verdünnungen wurden mehrere Antigen-Demaskierungsverfahren getestet (MW+CP, MW+TEP, PROT, oVB). Auffallend hierbei war, dass MW+CP im Allgemeinen die besten Ergebnisse lieferte, d.h. meistens die geringste Hintergrundfärbung hatte. Eine Behandlung mit TEP hingegen wurde für die Lungenproben als ungeeignet eingestuft, da auch in den Negativkontrollen ein positives Signal im Zytoplasma einiger Zellen (Pneumozyten Typ II und Typ I) sichtbar war. Die Färbungen ohne Antigen-Demaskierung (oVB) zeigten bei keinem Antikörper spezifische Signale. Mit der Verwendung des Polymers als Zweitantikörper konnte der Hintergrund bei einigen Antikörpern zwar etwas reduziert werden, jedoch war dadurch auch das Vordergrundsignal stark abgeschwächt oder nicht mehr erkennbar. Als alternatives Chromogen wurde auch NF bei einigen Antikörpern getestet, jedoch war dabei kein oder nur ein sehr blasses, spezifisches Signal erkennbar. Einige Marker zeigten auch gar kein spezifisches Signal wie der Anti-CD68 [KP1]-

Antikörper oder nur ein sehr schwaches spezifisches Signal. Die getesteten Variationen sind in den Tabellen 2 - 4 dargestellt.

Tabelle 2: Getestete Färbungen weiterer Pan-Makrophagen-Marker

Antikörper	Gewebe	Verd.	AG-Demask.	2.AK	+Kontrolle	Chromogen		Signal	
						DAB	NF	spezifisch	un-spezifisch
CD68 [KP1] , mAb Maus (ab 955, abcam)	Haut	1:400	CP	M-kit	Tonsille (human)	x		-	-
F4/80 [CI:A3-1] , mAb Ratte (MCA 497G, serotec)	Haut	1:500	PROT	G-a-Rat	Intern	x		-	+
MHCII [M5/114] , mAb Ratte (ab139365, abcam)	Haut	1:200, 1:500	PROT	G-a-Rat	Milz (Maus)	x		(+)	+
		1:500	PROT	Alexa Fluor® 488, Rat		x		(+)	

Abkürzung: Verd. =Verdünnung, mAb =monoklonaler AK (monoclonal antibody), G-a-Rat =Goat anti Rat, M-kit =Mouse-on-Mouse Kit

Tabelle 3: Getestete Färbungen weiterer M1-Makrophagen-Marker

Anti-körper	Gewebe	Verd.	AG-Demask.	2.AK	+Kontrolle	Chromogen		Signal	
						DAB	NF	spezifisch	un-spezifisch
CCR7 [J59] mAb Kaninchen (ab32527, abcam)	Haut	1:1000	CP	G-a-Rab.	Milz, Leber (Kupffer-Zellen:+++)	x		+	Haut: +++
		1:500	CP	Polymer		x		(+)	+++
		1:1000	CP	Alexa Fluor®488, Rabbit		-	-	+ (Membransignal)	Autofluoreszenz des NM, Erys:+
	Lunge (Leg.)	1:1000	oVB; CP; TEP; PROT	G-a-Rab.		x		oVB: - TEP: + in der NK CP:+	CP: +++
		1:150	oVB; CP; TEP; PROT	Alexa Fluor®488, Rabbit				-	
	Lunge (AcB)	1:1000, 1:2500	CP	G-a-Rab.		x	x	DAB und NF: -	
CCR7 [J59] mAb Kaninchen (LS-B7382, LSBio)	Haut	1:1500	CP	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		+	+++
	Lunge (Leg.)	1:1000; 1:1500	CP	Polymer		x		(+) Leber und Milz: ++	++

Fortsetzung Tabelle 3: Getestete Färbungen weiterer M1-Makrophagen-Marker

Anti-körper	Gewebe	Verd.	AG-Demask.	2.AK	+Kontrolle	Chromogen		Signal	
						DAB	NF	spezifisch	un-spezifisch
CD80 pAb Kaninchen (ab64116, abcam)	Haut	1:50; 1:100	CP	G-a-Rab.	Gehirn, Milz (Maus)	x		(+)	++; NM: ++
		1:40	CP	Polymer		x		-	++
	Lunge (Leg.)	1:80; 1:100	CP	G-a-Rab.		x		-	++
		1:40	CP	Polymer		x		-	++
CD80 (RM80) mAb Ratte (MA1-81972, Thermo Fisher)	Haut	1:100; 1:200	oVB, CP	G-a-Rat	Milz (Maus)	x		(+)	++
CD40 pAb Kaninchen (ab13545, abcam)	Lunge (Leg.)	1:500	CP	Polymer	Milz (Maus)	x		(+)	+
		1:1000	CP	G-a-Rab.		x	x	DAB:(+); NF: -	+
		1:100	CP	Alexa Fluor®488, Rabbit		-	-	-	
CD86 (AA 130-180) mAb Kaninchen (ABIN736701, Bioss antibodies)	Lunge (Leg.)	1:100; 1:200	CP	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x	x	+; NF: -	++
		1:50	CP	Polymer, G-a-Rab.		x		+; Polymer: -	++
		1:150	oVB, CP, TEP, PROT	G-a-Rab.		x		oVB: - CP: + PROT: (+)	CP: + PROT: ++
		1:10, 1:20	CP	Alexa Fluor®488, Rabbit				1:10: (+)	
	Lunge (AcB)	1:75, 1:150	CP	G-a-Rab.		x	x	DAB: (+), NF: -	DAB: ++, NF: +
Anti-SOCS3 pAb Kaninchen (ab16030, abcam)	Lunge (Leg.)	1:100, 1:200, 1:500	CP	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		+	+++
		1:50, 1:100		Polymer		x	x	DAB: + NF: (+) Polymer: -	+++
		1:200	oVB, CP, TEP, PROT	G-a-Rab.		x		oVB: -	++
								TEP: NK +	(+)
								CP: +	MW: ++
				PROT: (+)		PROT: +++			
		1:20	CP, PROT	Alexa Fluor®488, Rabbit				CP: (+) PROT: -	
1:10	CP				CP: (+)				

Abkürzungen der Tabelle 3: Verd. =Verdünnung, mAb =monoklonaler AK (monoclonal antibody), pAb =polyklonaler AK (polyclonal antibody), CP =Citratpuffer, NM=Nahtmateriäl, oVB=ohne Vorbehandlung, PROT =Protease, TEP =Tris-EDTA-Puffer G-a-Rab =Goat-anti-Rabbit, G-a-Rat =Goat-anti-Rat, NK =Negativkontrolle

Tabelle 4: Getestete Färbungen weiterer M2-Makrophagen-Marker

Anti-körper	Gewebe	Verd.	AG-Demask.	2.AK	+Kontrolle	Chromogen		Signal	
						DAB	NF	spezifisch	un-spezifisch
CD206 pAb Kaninchen (ab64693, abcam)	Haut	1:1000	CP	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		++	+++
		1:500	CP	Polymer		x		(+)	++
	Lunge (Leg.)	1:2500, 1:4000, 1:5000	CP	G-a-Rab.		x		1:2500: + (bestes Ergebnis)	++
		1:1000	CP	G-a-Rab.		x	x	DAB: + NF: -	++
MERTK [phospho Y681 + Y749] mAb Kaninchen (ab64693, abcam)	Haut	1:50, 1:100	CP	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		+ (Kern und Zyto- plasma)	++ (Kernsig- nale in der Subcutis)
		1:50	PROT	G-a-Rab.		x			
	Lunge (Leg.)	1:200	PROT	G-a-Rab., Polymer		x		(+), Polymer: -	++
MERTK [DS5MMER] mAb Ratte (Cat: 145751, eBioscience)	Haut	1:100	PROT	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		-	+
	Lunge (Leg.)	1:100	PROT	G-a-Rab.		x		-	+
RELM-alpha pAb Kaninchen (ab39627, abcam)	Haut	1:20, 1:40	CP	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		+	+ (auch Kern- signale)
		1:40	CP	Polymer		x		-	(+)
	Lunge (Leg.)	1:40	oVB, CP, TEP, PROT	G-a-Rab.		x		oVB: - CP: (+) TEP: + in NK PROT: (+)	CP: + PROT: ++
		1:20, 1:200	CP	G-a-Rab.		x		(+)	+
SOCS2 pAb Kaninchen (ab92848, abcam)	Haut	1:500	CP	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		(+)	+ (auch Endothel- zellen, Fibrozy- ten)
		1:100, 1:250				x		+	
	Lunge (Leg.)	1:100	CP	G-a-Rab.		x		+	

Fortsetzung Tabelle 4: Getestete Färbungen weiterer M2-Makrophagen-Marker

Anti-körper	Gewebe	Verd.	AG-Demask.	2.AK	+Kontrolle	Chromogen		Signal	
						DAB	NF	spezifisch	un-spezifisch
STAT3 (py705)[EP2147Y] mAb Kaninchen (ab76315, abcam)	Lunge (Leg.)	1:50	CP	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		(+)	(+)
STAT6 [phospho Y641] mAb Kaninchen (ab125308, abcam)	Lunge (Leg.)	1:50	PROT	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		-	+
Transglutaminase 2 [CUB 7402] mAb Maus (ab2386, abcam)	Lunge (Leg.)	1:50	CP	G-a-Mouse	Leber, Niere (Maus)	x		-	+
		1:50	CP	M-Kit		x		-	+
Ym 1 / Ym 2 [EPR15263] mAb Kaninchen (ab192029, abcam)	Lunge (Leg.)	1:200	CP, TEP	G-a-Rab.	Milz (Maus)	x		CP: ++ TEP: + in NK	++
		1:400	CP	Polymer	Lunge (Maus) mit	x		+	+
		1:600, 1:800	CP	G-a-Rab.	YM-1/2-Speicherkrankheit	x		(+)	(+)

Abkürzungen: Verd. =Verdünnung, mAb =monoklonaler AK (monoclonal antibody), pAb =polyklonaler AK (polyclonal antibody), CP =Citratpuffer, oVB =ohne Vorbehandlung, PROT =Protease, TEP =Tris-EDTA-Puffer G-a-Rab =Goat-anti-Rabbit, G-a-Rat =Goat-anti-Rat, NK =Negativkontrolle

3.6 Pathomorphologische Beurteilungen

Für die lichtmikroskopische Beurteilung der HE-Färbungen und zur Erstellung digitaler Bilddateien wurde ein Olympus BX41 Mikroskop (bis zu 600-facher Vergrößerung) und die Software cellSens® (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet.

3.6 Digitale Analyse und Quantifizierung

Eine Digitalisierung der gefärbten Schnitte erfolgte durch den Aperio CS2 Scanner (Leica Biosystems Imaging Inc.) mit einer 400x Vergrößerung (entspricht einer Auflösung von 0,25 µm/Pixel). Die Lungenschnitte wurden mittels der Aperio ImageScope x64 Software digital ausgewertet. Dafür wurden zunächst die zu analysierenden Bereiche annotiert. Bei den Antikörpern CD68, iNOS und Arg1 färbten sich auch die Bronchialepithelien an, diese wurden wie auch evtl. vorhandene Lymphknoten, Bindegewebs- und Fettstrukturen durch die Annotationen bei allen Schnitten exkludiert.

Um eine Unterscheidung zwischen entzündeten („affected Area“) und nicht entzündeten („unaffected Area“) Lungenarealen zu erreichen wurde die Aperio GENIE histology pattern recognition Software (Leica Biosystems Imaging Inc., Wetzlar, Deutschland) benutzt. Mit dieser konnte ein Algorithmus durch eine Montage von repräsentativen Lungenarealen für die 3 Klassen („affected“, „unaffected“ und „glass“) an mehreren Schnitten erstellt werden. Die Auswahl der Areale wurde von einem erfahrenen ACVP-zertifizierten Pathologen überwacht. Als „affected“ wurden Areale definiert, die eine Infiltration mit Entzündungszellen (intra-alveolär, interstiell, peribronchial und -vaskulär), ein Ödem oder eine verdickte Alveolarwand zeigten und sich so vom physiologischen Lungenparenchym („unaffected“) und den luftgefüllten Arealen („glass“) abgrenzen ließen.

Für die Quantifizierung der in der IHC-Färbung positiven Zellen wurde der Aperio v9 nc (Nuclearcount) Algorithmus benutzt und für die jeweiligen Antikörper in den 2 verschiedenen Modellen darauf trainiert die positiven Zellen zu erkennen. In den jeweiligen Algorithmen wurde der neu trainierte Genie-Algorithmus als sogenannter Classifier implementiert um gezielt die entzündeten („affected“) oder nicht entzündeten („unaffected“) Bereiche von der Software analysieren zu lassen (Abb. 1). Dieses Tool wurde bereits zuvor im Rahmen einer anderen Studie unseres Institutes zur Identifizierung und Quantifizierung positiver Zellen etabliert (Dietert et al., 2018).

Bei der Auswertung der Daten wurden lediglich die stark positiven (3+) Zellen beachtet. Mittel (2+) oder nur schwach angefärbte Zellen (1+) wurden, aufgrund der zum Teil sehr variablen Hintergrundsignalstärke nicht in die Analysen mit einbezogen, da dabei eine Zählung von artifiziellen, unspezifischen Signalen nicht mit Sicherheit durch die digitale Analyse Software ausschließbar war. Die Einstellungen der verwendeten Algorithmen sind im Anhang (Tabelle 10 – 11) aufgeführt.

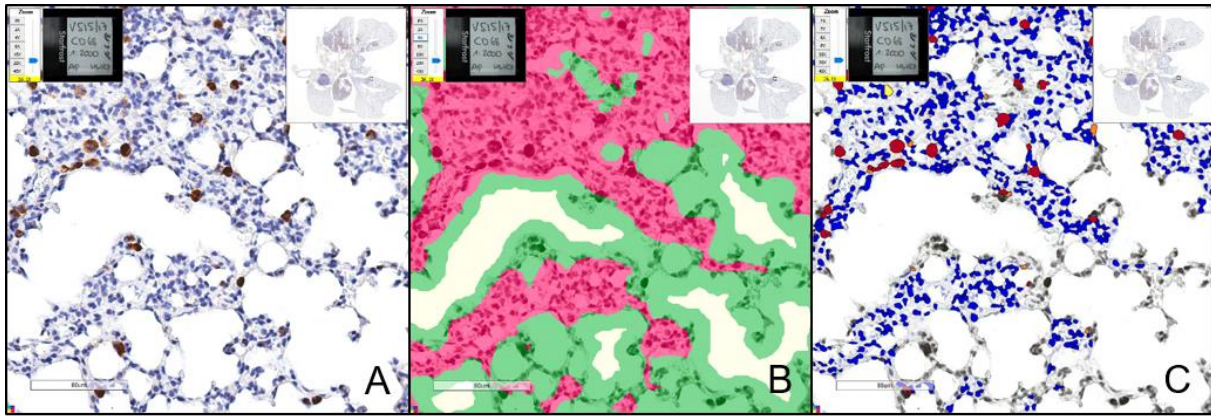


Abb. 1: Exemplarische Darstellung der digitalen Analyse

A: Die für Anti-CD68 positiven Zellen zeigen in der IHC ein braunes Zytoplasmasignal. Kerngegenfärbung (blau) mittels Hämalaun nach Mayer, B: Genie-Algorithmus: Der trainierte Algorithmus teilt die Lunge in „affected Area“ (rot), „unaffected Area“ (grün) und „glass“ (gelb) ein, C: v9 Nuclearcount-Algorithmus mit integrierten Classifier (Genie), Analyse der „affected Area“. Der Algorithmus teilt die Zellen in stark positive ((3+), braun), mittelstark positive ((2+), orange), schwach positive ((1+), gelb) und negative Zellen ein (blau). Die nicht entzündeten Areale („unaffected Area“) sind grau eingefärbt und wurden bei dieser Analyse mittels Genie exkludiert, A-C: CD68 (1:2000, CP), Tier-Nr. 23 (515/17) aus der 48h-AcB-Gruppe, Balken 80 μ m

3.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung erfolgte mittels GraphPad Prism Version 9.1.0 (221) für Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Beim AcB-Modell wurden die Daten zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Anschließend wurden die beiden Behandlungsgruppen (Phagen oder Puffer) bei 24 bzw. 48 h mittels Ordinary one-way ANOVA verglichen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe, sodass sie in der weiteren Analyse in den 4 Gruppen 24h-AcB, 48h-AcB, 24h-PBS und 48h-PBS zusammengefasst wurden. Der trainierte Algorithmus zählt im Gegensatz zu einem Menschen immer auf gleiche Art und Weise. Dabei ist ein gewisser Prozentsatz an falsch positiven bzw. falsch negativen Zellen unvermeidbar. Wenn viele Zellen gezählt werden ist auch die absolute Anzahl der falsch gezählten Zellen hoch, umgekehrt verhält es sich bei einer geringeren Anzahl positiver Zellen. Um diesen Fehler zu relativieren, wurden die Daten des AcB- und Staph-Modells logarithmiert ($\log_{10}x$). Im Anschluss wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt sowie grafisch mittels QQ-

Plots beurteilt, ob eine Normalverteilung vorliegt. Parametrische Daten wurden mittels Ordinary one-way ANOVA und anschließender multipler t-Tests analysiert, wobei die Sidak-Korrektur verwendet wurde (Sidak's multiple comparisons test).

Die Zahl der positiven Zellen / mm² analysierter Fläche ((+Z)/mm²) sind dargestellt als geometrische Mittelwerte (geom. MW). Differenzen zwischen den Gruppen sind als Faktoren bzw. in Prozent mit 95,00 % Konfidenzintervallen (KI) angegeben.

Der Anteil der affected Area an der Lungenparenchymfläche ist in % als Median mit Interquartilsabstand (IQA; 75% Quartil – 25% Quartil) dargestellt und wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Testes hinsichtlich signifikanter Unterschiede analysiert.

Signifikanzen sind in den Abbildungen durch Sternchen dargestellt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 Acinetobacter baumannii

4.1.1 Tatsächliche Gruppengröße

In der Tabelle 5 sind die Gruppengrößen dargestellt. Dabei ist zu erwähnen, dass 1 Tier aus der 24h-PBS-Kontrollgruppe (Tier Nr. 26*) nicht aus der Isoflurannarkose zur Applikation der Pufferlösung (12 h post infectionem) erwacht ist. Die Daten dieser Maus wurden bei den statistischen Auswertungen exkludiert.

Tabelle 5: Gruppengröße Acinetobacter-Modell

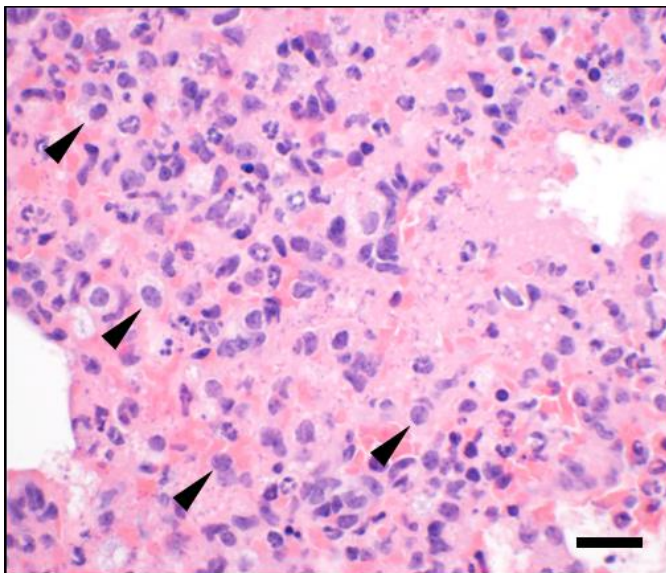
Gruppe	Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl der Tiere (n)
<i>A. baumannii</i>	24 h	Puffer	6
		Phagen	6
	48 h	Puffer	6
		Phagen	6
PBS	24 h	Puffer	3 (4)*
		Phagen	4
	48 h	Puffer	4
		Phagen	4

4.1.2 Modellspezifische histopathologische Kennzeichen der Acinetobacter-Pneumonie

Eine umfassende Beurteilung modellspezifischer histopathologischer Kennzeichen der *A. baumannii*-induzierten Pneumonie wurde bereits anhand von HE-Schnitten an Proben aus einem Vorversuch (intranasale Applikation von 5×10^8 CFU (RUH 2037)) durch eine erfahrene Fachtierärztin für Pathologie beschrieben. Diese stellte sich als stark expansive Bronchopneumonie mit eitrigen bis abszedierenden Charakter dar. Neben der vorrangigen Infiltration mit neutrophilen Granulozyten zeigten sich auch vermehrt Makrophagen. Es fanden sich zudem großflächige, nekrotische Areale und vaskuläre Thromben. Perivaskulär zeigte sich ein mittelgradiges Ödem, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten (Dietert et al., 2017).

Die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Proben zeigten in den veränderten Lungenarealen ebenfalls eine starke Makrophageninfiltration (Abb. 2), deren Phänotypen im Rahmen dieser Arbeit noch weiter charakterisiert werden sollten.

Eine umfassende histopathologische Beurteilung der hier verwendeten Proben wurde durch eine ECVP-qualifizierte Pathologin und eine erfahrene Fachtierärztin für Pathologie unseres Institutes durchgeführt und ist Teil einer anderen noch nicht publizierten Dissertation, deren Ergebnisse in Teilen auf wissenschaftlichen Kongressen vorab publiziert wurden (Wienhold et al., 2018a, Wienhold et al. 2018b; Wienhold et al., 2018c).



*Abb. 2: Makrophageninfiltration in der Lunge bei der Acinetobacter-Pneumonie
Makrophagen exemplarisch markiert (Pfeilspitzen), HE-Färbung, Tier Nr. 1 (439/17), 24 h p.
inf., Balken 20 μ m*

4.1.3 Anteil der affected Area

Ein wichtiger, quantitativer Parameter im Gebiet der Lungenforschung stellt die Schätzung des Anteils des betroffenen Lungengewebes dar (Dietert et al., 2018). Bei der vergleichenden Betrachtung der 4 Antikörper-Färbungen für das jeweilige Tier, zeigten sich lediglich geringgradige Schwankungen, der als affected Area ermittelten Flächen (Variationskoeffizienten der einzelnen Tiere im Median bei 14,8 % (21,5 – 10,7 % IQA)).

Die vergleichende Betrachtung der affected Areas dient auch als Qualitätskontrolle des Genie Algorithmus. Für die Färbungen wurden keine Serienschnitte angefertigt, jedoch liegen die

Schnittebenen nur wenige μm voneinander entfernt, sodass größere Abweichungen der absoluten Werte der affected Areas nicht zu erwarten sind. Treten große Unterschiede auf können diese hinweisend für einen fehlerhaften bzw. ungenauen Genie Algorithmus sein und die Analysen der Scans sollten nochmals überprüft werden. Geringfügige Unterschiede zwischen den affected Areas entstehen durch geringe, morphologische Abweichungen, da nie ein und dieselbe Schnittebene untersucht werden kann (multiple Schnitte vom Paraffinblock), sowie durch vereinzelt aufgetretene Faltenbildung des Schnittes und somit unscharf gescannte Bereiche, welche durch die Annotationen exkludiert werden mussten.

In der Abb. 3 ist die vom Genie Algorithmus erkannte „affected Area“ vergleichend für die 4 Antikörper dargestellt.

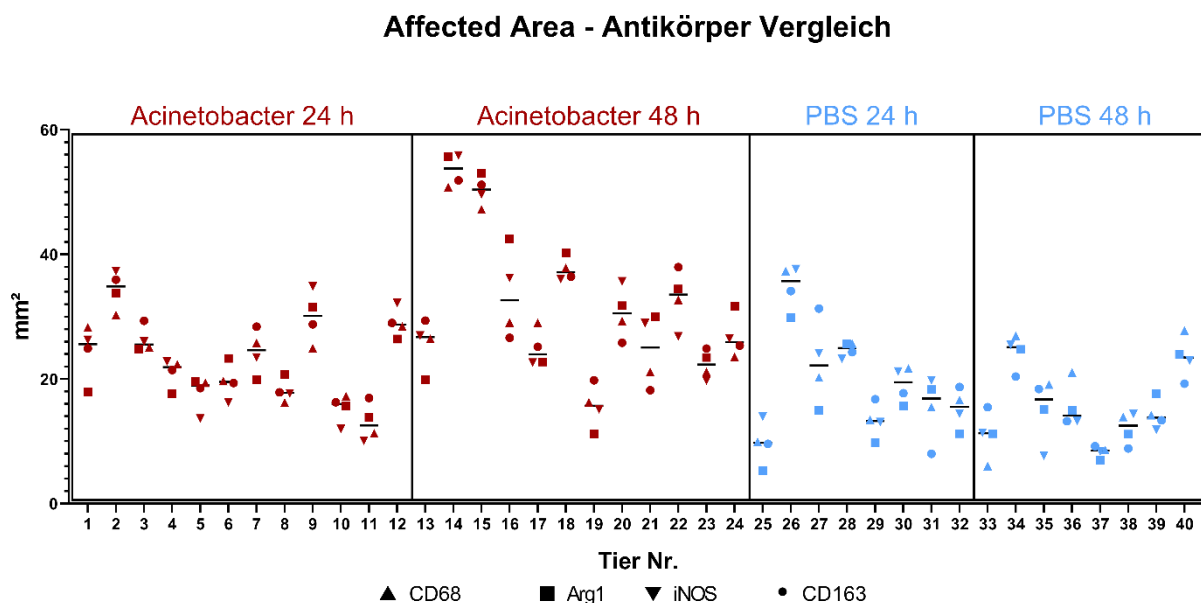


Abb. 3: Affected Area im Acinetobacter-Modell -Antikörper Vergleich

Fläche der vom Genie Algorithmus erkannten entzündeten Bereiche in mm^2 ; rot = Acinetobacter, blau = PBS, Linie = Median

Exemplarisch wird demnach der Anteil der affected Area an der gesamten Lungenschnittfläche anhand der Daten der CD68-Scans dargestellt (Abb. 4). Er betrug bei den infizierten Tieren im Median knapp die Hälfte der Lungenschnittfläche mit 42,56 % (50,72 – 32,73 % IQA) bei 24 h und 46,94 % (58,59 – 36,84 %) bei 48 h. Bei der PBS-Kontrollgruppe war zumeist nur knapp ein Drittel der Fläche betroffen mit 29,78 % (41,68 – 27,87 %) bzw. 28,98 % (50,03 – 18,06 %). Ein exemplarisches Übersichtsbild der detektierten Bereiche ist in der Abb. 5 für das Tier Nr. 1 dargestellt.

Das Tier Nr. 26 zeigte mit 92,11 % den höchsten Anteil der affected Area an der Gesamtlungenschnittfläche. Die Lunge zeigte eine hochgradige, eitrig und histiozytäre, interstitielle Pneumonie. Dieses Tier wurde aus der deskriptiven Statistik und grafischen Darstellung exkludiert, da es 12 h post infectionem nicht aus der Inhalationsnarkose zur Applikation des Puffers erwacht ist.

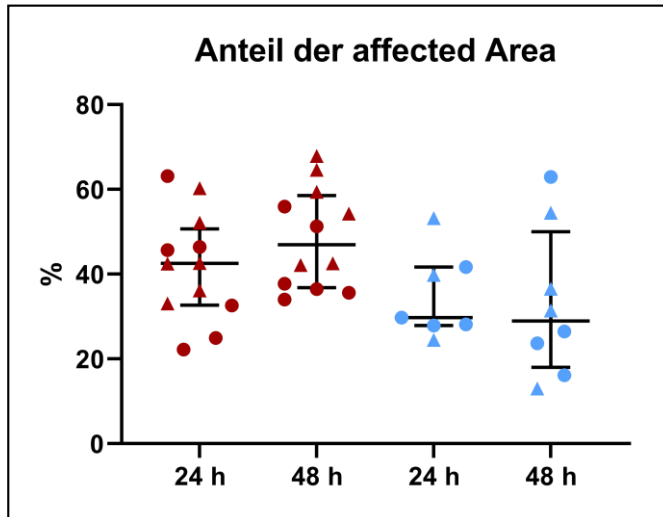


Abb. 4: Anteil der affected Area an der Gesamtschnittfläche der Lunge im Acinetobacter-Modell

• = Phagen, ▲ = Puffer, rot = Acinetobacter, blau = PBS; Darstellung Median mit IQA

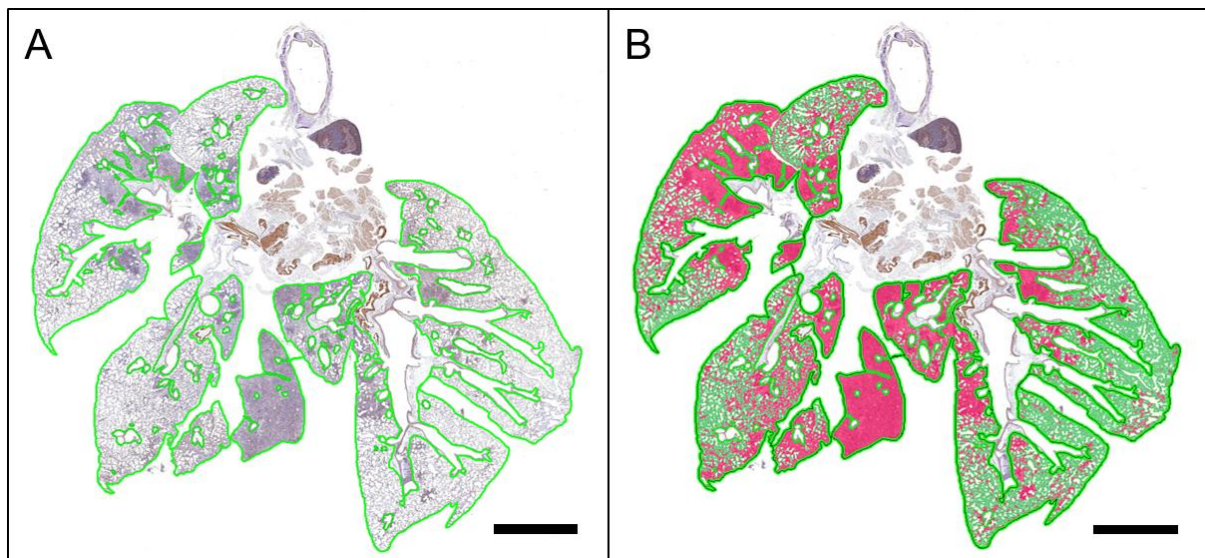


Abb. 5: Exemplarisches Übersichtsbild der Lunge im Acinetobacter-Modell

A) Annotierter Lungenscan; B) Geneie-Analyse: 52,2 % "affected Area" (rot), 38,8 % "unaffected Area" (grün), 9,0 % "glass" (gelb); IHC für CD68, A und B: Tier Nr. 1 (439/17), 24 h p. inf., Balken 2 mm

In den immunhistochemischen Färbungen zeigten alle Marker ein Zytoplasmasignal (Abb. 6).

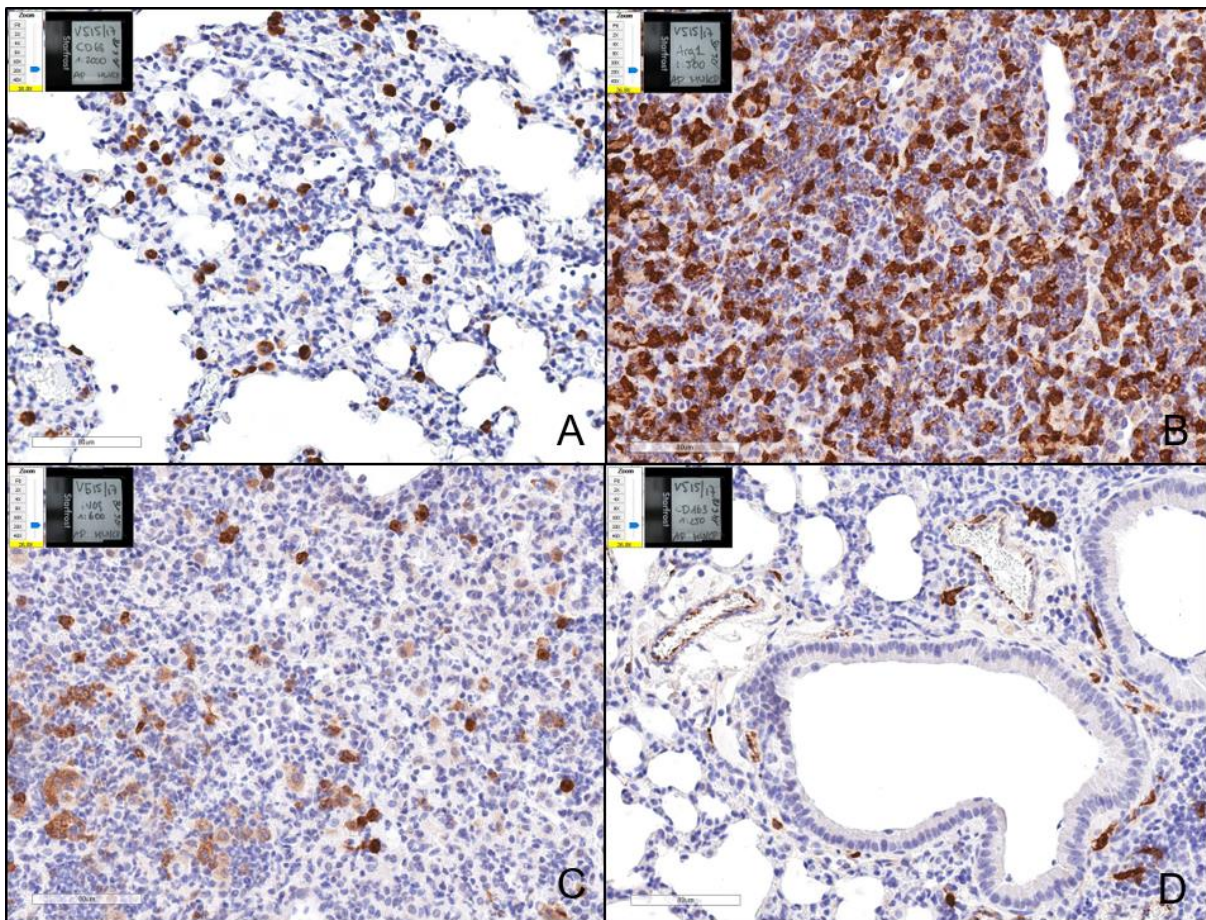


Abb. 6: Beispielhafte IHC-Färbungen im *Acinetobacter*-Modell

IHC verschiedener Antikörper: A) CD68, B) Arg1, C) iNOS, D) CD163; A-D: Tier-Nr. 23 (515/17) aus der 48h-AcB-Gruppe, Balken 80 μ m

4.1.4 CD68

Von 24 zu 48 h zeigte sich in der affected Area der AcB-Gruppen ein hoch signifikanter, 2,8-facher Anstieg der für CD68-positiven Zellen von 220,9 auf 614,4 (+Z)/mm² (KI der Differenz 5,2 – 1,5, $p < 0,001$, Abb. 7 A). Die PBS-Kontrollgruppe hatte bei 24 h einen nur geringfügig größeren Ausgangswert und zeigte bei 48 h etwas weniger positive Zellen als zuvor (24 h: 312,9 Z/mm², 48 h: 272,5 Z/mm², ns). Sehr ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Auswertung der gesamten Lungenparenchymflächen (exklusive „glass“, Abb. 7 H), mit einer entsprechend geringeren Zelldichte. In der unaffected Area wurden verglichen mit der affected Area insgesamt ca. 60 bis 40 % weniger positive Zellen pro mm² gezählt. Von 24 zu 48 h wurde bei den AcB-Gruppen in der unaffected Area nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der positiven Zellzahlen detektiert (1,7-facher Anstieg (2,8 – 1,0)). Unterschiede zwischen den 2 verschiedenen Behandlungsgruppen (Phagen vs. Puffer) fanden sich für CD68 nicht (Tabelle 12 im

Anhang). Sie sind in der Abb. 7 durch entsprechende Symbole dargestellt (Phagen (Kreis), Puffer (Dreieck)).

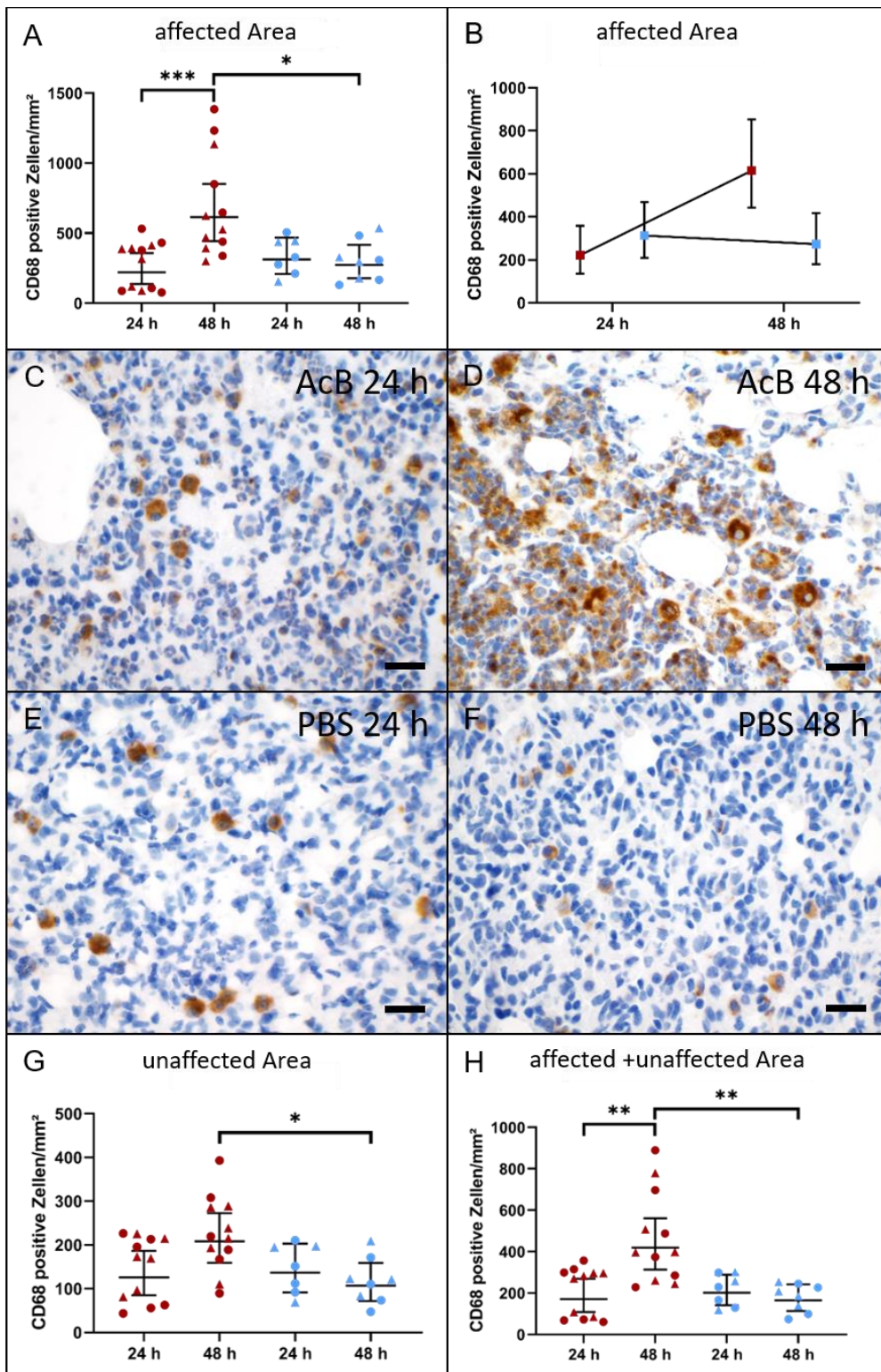


Abb. 7: Ergebnisse der IHC für CD68 im Acinetobacter-Modell

A-B, G-H: rot = Acinetobacter, blau = PBS, ▲ = Puffer, ● = Phagen, geom. MW mit 95% KI; B: ungepaarte Messungen; C-F: CD68-positive Zellen in der IHC-Färbung, Balken 20 µm

4.1.5 Arg1

Besonders in den stark verdichteten, entzündeten Arealen waren hochgradige Ansammlungen stark positiver Zellen sichtbar (Abb. 6 B sowie Abb. 8 C-F). In den entzündeten Lungenarealen konnte in der AcB-Gruppe ein 1,7-facher, hochsignifikanter Anstieg ($2,2 - 1,3$, $p < 0,001$) der für Arg1-positiv gefärbten Zellen von 24 zu 48 h hin beobachtet werden (24 h: $657,4 (+Z)/\text{mm}^2$, 48 h: $1106 (+Z)/\text{mm}^2$). Zudem lagen diese Werte 3,8-mal ($5,1 - 2,8$, $p < 0,001$, bei 24 h) bzw. 6,4-mal ($8,5 - 4,8$, $p < 0,001$, bei 48 h) höher als in den entsprechenden PBS-Kontrollgruppen, welche im zeitlichen Verlauf keinerlei Veränderung der Anzahl der positiven Zellen zeigten (24h-PBS: $172,6 (+Z)/\text{mm}^2$, 48h-PBS: $173,5 (+Z)/\text{mm}^2$). Verglichen mit den unaffected Areas wurden ca. 50 bis 80 % mehr positive Zellen pro mm^2 in den affected Areas gezählt. Für die unaffected Areas konnte lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der 48h-AcB und der 48h-PBS Gruppe ermittelt werden (Faktor 0,6 ($0,9 - 0,4$), $p = 0,015$, Abb. 8 H). Bei der Betrachtung der gesamten Lungenparenchymfläche zeigte sich ein ähnliches Bild zu den bereits bei den affected Areas beobachteten Verhältnissen. Auch bei diesem Antikörper war kein Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungen der Tiere mit Phagen oder Puffer erkennbar (Tabelle 13 im Anhang).

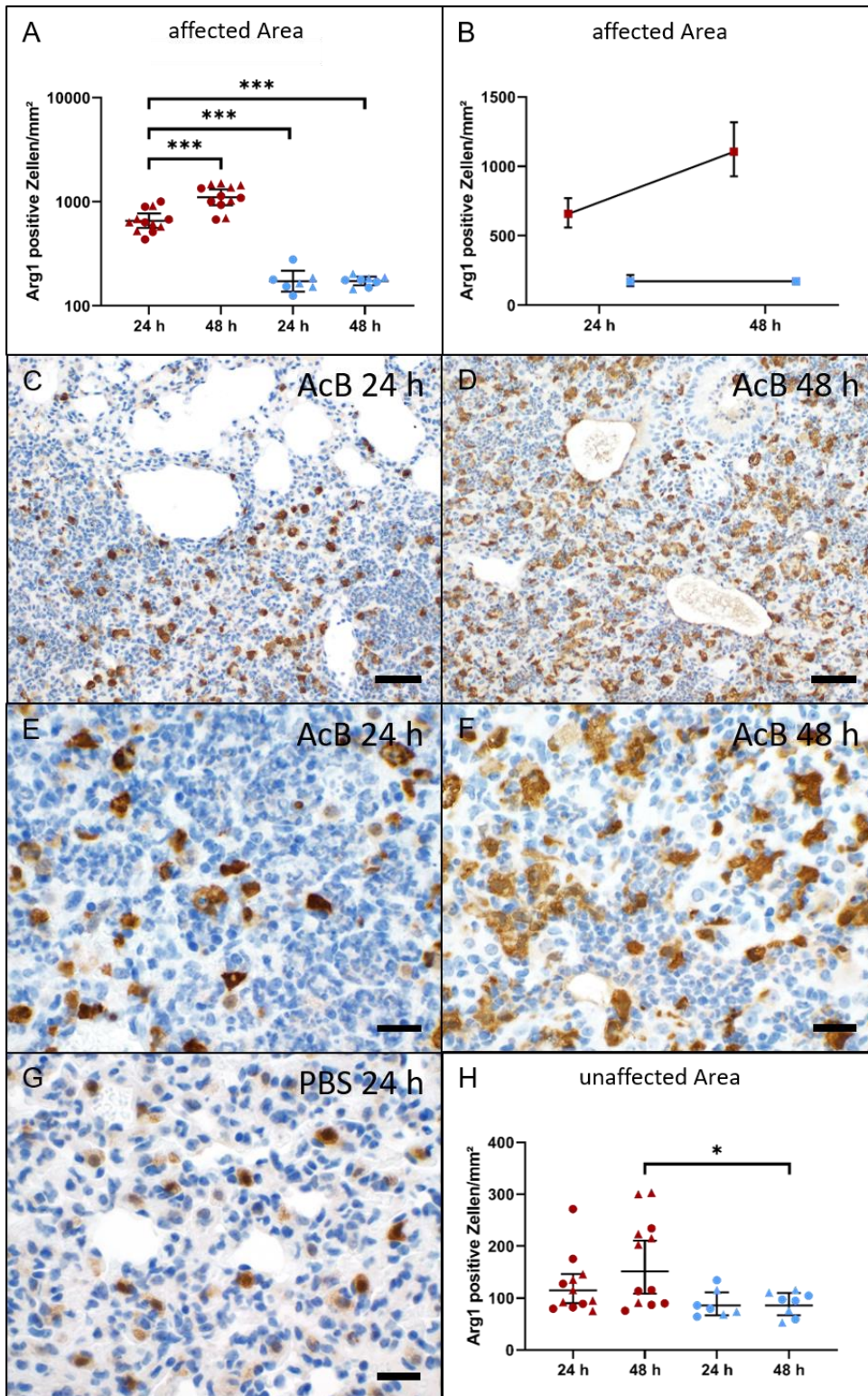


Abb. 8: Ergebnisse der IHC für Arg1 im Acinetobacter-Modell

A-B, H: rot = Acinetobacter, blau = PBS, ▲ = Puffer, ● = Phagen, geom. MW mit 95% KI; B: ungepaarte Messungen; C–G: Arg1 positive Zellen in der IHC-Färbung, Balken: C und D 50 μm , E-G 20 μm

4.1.6 iNOS

Im zeitlichen Verlauf konnte keine Veränderung der für iNOS positiven Zellsignale in den entzündeten Bereichen der AcB-Gruppen beobachtet werden (24 h: 161,9, 48 h: 191,2 (+Z)/mm²). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich aber zu den entsprechenden PBS-Kontrollgruppen, die nur sehr vereinzelt positive Zellen aufwiesen (5,7 (24 h) bzw. 2,8 (48 h) (+Z)/mm²). So entsprach die Anzahl positiver Zellen nur 4 % (8 – 2 %, 24 h) bzw. 2 % (3 - 1 %, 48 h) der jeweiligen AcB-Gruppe ($p < 0,001$). Hochsignifikante Unterschiede fanden sich zudem auch zwischen den entzündeten und den nicht entzündeten Bereichen. In den unaffected Areas der AcB-Gruppe konnten nur 13,0 (+Z)/mm² (24 h) bzw. 14,1 (+Z)/mm² (48 h) detektiert werden. In den affected Areas zeigten sich somit ca. 92 % (97 – 83 %, $p < 0,001$, 24 h) bzw. 93 % (97 – 84 %, $p < 0,001$, 48 h) mehr positive Zellen, als in den unaffected Areas. Bei den PBS Gruppen waren hingegen keine Unterschiede zwischen den affected und den unaffected Areas erkennbar. Auch bei diesem Antikörper konnte kein Unterschied zwischen den 2 verschiedenen Behandlungsgruppen (Phage oder Puffer) ermittelt werden (Tabelle 14 im Anhang).

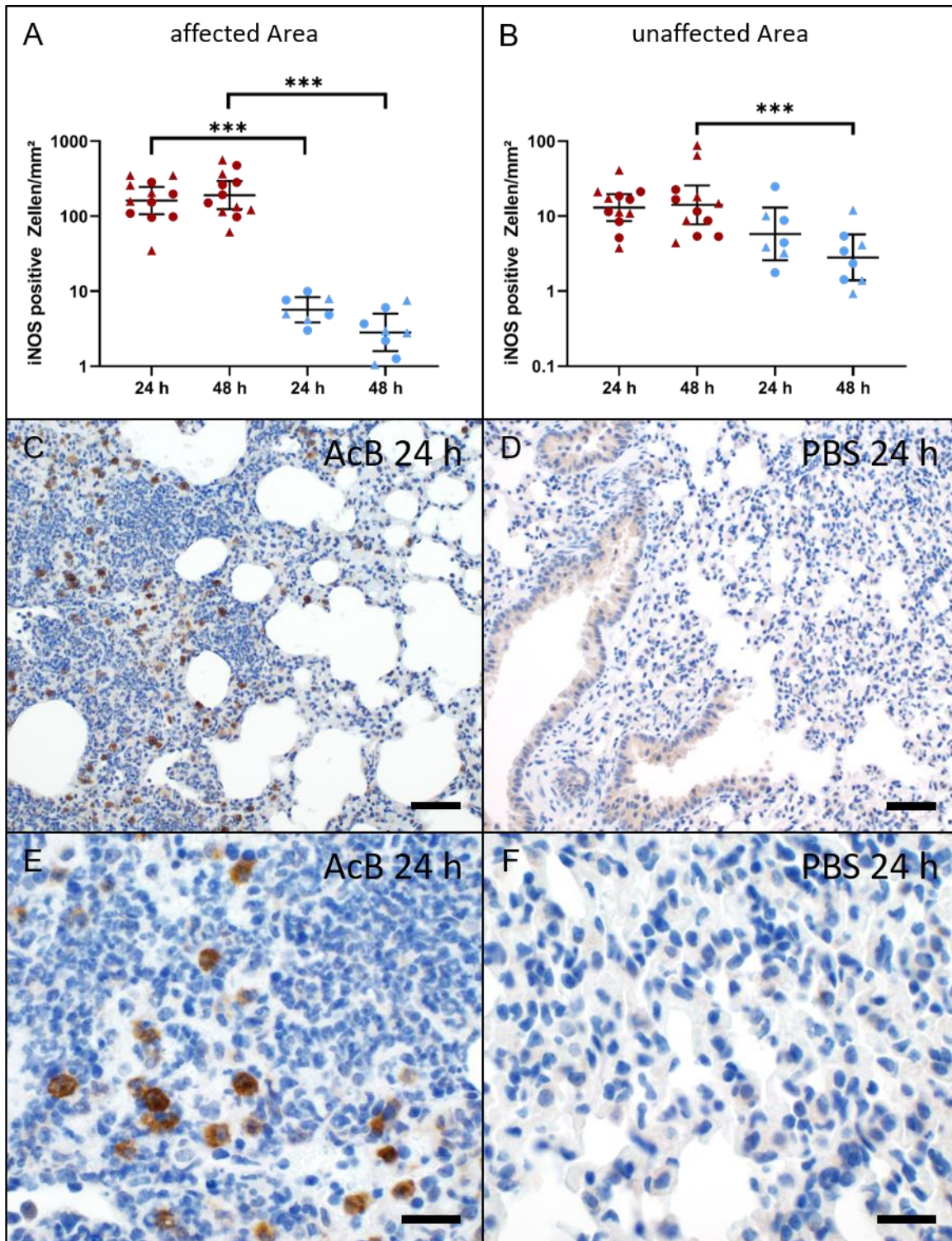


Abb. 9: Ergebnisse der IHC für iNOS im Acinetobacter-Modell

A-B: rot = Acinetobacter, blau = PBS, ▲ = Puffer, ● = Phagen, geom. MW mit 95% KI; C-F: iNOS positive Zellen in der IHC-Färbung, Balken: C und D 50 μ m, E und F 20 μ m

4.1.7 CD163

Die für CD163 positiven Zellen unterschieden sich deutlich durch ihr fast ausschließlich peribronchiales und perivaskuläres Verteilungsmuster von den übrigen Markern (Abb. 10 C). In den entzündeten Arealen fanden sich nur in der 48h-AcB-Gruppe bei 1 Tier (Nr. 14) vermehrt positive Zellen (Abb. 10 E). Dieses Tier hat auch mit 166 (+Z)/mm² Lungenparenchymfläche (affected plus unaffected Area) den höchsten Wert bei der Analyse erreicht. Weitere 4 Tiere derselben Gruppe und 1 Tier der 24h-AcB-Gruppe zeigten vereinzelt positive Signale im entzündeten Lungenparenchym. Dabei handelt es sich auffällig nur um Tiere aus den mit Puffer behandelten Gruppen. Die mit Phagen-behandelten Tiere zeigten keine positiven Zellsignale in den affected Areas (Abb. 10 F). Dieser Unterschied zwischen den 2 Behandlungsgruppen war bei der Auswertung der digital gezählten positiven Zellen/mm² jedoch nicht nachvollziehbar (Tabelle 6).

Beim Vergleich zwischen den mit AcB infizierten Tieren und den PBS-Kontrollgruppen zeigten die PBS-Gruppen mit 1,8- (2,4 – 1,3, 24 h) bzw. 1,6-mal (2,2 – 1,2, 48 h) mehr CD163-positive Zellen pro mm² affected Area einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$). Vergleicht man die CD163-positiven Zellen pro gesamter Lungenschnittfläche (affected + unaffected Area) ist dieser Unterschied jedoch nicht mehr erkennbar. Aufgrund des spezifischen Verteilungsmusters der vorrangig peribronchialen bzw. -vaskulären Signale, erschien eine alleinige Auswertung der affected Area als nicht repräsentativ, da die Werte stark von der Anzahl und Fläche der jeweils angeschnittenen Bronchien und Gefäße beeinflusst wurden. Aus diesem Grund wurde eine zusätzliche Auswertung der Bronchen und Bronchioli durchgeführt. Dafür wurden bei je 6 Tieren (zufällig ausgewählt, à 3 Phagen und 3 Puffer) pro Gruppe (24h-AcB, 48h-AcB, 24h-PBS, 48h-PBS) die kleineren Bronchioli und größeren Bronchen der entzündeten bzw. nicht-entzündeten Bereiche annotiert und nochmals mittels Nuclearcount analysiert, Übergangsbereiche (vom entzündeten hin zum nicht entzündeten Gewebe) wurden dabei ausgespart. Bei dieser alleinigen Analyse der luftleitenden Wege waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sowie zwischen Bronchioli und Bronchi erkennbar (Abb. 10 D).

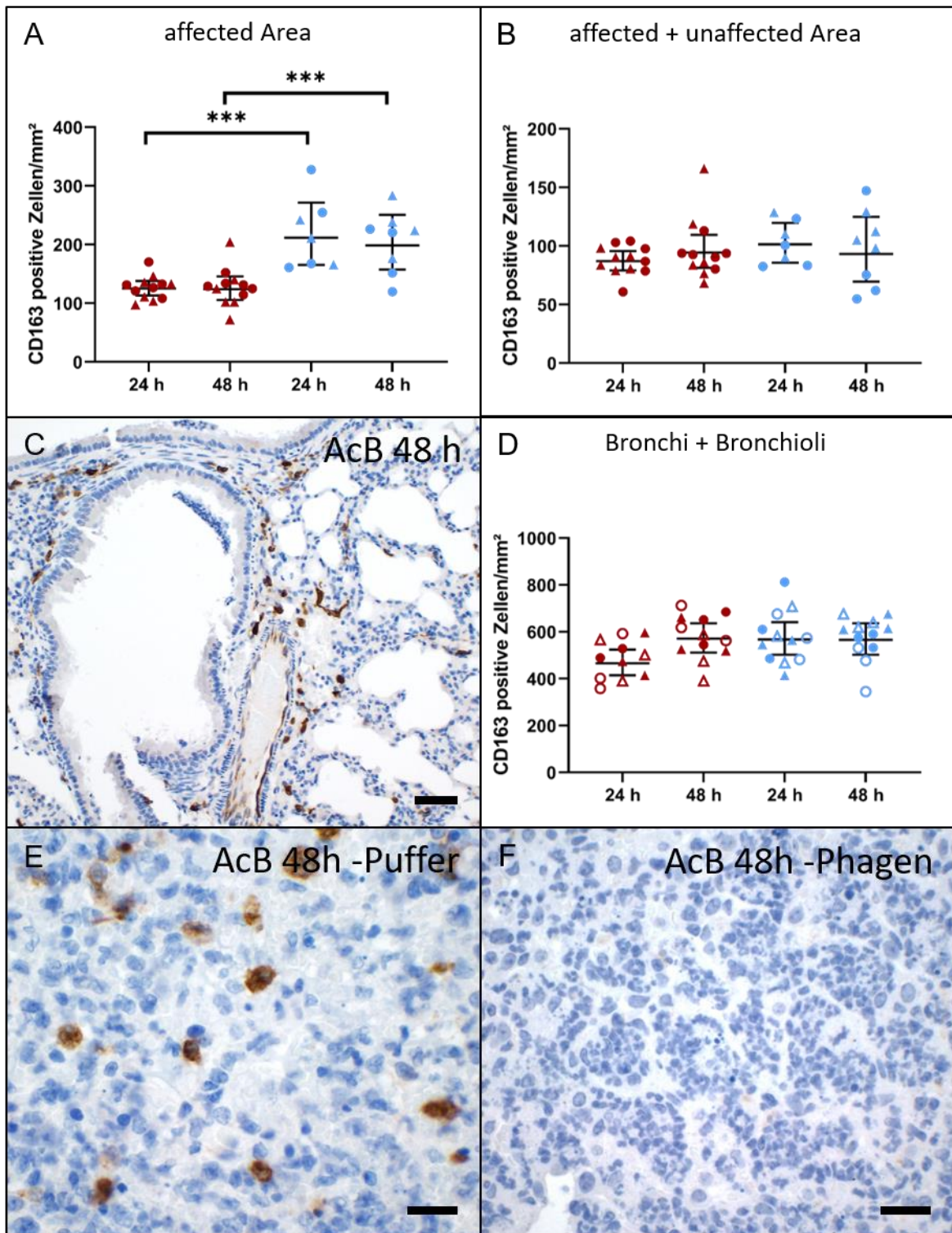


Abb. 10: Ergebnisse der IHC für CD163 im Acinetobacter-Modell

A, B und D: rot = Acinetobacter, blau = PBS, ▲ = Puffer, ● = Phagen, geom. MW mit 95% KI; D: gefüllte Symbole Bronchi, ungefüllte Symbole Bronchioli; C, E und F: CD163 positive Zellen in der IHC-Färbung, C und E: Tier Nr. 14 (442/17) 48h-AcB-Gruppe mit Phagenbehandlung, F: Tier Nr. 21 (501/17) 48h-AcB-Gruppe mit Pufferbehandlung; Balken: C 50 μm ; E und F 20 μm

Tabelle 6: Phagen- vs. Pufferbehandlung -CD163-positive Zellen/mm² Lungenparenchymfläche im Acinetobacter-Modell

	(+Z)/mm ² *		Faktor der Differenz	Oberes KI	Unteres KI	p-Wert
	Puffer	Phagen				
24h-AcB	87,1	87,2	1,00	1,42	0,71	>0,9999
48h-AcB	95,3	93,6	0,98	1,40	0,69	0,9999
24h-PBS	108,6	96,2	0,89	1,41	0,56	0,9354
48h-PBS	110,8	78,4	0,71	1,09	0,46	0,1556

*(+Z)/mm² Lungenparenchymfläche (affected plus unaffected Area), Geometrischer Mittelwert

4.2 Staphylococcus aureus

4.2.1 Tatsächliche Gruppengröße

In der Tabelle 7 sind die Gruppengrößen dargestellt. *Für den Arg1-Antikörper waren nur 3 Tiere aus der 24 h Staph-Gruppe auswertbar. Aufgrund unzureichenden FFPE-Materials musste von einer wiederholten Färbung dieses Tieres (Tier Nr. 1) abgesehen werden.

Tabelle 7: Gruppengröße Staphylokokken-Modell

Gruppe	Zeitpunkt	Anzahl der Tiere (n)
S. aureus	24 h	4 (3)*
	48 h	4
PBS	24 h	4
	48 h	4

4.2.2 Histopathologische Beurteilung

Eine umfassende histopathologische Beurteilung wurde wie auch für das AcB-Modell zuvor bereits durch eine erfahrene Fachtierärztin für Pathologie im Rahmen einer anderen Studie durchgeführt. In den HE Schnitten zeigte sich dabei eine nicht expansive Bronchopneumonie, welche jedoch multifokal ausgedehnter auftrat. Dominierend war eine Infiltration mit neutrophil-

len Granulozyten erkennbar, neben Makrophagen. Zudem fanden sich große nekrotische Bereiche mit Blutungen. Perivaskulär zeigten sich Lymphozyten und weniger neutrophile Granulozyten (Dietert et al., 2017). Diese Befunde konnten bei einer erneuten Sichtung bestätigt werden und sind exemplarisch in Abb. 11 dargestellt.

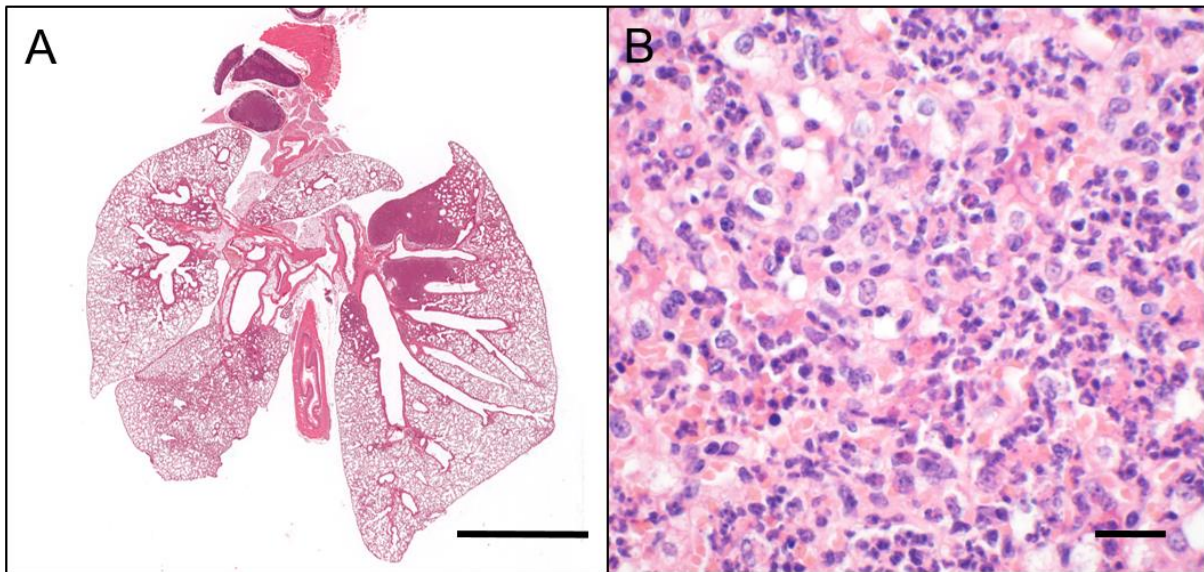


Abb. 11: Histopathologie der Staphylokokken-Pneumonie

A) Multifokale, betont Hilus-nahe Anteile der Lunge mit interstitieller, eitriger sowie histiozytärer Pneumonie, B) Hochgradige Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen; HE-Färbung, A und B: Tier Nr. 1 (932/13), 24h p. inf., Balken: A = 3 mm, B = 20 µm

4.2.3 Anteil der affected Area

Beim Vergleich der absoluten Werte der als affected Area erkannten Flächen für die 4 verschiedenen Antikörperfärbungen lagen die Variationskoeffizienten der einzelnen Tiere im Median bei 26,5 % (45,8 – 18,3 %). Im Staph-Modell zeigten sich somit etwas größere Abweichungen als sie im AcB-Modell beobachtet wurden. So fand sich zum Beispiel bei dem Tier Nr. 4 mit einem Variationskoeffizienten von 52,2 % eine größere Abweichung zwischen den 4 Schnitten. Bei genauerer Überprüfung zeigte sich in diesem Fall eine Unterschätzung der als affected Area erkannten Fläche in der Arg1-Färbung verglichen mit den 3 übrigen Antikörpern, was evtl. durch die etwas blasse Kerngegenfärbung des Schnittes erklärbar ist. Ähnliches Bild zeigte sich bei dem Tier Nr. 16 ebenfalls bei Arg1, sowie bei dem Tier Nr. 15 in der iNOS-Färbung (Abb. 12). Diese größeren Abweichungen wurden bei der weiteren Auswertung und Interpretation der Daten berücksichtigt. Weitere geringere Abweichungen ergaben sich aus den wie auch bereits beim AcB-Modell beschriebenen Gründen.

Affected Area - AK Vergleich

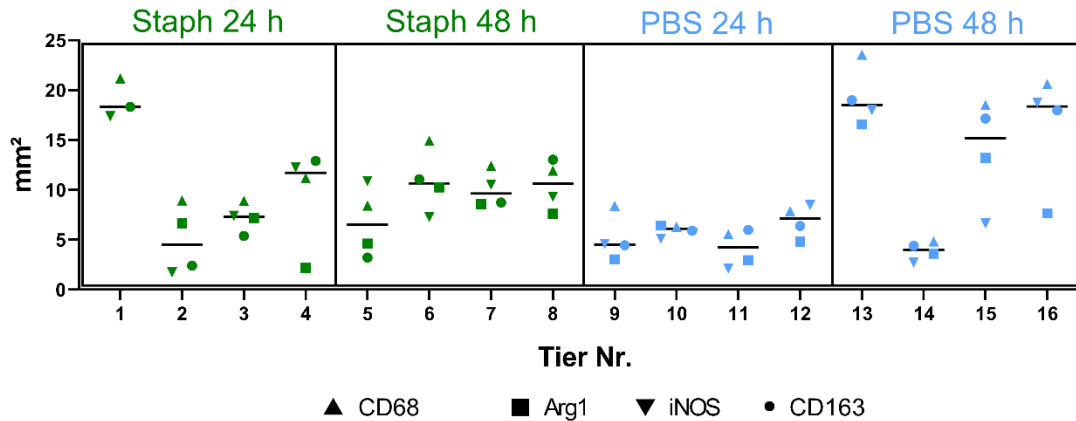


Abb. 12: Affected Area im Staphylokokken-Modell -Antikörper Vergleich

Fläche der vom Genie Algorithmus erkannten entzündeten Bereiche („affected Area“) in mm²; Linie = Median

Der Anteil der affected Area an der gesamten Lungenparenchymfläche wurde wie auch beim AcB-Modell exemplarisch anhand der Analysen der CD68-Scans ermittelt und ist in der Abb. 13 dargestellt. Er betrug bei den infizierten Tieren in der 24 h Gruppe im Median 18,1 % (37,5 – 13,9 %). Die Tiere der 48h-Staph-Gruppe zeigten mit 41,6 % einen etwa doppelt so hohen Anteil (55,0 – 33,1 %, ns). Die Kontrollgruppe hatte einen vergleichbaren Ausgangswert und zeigte bei 48 h sogar eine etwas stärkere Zunahme des Anteils der entzündeten Fläche (24 h: 17,0 % (17,2 – 14,7%), 48 h: 44,0 (55,4 – 31,4 %), p=0,046).

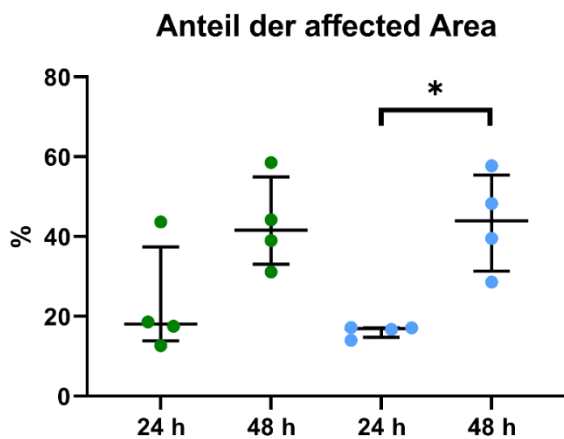


Abb. 13: Anteil der affected Area an der Gesamtschnittfläche der Lunge im Staphylokokken-Modell
grün = Staphylokokken, blau = PBS, Darstellung Median mit IQA

Alle Marker zeigten im Staph-Modell ebenfalls ein Zytoplasmasignal (Abb. 14).

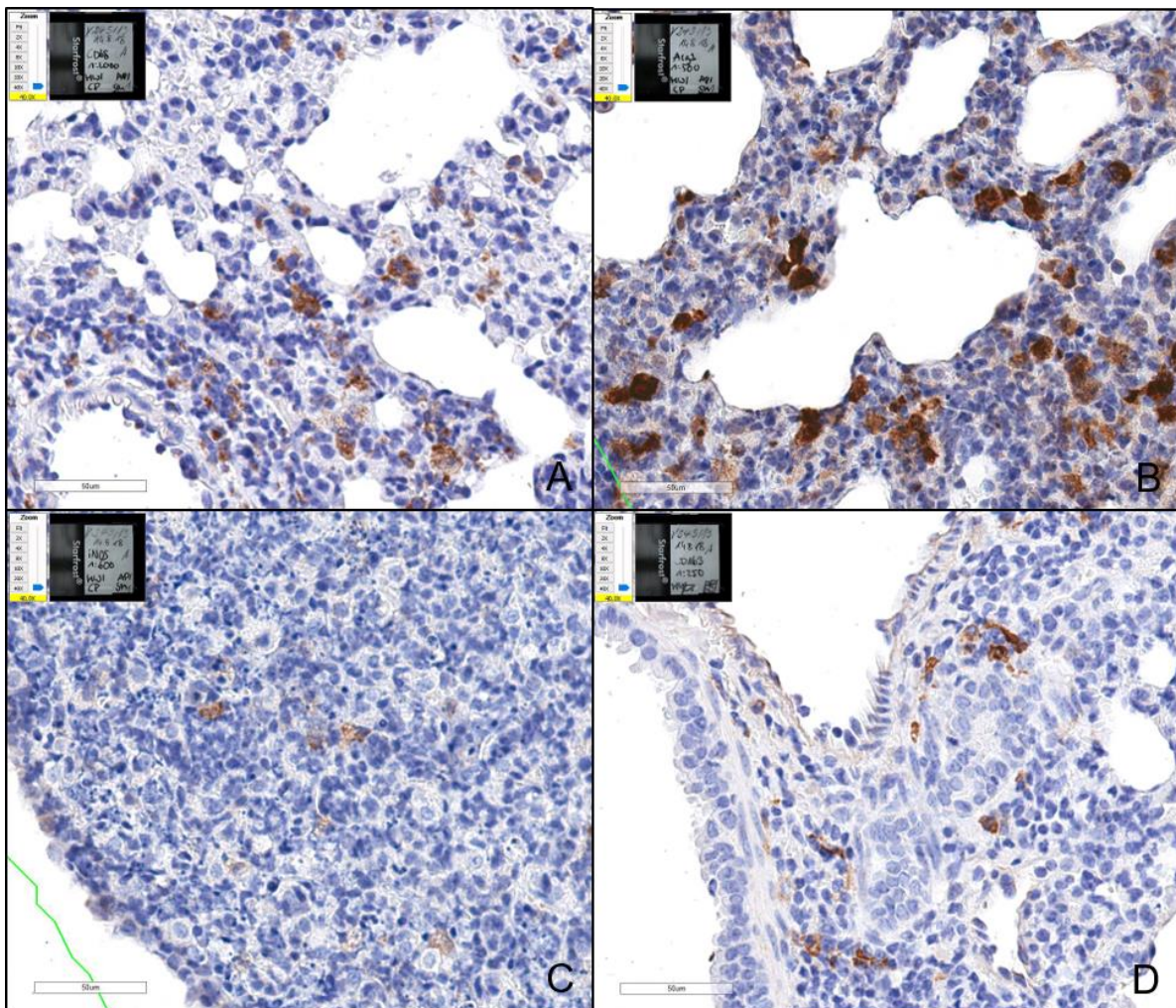


Abb. 14: Beispielhafte IHC-Färbungen im Staphylokokken-Modell

IHC verschiedener Antikörper: A) CD68, B) Arg1, C) iNOS, D) CD163; A-D: Tier-Nr. 7 (243/13) aus der 48h-Staph-Gruppe, Balken 50 μm

4.2.4 CD68

Bei den für CD68-positiven Zellen konnten im Staph-Modell keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die infizierten Tiere zeigten von 24 zu 48 h lediglich einen geringen, 1,4-fachen ($4,3 - 0,5$, ns) Anstieg der positiven Zellen in der affected Area (24 h: $96,4 (+Z)/\text{mm}^2$, 48 h: $135,6 (+Z)/\text{mm}^2$), Abb. 15 A und B). Im Vergleich dazu zeigten die 24h-PBS-Kontrolltiere einen nur geringfügig niedrigeren Ausgangswert, wobei die Anzahl der positiven Zellsignale zum 2. Zeitpunkt hin noch weiter abnahm (24 h: $85,0 (+Z)/\text{mm}^2$, 48 h: $69,8 (+Z)/\text{mm}^2$). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Auswertung der gesamten Lungenfläche (exklusive „glass“, Abb. 15 C). In den unaffected Areas waren in allen Gruppen weniger positive Zellen/ mm^2 als in den affected Areas nachweisbar. Am deutlichsten war

dies aber in der 48h-Staph-Gruppe, bei der in der unaffected Area etwa 60% (30 – 90 %) weniger CD68-positive Zellen/mm² detektiert wurden als in der affected Area (p=0,0054).

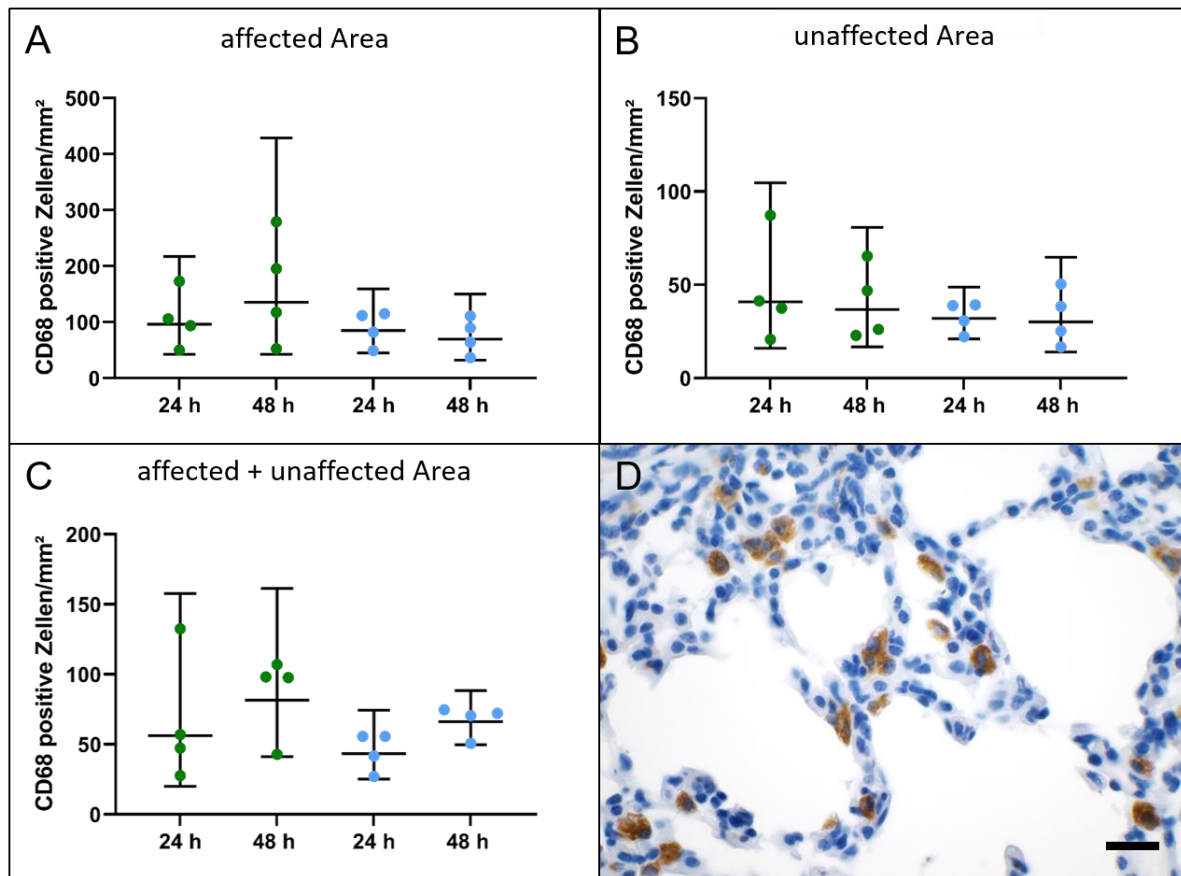


Abb. 15: Ergebnisse der IHC für CD68 im Staphylokokken-Modell

A-C: Grün = Staphylokokken, blau = PBS, geom. MW mit 95% KI; D: CD68 positive Zellen in der IHC-Färbung, Tier Nr. 1 (932/13) aus der 24h-Staph-Gruppe, Balken 20 µm

4.2.5 Arg1

Arg1-positive Zellsignale fanden sich deutlich konzentriert in den entzündeten Arealen (Abb. 16 A) der beiden Staph-Gruppen, in den PBS-Gruppen waren derartige Infiltrationen nicht erkennbar. In den unaffected Areas zeigten sich nur vereinzelte und zumeist nur schwach positive Signale. Bei der digitalen Analyse konnten bei den infizierten Tieren 183,4 (+Z)/mm² in der affected Area zum Zeitpunkt 24 h detektiert werden. 48 h post inf. zeigte sich ein ähnlicher Wert mit 163,0 (+Z)/mm² (Faktor 0,9, (2,3 - 0,4)). In den Kontrollgruppen lag die Zahl der positiven Zellen ca. 70 (+50 – (-30)%; 24 h) bzw. 60 % (+40 – (-30)%; 48 h) unter den Werten der entsprechenden Infektionsgruppe (Abb. 16 B). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Da der Algorithmus bei den Proben Nr. 4 und 16

(orange markiert in Abb. 16 B – D) die affected Area unterschätzt hat, wurde auch ein besonderes Augenmerk auf die Werte der gesamten Lungenschnittfläche gelegt (affected + unaffected Areas, exklusive der als „glass“ identifizierten Bereiche, Abb. 16 D), dabei konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden.

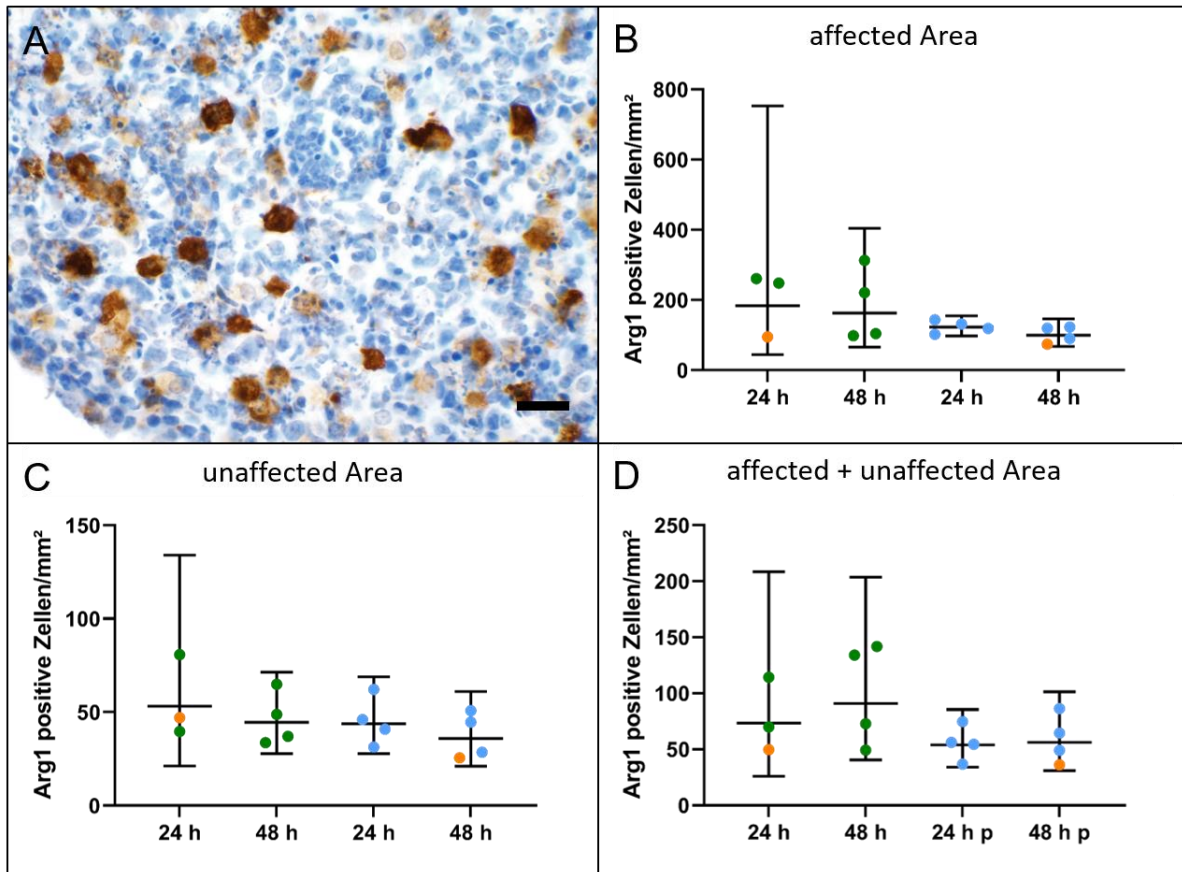


Abb. 16: Ergebnisse der IHC für Arg1 im Staphylokokken-Modell

A: Arg1 positive Zellen in der IHC-Färbung, Tier Nr. 1, Balken 20 μm ; B-D: Grün = Staphylokokken, blau = PBS, geom. MW mit 95% KI; B-D: Tier Nr. 4 (24h-Staph.) und Nr. 16 (48h-PBS) orange markiert

4.2.6 iNOS

Die Lungen im Staph-Modell zeigten auffallend wenig für iNOS positive Signale, was sich auch sehr deutlich durch die niedrigen Werte der digitalen Auswertung in allen Gruppen widerspiegelte. Lediglich in den stärker verdichteten Arealen der Staph-Gruppen zeigten sich sehr vereinzelt stark positive Zellen und einige wenige schwach positive Zellen (Abb. 17 A). Bei der digitalen Auswertung der Daten konnten jedoch nur die stark positiven Zellen berücksichtigt werden. In der 24h-Staph-Gruppe konnten bei einem Tier in einem fokal-expansiven, stark entzündeten Bereich der Lunge vermehrt iNOS-positive Zellen nachgewiesen werden (Tier Nr.

1, Abb. 17 B, orange markiert in Abb. 17 C und D), daneben zeigten sich aber auch weitere entzündete Areale ohne derartige Signale. Bei den infizierten Tieren waren mit 5,2 (24 h) bzw. 4,3 (48 h) +Z/mm² der affected Area zwischen den 2 Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede ersichtlich. In der PBS-Kontrollgruppe lagen die Werte mit 2,2 +Z/mm² (24 h) zu Beginn sogar noch etwas niedriger. In der 48h-PBS-Gruppe konnten mit 4,5 +Z/mm² etwa doppelt so viele positive Zellen detektiert werden (10,4 – 0,4-fach, ns). Für die unaffected Areas konnten mit 3,8 (24 h) und 3,5 (48 h) +Z/mm² für die Staph-Gruppen ähnlich niedrige Werte iNOS-positiver Zellen detektiert werden.

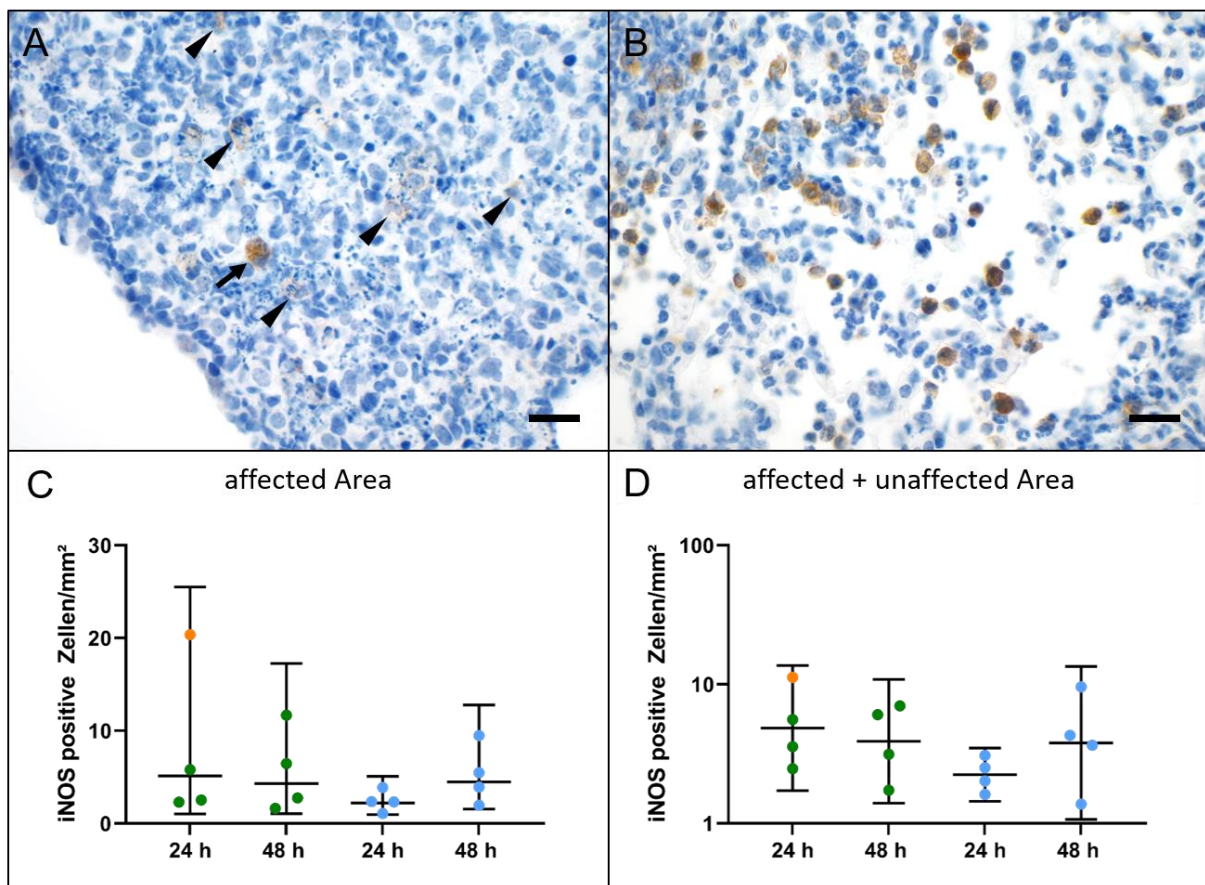


Abb. 17: Ergebnisse der IHC für iNOS im Staphylokokken-Modell

A - B: iNOS positive Zellen in der IHC-Färbung, Balken 20 μm, A: Tier Nr. 7 (48h-Staph), stark entzündetes und verdichtetes Lungenparenchym mit vereinzelter, stark positiver Zelle (Pfeil) und Nachweis einiger, schwach positiver Zellen (Pfeilspitzen), B: Tier Nr. 1 (24h-Staph), entzündetes Lungenparenchym mit multifokalem Nachweis stark positiver Zellen, C - D: Grün = Staphylokokken, blau = PBS, Tier Nr. 1 orange markiert, geom. MW mit 95% KI

4.2.7 CD163

Für CD163-positive Zellen zeigten sich wie auch im AcB-Modell fast ausschließlich perivaskulär und peribronchial (Abb. 18 A und D). Einzige Ausnahme stellte wiederum das Tier Nr. 1 aus der 24h-Staph-Gruppe dar, bei dem fokal in einem hochgradig entzündeten Areal mit Abszessformation positive Zellen nachweisbar waren (Abb. 18 B und C). Der Vergleich der positiven Zellen pro affected Area zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 19 A - B). Bei der Analyse der gesamten Lungenparenchymfläche (exklusive „glass“) ergab sich ein ähnliches Bild (Abb. 19 C). Auch bei diesem Modell wurden kleinere Bronchioli und größere Bronchen der affected bzw. unaffected Areas gesondert annotiert und die Analyse mittels Nuclearcount wiederholt (exklusive der „glass“- Bereiche). Hierbei waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erkennbar (Abb. 19 D). In einigen Lungenschnitten waren jedoch nicht alle oder z.T. nur vereinzelt alle 4 Annotationsgruppen (affected bzw. unaffected; Bronchioli bzw. größerer Bronchus) vorhanden, sodass dies zusätzlicher bei der Interpretation der ohnehin kleinen Datenmenge berücksichtigt werden muss.

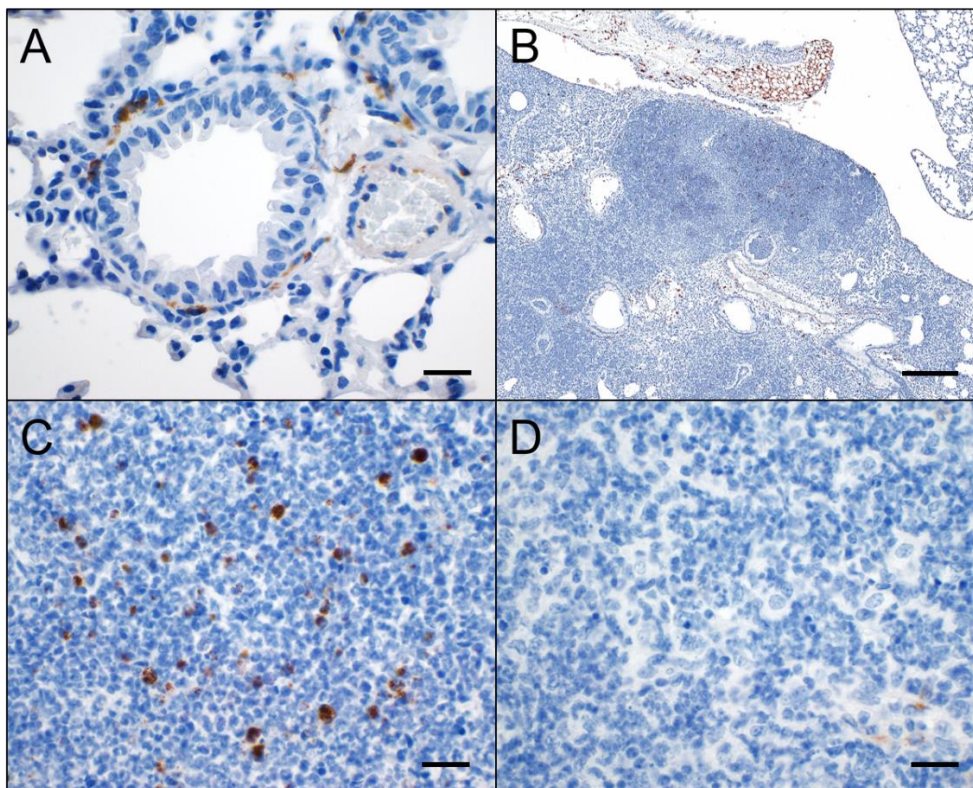


Abb. 18: CD163 IHC-Färbungen im Staphylokokken-Modell

A – D: CD163-positive Zellen in der IHC-Färbung, A: exemplarische perivaskuläre und –bronchiale Signale, Tier Nr. 10 (930/13, 48h-PBS), B-D: exemplarische affected Areas vom Tier Nr. 1 (932/13, 24h-Staph) mit positiven Signalen in der Abszessformation (B: Macroview, C: Detail) und ohne Signale in anderen entzündlichen Bereichen (D); A, C und D: Balken 20 μ m; B: Balken 300 μ m

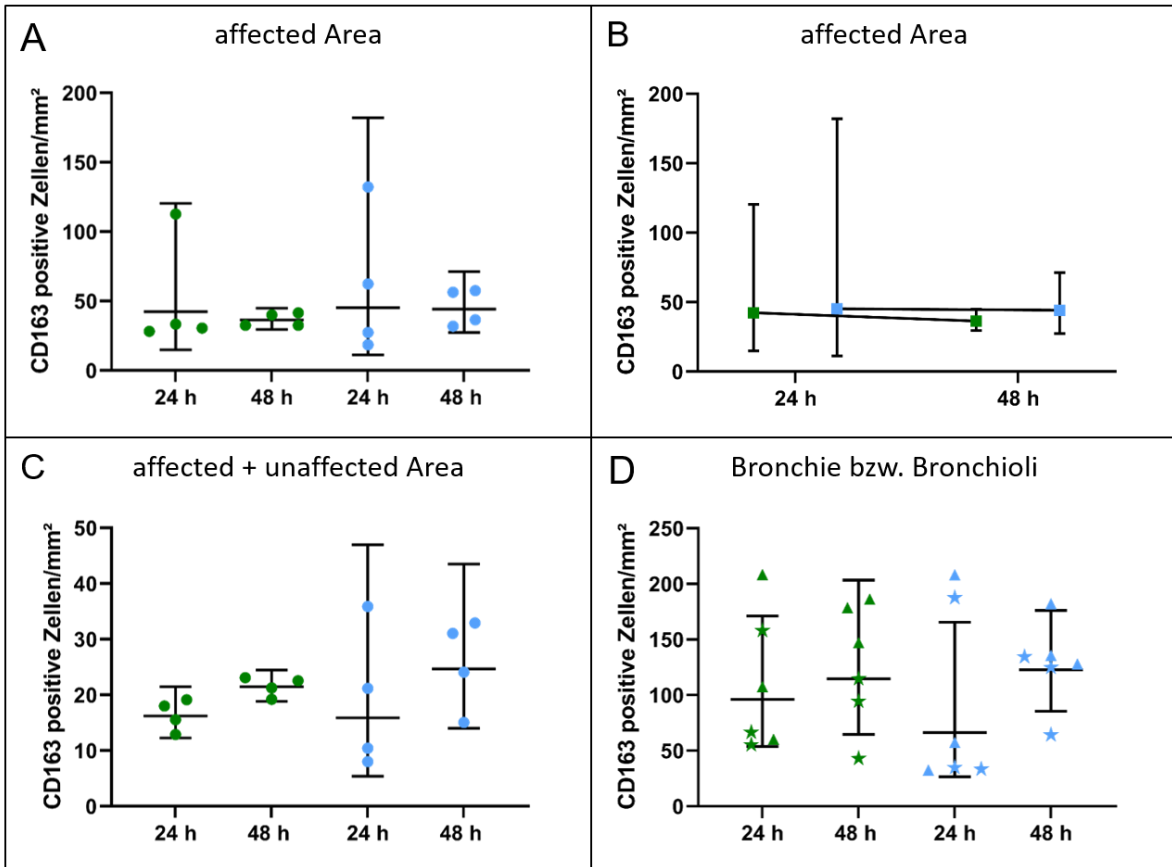


Abb. 19: Ergebnisse der IHC für CD163-positive Zellen im Staphylokokken-Modell
 A – D: grün = Staphylokokken, blau = PBS, Linie = geom. MW mit 95% KI; B: ungepaarte Messungen; D: CD163 positive Zellen/mm² der affected + unaffected Bronchie (▲) oder Bronchioli (★)

4.3 Antikörper im Vergleich

In der Tabelle 8 und Tabelle 9 sind die positiven Zellen/mm² Lungenparenchymfläche als geometrische MW für die jeweiligen AK gegenübergestellt. Zwar ist ein direkter 1:1 Vergleich nicht möglich, u.a. da jeder Algorithmus spezifisch für jeden AK in den beiden Modellen trainiert wurde, jedoch werden hierbei insbesondere die Dimensionen der detektierten Expressionen und auch Unterschiede zwischen den beiden Modellen deutlich. Besonders auffällig dabei ist die hohe Anzahl Arg1-positiver Zellen in den AcB-Gruppen, welche auch deutlich über den Werten der CD68-Färbungen liegt. Im Staph-Modell war dies weniger deutlich ausgeprägt. Neben Arg1 konnte insbesondere für den Marker iNOS ein großer Unterschied zwischen den Modellen ermittelt werden. Im Gegensatz zum AcB-Modell, bei dem eine deutlich erhöhte Expression von iNOS nachweisbar war, konnten im Staph-Modell wie auch in den PBS-Gruppen nur sehr vereinzelt positive Signale detektiert werden.

Tabelle 8: Antikörper im Vergleich im Acinetobacter-Modell

	+Zellen/mm ² gesamter Lungenparenchymfläche (exklusive „glass“)*			
Antikörper	24h-AcB	48h-AcB	24h-PBS	48h-PBS
CD68	171,3	419,5	202,0	165,7
Arg1	367,1	693,6	114,7	118,6
iNOS	78,9	111,4	6,0	2,8
CD163	87,1	94,4	101,4	93,2

*Geom. MW

Tabelle 9: Antikörper im Vergleich im Staphylokokken-Modell

	+Zellen/mm ² gesamter Lungenparenchymfläche (exklusive „glass“)*			
Antikörper	24h-Staph	48h-Staph	24h-PBS	48h-PBS
CD68	56,2	81,5	43,3	66,3
Arg1	73,4	90,9	53,9	56,1
iNOS	4,9	3,9	2,3	3,8
CD163	16,2	21,5	15,9	24,7

*Geom. MW

5 Diskussion

5.1 Makrophagen-Markeretablierung in der IHC und IF

Makrophagen zeigen ein ganzes Spektrum an unterschiedlichsten Aktivierungszuständen im lebenden Organismus, welche durch unzählige Faktoren der Umgebung, dem sog. Microenvironment stimuliert werden. In vitro Versuche sind (bislang) nicht in der Lage derart komplexe Interaktionen der Zellen mit ihrer Umgebung zu simulieren, sodass in vivo Studien weiterhin unverzichtbar sind um konkrete Abläufe des Immunsystems im Organismus zu untersuchen. Die möglichst genaue Kenntnis dieser stellt eine wichtige Grundvoraussetzung für gezielte, therapeutische Interventionen dar, die sich durch die unterschiedlichen Aktivierungszustände der Makrophagen bieten. Eine in situ Phänotypisierung von Makrophagensubtypen stellt die Wissenschaft jedoch vor zahlreiche Herausforderungen, sodass umfangreiche immunhistochemische Untersuchungsansätze bislang fehlen und zuverlässige in vitro Marker erst noch etabliert werden müssen.

Grundlegendes Ziel dieser Arbeit war eine umfangreiche Etablierung eines Panels verschiedener Makrophagenmarker zur in situ Phänotypisierung von Makrophagen in Entzündungsreaktionen im Mausmodell. Dazu wurden 23 verschiedene AK in murinen, akuten Entzündungsmodellen (1 Wundheilungsmodell und 3 Pneumoniemodelle) getestet. Von diesen 23 AK zeigten leider nur 4 AK (CD68, Arg1, iNOS und CD163) eine gute Qualität der Färbungen in den getesteten Modellen. Die übrigen 19 Antikörper lieferten trotz verschiedenster Vorbehandlungen und Verdünnungen in den getesteten Geweben nur unzureichende Ergebnisse, mit i.d.R. zu viel unspezifischen Hintergrundsignalen oder zu schwachen spezifischen Signalen und mussten daher exkludiert werden. Insbesondere die Lungenproben des Legionellen-Modells lieferten fast durchgängig qualitativ schlechtere Färbergebnisse aller Antikörper mit einer hohen unspezifischen Hintergrundfärbung. Ursächlich hierfür kommen insbesondere verschiedenste präanalytische Faktoren in Betracht, die einen Einfluss auf die Intensität und Ausmaße der Immunsignale sowie unspezifischer Hintergrundsignale nehmen und demnach möglichst standardisiert sein sollten. Zu diesen Faktoren zählen u.a. ein verzögerter Beginn der Fixierung, eine verlängerte Fixierdauer, die Konzentration und der pH-Wert des Fixationsmittels, die Bedingungen bei der Dehydratation, Reinigung und Paraffineinbettung der Gewebeproben sowie auch die Dauer und Temperatur bei der Trocknung der Schnitte bzw. der Lagerung ungefärbter Schnitte (Engel & Moore, 2011). Da die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe aus Archivmaterial (FFPE Gewebeblöcke) stammen und nicht selbst entnommen und aufbereitet wurden, lassen sich präanalytische Faktoren nicht mit letzter Sicherheit ausschließen, jedoch werden zu untersuchende wissenschaftliche Proben in unserem Institut seit Jahren

nach einem standardisierten Protokoll entnommen, fixiert und weiter bearbeitet. Auch ein möglicher Einfluss des Alters der Gewebeproben des Legionellen-Modells, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits 4 Jahre im Archiv eingelagert waren, wäre denkbar, erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da die Dauer der Lagerung von FFPE-Gewebeblöcken (im Gegensatz zu bereits geschnittenen Proben) laut Literatur bei den meisten Antigenen keinen Einfluss auf die Immunfärbung hat (Engel & Moore, 2011).

Zu den analytischen Faktoren zählen u.a. neben der Art der Vorbehandlung und der verwendeten AK-Verdünnung auch der Antikörper selbst. So haben beispielsweise polyklonale AK zwar eine höhere Affinität gegenüber dem Zielprotein, sind aber weniger spezifisch als monoklonale AK und liefern somit auch stärkere Hintergrundfärbungen (Ramos-Vara & Miller, 2014). In den hier getesteten Proben zeigten jedoch sowohl mono- als auch polyklonale AK geringe bis starke Hintergrundsignale.

Neben einem umfangreichen Makrophagenmarker-Panel in der IHC war auch die Etablierung von Doppelfärbungen in der IF geplant, da einzeln eingesetzte Marker wie iNOS und Arg1 keine sichere Identifizierung der Makrophagensubtypen erlauben (Barros et al., 2013). Leider zeigten die AK jedoch (bis auf Anti-CD68) in der IF trotz sehr hoher AK-Konzentrationen (1:10 bis 1:25) nur eine sehr geringe Signalstärke, die sich als zu schwach für eine Doppelfärbung darstellte. Bei der Interpretation der Daten muss demnach bedacht werden, dass die durchgeführten Analysen nicht allein für Makrophagen spezifisch sind, so färbten sich beispielsweise bei CD68, Arg1 und iNOS auch Endothel und Bronchialepithelien mehr oder weniger stark an, welche jedoch durch umfangreiche Annotationen exkludiert wurden.

Schließlich wurden die erfolgreich etablierten Marker CD68, Arg1, iNOS und CD163 in zwei unterschiedlichen, akuten Pneumoniemodellen (*A. baumannii* sowie *S. aureus*), eingesetzt und ihr zeitlicher Verlauf anhand zwei verschiedener Zeitpunkte (24 und 48 h post inf.) evaluiert.

5.2 Marker im Acinetobacter-Modell

5.2.1 CD68

Im AcB-Modell zeigte sich im zeitlichen Verlauf von 24 zu 48 h ein hochsignifikanter, 2,8-facher Anstieg der für CD68-positiven Zellen in den affected Areas. In den nicht entzündeten Bereichen waren im Gegensatz dazu nur etwa halb so viele Zellen/mm² positiv und es zeigte sich ein nur geringfügiger, nicht signifikanter Anstieg der positiven Zellsignale. In den PBS-Kontrollgruppen waren derartige Veränderungen nicht erkennbar. Somit fand sich insbesondere in den

entzündlich veränderten Arealen eine deutliche Infiltration mit CD68-positiven Zellen, die im zeitlichen Verlauf stark zunahm.

CD68 gilt in der Literatur als Pan-Makrophagenmarker, der alle Makrophagensubtypen anfärbt (Gordon et al., 2014; Wynn et al., 2013). Bei Mäusen sind neben Makrophagen zwar auch dendritische Zellen positiv für CD68, jedoch spielen diese bei Infektionen mit *A. baumannii* nur eine untergeordnete Rolle, da neutrophile Granulozyten und Makrophagen als Haupteffektorzellen gelten (Chen, 2020; Zaynagetdinov et al., 2013). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den detektierten CD68-positiven Zellen größtenteils um infiltrierende Alveolarmakrophagen handelt. Vergleichend finden sich in der Literatur vielfache Studien, in denen eine starke Infiltration mit AM bei experimentellen Infektionen mit *A. baumannii* beschrieben sind. So konnten beispielsweise Qiu et al. eine signifikante Infiltration mit AM 24 h post inf. in der BALF infizierter Mäuse detektieren (Qiu et al., 2012). Die Forschergruppe von Lee et al. zeigte in ihrem Modell mit dem Pan-Marker F4/80 ebenso eine deutliche Infiltration mit Makrophagen sowohl 24 als auch 48 h post inf. (Lee et al., 2020). In einer weiteren länger angelegten Studie zeigte sich mittels Durchflusszytometrie eine maximale Infiltration mit Makrophagen 3 d post inf., wobei die Makrophagenanzahl erst 7 Tage post inf. wieder die Ausgangswerte erreichte (Tsuchiya et al., 2012). Qui et al. zeigten zudem, dass die Depletion von AM z.B. mittels Clodronat-Liposomen u.a. zu einer vermehrten Bakterienlast führt, mit einer stärkeren Schädigung des Lungenparenchyms und einer erhöhten Mortalität der Tiere einhergeht (Qiu et al., 2012). Dies verdeutlicht die Bedeutung der AM für eine effektive Abwehr der Acinetobacter. Der Panmarker CD68 erlaubt dabei einen generellen Überblick über die Anzahl der infiltrierenden Makrophagen und kann bei der Einschätzung des Infektionsverlaufes hilfreich sein. Er sagt jedoch nichts über den Aktivierungsstatus der Makrophagen aus und spiegelt u.U. auch nicht die gesamte Makrophagenpopulation im Gewebe wider, was zu einer Unterschätzung der wahren Makrophagenanzahl führen könnte wie es in der Studie von Barros et al. beschrieben wurde (Barros et al., 2013).

Ein Unterschied zwischen den mit Phagen und den mit Puffer behandelten Tieren konnte nicht nachvollzogen werden.

Zusammenfassend war eine deutliche Infiltration mit CD68-positiven Alveolarmakrophagen in den entzündeten Bereichen der Lunge der Acinetobacter-infizierten Tiere erkennbar, die im zeitlichen Verlauf von 24 zu 48 h noch weiter anstieg.

5.2.2 Arg1

In den entzündlich veränderten Bereichen der Lunge konnten bei den Acinetobacter-infizierten Mäusen hochgradige Infiltrationen Arg1-positiver Zellen detektiert werden. Derartig starke Veränderungen waren bei keinem anderen AK sichtbar. In den affected Areas zeigte sich des Weiteren auch ein hochsignifikanter Unterschied zu den PBS-Kontrollgruppen, die etwa 75 bzw. 85% weniger Arg1-positiv Zellen aufwiesen. Zusätzlich fand sich beim Vergleich der beiden Acinetobacter-Gruppen auch ein hochsignifikanter, 1,7-facher Anstieg der für Arg1-positiven Zellen von 24 zu 48 h hin. Bei den PBS-Kontrollgruppen war eine derartige zeitliche Veränderung nicht erkennbar. Die Analysen der unaffected Areas ergaben verglichen mit den affected Areas 50 bis 80% weniger positive Zellsignale pro mm². Dabei zeigte sich lediglich zwischen der 48h-AcB- und der 48h-PBS-Gruppe in den unaffected Areas ein Unterschied. Der trainierte Genie-Algorithmus kann nur zwischen affected und unaffected Areas (sowie „glass“) unterscheiden. Diese Areas sind im Gewebe jedoch mehr oder weniger scharf voneinander abgegrenzt, sodass beispielsweise auch Übergangsbereiche mit nur sehr geringgradigen, entzündlichen Veränderungen vom Algorithmus als unaffected Area gewertet werden könnten. Dies könnte zu diesem geringfügigen Anstieg der Arg1-positiven Zellen in der 48h-AcB-Gruppe geführt haben.

Einen Einfluss einer Behandlung mit Phagen oder Puffer fand sich bei diesem Antikörper nicht. Arg1 wird bei Mäusen in der Lunge in geringerem Umfang auch von anderen Zellen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Alveolar- und Bronchialepithel, mononukleäre / lymphoide Zellen der Lymphknoten) exprimiert, wobei z.B. die distalen Alveolarepithelien nur eine sehr geringe bis keine Arg1-Expression zeigen (Hochstedler et al., 2013). Die Lymphknoten, größere Gefäße sowie Bronchien und Bronchioli wurden durch die Annotationen exkludiert und zudem wurden nur die stark positiven Zellen für die Auswertung herangezogen. Zusätzlich spricht die Morphologie der angefärbten Zellen dafür, dass es sich größtenteils um Makrophagen handelt. Eine eindeutige und sichere Zuordnung der Arg1-positiven Zellen könnte jedoch nur mittels einer Doppelfärbung mit einem Pan-Makrophagenmarker erfolgen, welche leider nicht erfolgreich etabliert werden konnte.

Die Expression von Arg1 stellt sich als klassisches Merkmal für M2-polarisierte Makrophagen dar, sodass Arg1 als Marker häufige Verwendung findet (Orecchioni et al., 2019; Semba et al., 2016; van den Bossche et al., 2016; Porta et al., 2015; Röszer, 2015; Martinez & Gordon, 2014; Biswas & Mantovani, 2010). In der Literatur finden sich bis dato keine Untersuchungen zur Expression von Arg1 im AcB-Modell. Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass sowohl gramnegative als auch grampositive, bakterielle Erreger eine recht einheitlich verlaufende Immunantwort des Körpers auslösen, die primär proinflammatorisch sowie bakterizid und somit vorrangig M1-dominiert ist und im späteren Verlauf zur Auflösung der Entzündung

durch die antiinflammatorischen M2-Makrophagen abgelöst wird (Benoit et al., 2008). Dies steht auch im Einklang mit den hier vorliegenden Daten, welche zu dem späteren Zeitpunkt deutlich mehr Arg1-positive Zellen gezeigt haben.

In einem anderen akuten, Bakterien-induzierten Pneumoniemodell mit *Pseudomonas aeruginosa* zeigte sich, dass die Arginaseproduktion von myeloische Zellen wesentlich zur Regulierung der Entzündungsreaktion beiträgt und Lungenparenchymschäden reduziert. Eine Deletion des Arginase-1-Gens myeloischer Zellen von C57BL/6 Mäusen führte dabei zu einer höheren Morbidität, vermehrter Entzündungszellinfiltration und einer verlängerten Rekonvaleszenz der Tiere, kontrovers dazu wurde bei BALB/c Mäusen ein schlechterer, klinischer Verlauf beobachtet (Haydar et al., 2021).

Zusammenfassend war eine hochgradige Infiltration mit Arg1-positiven Zellen in den entzündeten Bereichen der Lunge der AcB-infizierten Tiere erkennbar, die im zeitlichen Verlauf von 24 zu 48 h noch weiter anstieg und somit die Arbeitshypothese eines Zeit-assoziierten Phänotypenwechsels stützt. Bei den positiven Zellen handelt es sich aufgrund der Morphologie wahrscheinlich zu großen Teilen um AM, für eine zweifelsfreie Diskriminierung bedarf es jedoch einer Doppelfärbung mit einem Pan-Makrophagenmarker. Zudem stellt die alleinige Verwendung von Arg1 kein sicheres Differenzierungskriterium für M2-polarisierte Makrophagen dar. Dennoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse erstmals im AcB-Modell eine erhöhte Arginase-Aktivität der Zellen, die im zeitlichen Verlauf von 24 zu 48 h noch weiter ansteigt. Diverse Studienergebnisse in der Literatur deuten sowohl auf eine immunregulierende und heilungsfördernde als auch auf eine profibrotische Wirkungsweise einer gesteigerten Arginase-Expression hin, sodass ihre konkrete Rolle bei bakteriellen Pneumonien und insbesondere im AcB-Modell noch geklärt werden muss.

5.2.3 iNOS

Zwischen den AcB infizierten Tieren und den PBS-Kontrollgruppen zeigte sich in den affected Areas ein hochsignifikanter Unterschied der Anzahl iNOS-positiver Zellen. Dabei waren bei den infizierten Tieren mit 161,9 (24 h) und 191,2 (48 h) (+Z)/mm² knapp 30- bzw. 70-mal mehr iNOS-positive Zellen nachweisbar als in der entsprechenden Kontrollgruppe. In den PBS-Gruppen konnten demnach nur sehr wenig positive Zellen detektiert werden (5,7 (24 h) bzw. 2,8 (48 h) (+Z)/mm²). Ebenso zeigten sich in den unaffected Areas nur sehr vereinzelte iNOS-positive Zellsignale. Im Verlauf konnte zwischen den untersuchten Zeitpunkten von 24 und 48 h jedoch in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Wie auch bereits bei den Untersuchungen zu Arg1 ist eine zweifelsfreie Identifizierung der iNOS-positiven Zellen als Makrophagen mit der alleinigen Verwendung des iNOS-Antikörpers nicht möglich.

Jedoch spricht auch hier das morphologische Erscheinungsbild der positiven Zellen für einen zumindest großen Anteil an Makrophagen unter den iNOS-positiven Zellen. Des Weiteren zeigten sich auch bei diesem Marker keine Unterschiede zwischen einer Phagen- oder Puffer-Behandlung.

Acinetobacter gehört zu den gramnegativen Bakterien, deren äußere Membran zu großen Teilen aus LPS besteht, welches bei einer Infektion auch in großen Mengen freigesetzt wird (Lee et al., 2020). Paul-Clark et al. konnten zeigen, dass gramnegative *E. coli* über den TLR4, welcher der PRR für LPS ist, zur Expression von iNOS und einer TNF- α Produktion bei Makrophagen führen und sich damit von den TLR2-dominierten Immunreaktionen bei grampositiven Bakterien unterscheiden (Paul-Clark et al., 2006). So konnte ebenfalls für *A. baumannii* eine für die Immunabwehr essentielle TLR4-abhängige Aktivierung der Makrophagen belegt werden, die zu einer erhöhten Produktion von TNF- α , IL-6 und IL-12 sowie einer mRNA Expression von iNOS führt und somit einen M1-ähnlichen Phänotyp widerspiegelt (Kim et al., 2013). Qiu et al. konnten zudem in ihrer Mausstudie 24 h nach intranasaler Applikation der *A. baumannii* eine Rekrutierung und Aktivierung (Expression von CD80, CD86, MHCII) der AM nachweisen und in weiteren in vitro Studien eine erhöhte NO-Produktion zum Zeitpunkt von 24 und 48 h post infectionem in *A. baumannii*-infizierten Makrophagen belegen, wenn auch *A. baumannii* nur eingeschränkt empfindlich gegen den bakteriziden Effekt von NO zu sein scheint (Qiu et al., 2012). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den hier vorliegenden Ergebnissen einer AcB-assoziierten, erhöhten iNOS-Expression zum Zeitpunkt von 24 und 48 h.

Des Weiteren ist in der Literatur nach einer Stimulation mit LPS in Makrophagen eine Koexpression von Arg1 und iNOS beschrieben (Murray et al., 2014; Mori et al., 1998). Zwar wurde in der hier vorliegenden Studie keine direkte Koexpression in ein und denselben Zellen dargestellt (dies bedarf ebenfalls einer Doppelfärbung), jedoch konnten sowohl für Arg1 als auch für iNOS im Vergleich zu den PBS-Kontrollgruppen signifikant mehr positive Zellsignale detektiert werden, sodass eine Koexpression der beiden Marker in einigen Zellen ebenfalls möglich erscheint und vermutet werden könnte.

In einer Studie von Mould et al. konnten mittels single cell RNA sequencing in einem LPS-induzierten, akuten Lungenentzündungsmodell 5 verschiedene Transkriptionsmuster der AM identifiziert werden, welche vorrangig durch die Herkunft der AM geprägt waren. Dabei zeigten sich 3 Tage nach der LPS Instillation (zum Peak der Entzündung) insbesondere rekrutierte AM und diese wiesen eine erhöhte Expression M1-assoziiierter Gene auf. Residente AM hingegen zeigten sowohl unter homöostatischen Bedingungen (Tag 0) als auch bei starker Entzündung (Tag 3) eher eine erhöhte Expression M2-assoziiierter Gene. Wie bereits zuvor beschrieben, konnte auch hier ebenfalls eine LPS-induzierte Koexpression von Arg1 und iNOS in den Makrophagen detektiert werden. Eine Expression dieser beiden Marker war zu allen Zeitpunkten

(Tag 0, Tag 3 und Tag 6) nachweisbar, aber am stärksten an Tag 3. Zudem konnte keine Korrelation zwischen iNOS und M1- bzw. Arg1 und M2-assoziierten Genen nachgewiesen werden (Mould et al., 2019). Auch diese Ergebnisse passen zu den hier beobachteten AcB-assoziierten, hohen iNOS- bzw. Arg1-positiven Zellzahlen. Zudem könnte anhand der Studie von Mould et al. vermutet werden, dass eine Analyse zum Zeitpunkt 32 h post inf. weiterhin hohe Werte für beide Marker liefert und es sich bei den positiven Zellen vermutlich größtenteils um rekrutierte und nicht um residente AM handelt.

Eine Infektion mit gramnegativen Bakterien ist jedoch weitaus komplexer, als eine rein isolierte Stimulation mit LPS, sodass neben dem TLR4 auch andere PRR (wie z.B. Dectin-1) an der Erkennung und Phagozytose bakterieller Strukturen beteiligt sind und ebenfalls einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus der Makrophagen nehmen können (Röszer, 2015; Taylor et al., 2005).

Zusammenfassend konnte sowohl zum Zeitpunkt von 24 als auch 48 h post infectionem ein AcB-assoziiertes, deutlich erhöhtes Gehalt iNOS-positiver Zellen in den entzündeten Lungenarealen detektiert werden, deren Morphologie größtenteils für Makrophagen spricht und eine Infiltration dieser vermutet werden kann. Dies konnte jedoch aufgrund der fehlenden Doppelfärbung nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Im zeitlichen Vergleich der iNOS-positiven Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen 24 und 48 h. Somit kann die Arbeitshypothese, dass zu einem früheren Zeitpunkt (24 h) mehr iNOS-positive Zellen vorhanden sind, als zu einem späteren Zeitpunkt (48 h), für den M1-assoziierten Marker iNOS im AcB-Modell nicht belegt werden. Die Auswahl der Zeitpunkte konnte leider nicht beeinflusst werden, da ausschließlich Archivmaterial für diese Arbeit zur Verfügung stand. Hier wären zusätzliche Zeitpunkte äußerst wünschenswert gewesen. Beispielweise zur Darstellung initialer Vorgänge nach 12 h, 3 Tage als mutmaßlicher Peak sowie 4 und 6 Tage zur Darstellung der regenerativen Phase.

A. baumannii ist als gramnegatives Bakterium reich an LPS, welches Makrophagen zur Koexpression von Arg1 und iNOS anregt. Dies kann demnach die hier gleichzeitig beobachtete, hohe Expression von Arg1 und iNOS erklären, sodass insbesondere diese beiden Marker zur Diskriminierung von M1- bzw. M2-ähnlichen Makrophagensubtypen in Infektionsmodellen mit gramnegativen Bakterien als ungeeignet erscheinen.

5.2.4 CD163

Die für CD163-positiven Zellen unterschieden sich in ihrem Verteilungsmuster deutlich von den anderen verwendeten Markern und konnten bei allen Gruppen betont peribronchial und

perivaskulär nachgewiesen werden. Im entzündlich verdichteten Lungenparenchym waren bei allen Gruppen, bis auf bei einigen Tieren der Puffer-behandelten AcB-Gruppen keine CD163-positiven Zellen erkennbar. So zeigten die PBS-Gruppen bei der digitalen Zählung der affected Areas zwar 1,8- bzw. 1,6-mal mehr positive Zellen/mm², jedoch ist dieser Unterschied bei der Analyse der gesamten Lungenparenchymfläche nicht mehr nachvollziehbar. Dies kann durch das beobachtete Gefäß- und Bronchien-assoziierte Verteilungsmuster und dem Fakt, dass die infizierten Tiere eine absolut größere entzündliche Fläche haben (ca. 40 bis 50 % der Lungenschnittfläche im Vergleich zu ca. 30 % bei den PBS-Gruppen), die für die Berechnung der positiven Zellen/mm² verwendet wird, erklärt werden. Demnach wird zur Interpretation der CD163-Färbungen die Analyse der gesamten Parenchymfläche (exklusive „glass“) herangezogen. Bei dieser waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen und Zeitpunkten erkennbar. Des Weiteren ergab sich bei dem beschriebenen Verteilungsmuster die Frage, ob die positiven Zellen eher zentral entlang größerer Bronchien / Gefäße oder eher peripher entlang kleinerer Bronchioli / Gefäße gelegen waren, sodass diese Bereiche durch eine zusätzliche Annotation untersucht wurden. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den Bronchien oder Bronchioli, den Zeitpunkten sowie auch zwischen den beiden Behandlungsgruppen-Gruppen (Phage vs. Puffer) ermittelt werden.

Bei 5 Tieren aus der 48h-AcB-Puffer-Gruppe und 1 Tier aus der 24h-AcB-Puffer-Gruppe waren, im Gegensatz zu allen anderen Tieren, vereinzelt positive Zellsignale im verdichteten Lungenparenchym erkennbar, die jedoch zu gering waren, als dass sie bei der digitalen Auswertung ins Gewicht gefallen wären. Zeit-assoziierte Veränderungen konnten demnach mit Hilfe der digitalen Zählung nicht nachgewiesen werden, jedoch könnten die Beobachtungen bei den Puffer-behandelten Gruppen hinweisend für einen dezenten Anstieg der CD163-positiven Zellen zum Zeitpunkt 48h post inf. in den entzündeten Bereichen sein, sodass die Arbeitshypothese für CD163 in diesem Modell auch nicht widerlegt werden kann. Zudem zeigte sich somit scheinbar auch ein Einfluss der Phagentherapie auf die CD163-Expression.

Bis dato sind keine anderen Studien zur Expression von CD163 im Zusammenhang mit AcB-Infektionen bekannt. Fabrick et al. konnten jedoch zeigen, dass CD163 sowohl grampositive (*S. aureus* und *Strep. mutans*) als auch -negative Bakterien (*E. coli*) bindet und somit eine Rolle bei der Erkennung von Pathogenen spielt sowie auch einen Einfluss auf die Zytokinproduktion hat (Fabrick et al., 2009). Im Gegensatz zu antiinflammatorischen Signalen, führen proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IFN- γ sowie auch eine Stimulation mit LPS zu einer reduzierten Expression von CD163 in den AM (Abdullah et al., 2012). Bei einer Infektion mit gramnegativen Bakterien, wie in diesem Fall *Acinetobacter*, wäre demnach sogar in den PBS-Kontrollgruppen im Vergleich zu den AcB-Gruppen eine höhere Zelldichte CD163-positiver Zellen denkbar gewesen. Diese konnte bei der Analyse der gesamten Parenchymflächen jedoch nicht nachvollzogen werden.

In der Literatur wurde eine hohe Expression von CD163 insbesondere bei chronischen Erkrankungen (wie z.B. Sarkoidose oder COPD) sowie in der Heilungsphase von akuten Entzündungen oder von Wunden nachgewiesen. Zudem ist eine erhöhte Expression des Rezeptors durch antiinflammatorische Signale wie Dexamethason und IL-6 beschrieben, sodass CD163 als Marker für M2-Makrophagen gilt (Abdullah et al., 2012). Sehr interessant wäre demnach auch die Analyse von Gewebeproben der Heilungsphase des AcB-Modells, z.B. 4 und 6 Tage post infectionem, in der ein Anstieg CD163-positiver Zellen möglich erscheint.

Wie auch in dieser Arbeit konnten Yamazato et al. in ihrer Lungenstudie bei Ratten ebenfalls eine hauptsächlich perivaskuläre Verteilung der CD163-positiven Zellen sowohl geringgradig in den Kontrollgruppen und vermehrt auch in den Behandlungsgruppen ihres Mono crotalin-induzierten Modells der pulmonalen Hypertension nachweisen. Dabei reduzierte eine intratracheale Applikation autologer Knochenmarkszellen die Gefäßumbauvorgänge und Entzündungsreaktionen der Lunge und war assoziiert mit vermehrt nachweisbaren, perivaskulären CD163-positiven Zellen und einem erhöhten IL-10-Gehalt. Dies spricht ebenfalls für die vasculoprotektive und immunregulatorische Funktion der CD163-positiven Zellen, welche der Aktivität M2-ähnlicher Makrophagen entspricht (Yamazato et al., 2018). Eine ähnlich protektive Wirkung der perivaskulären CD163-positiven Zellen kann demnach auch im AcB-Modell vermutet werden. Darüber hinaus beschrieben Gibbins et al. erstmals 3 definierte Subtypen interstitieller Makrophagen, die unter homöostatischen Bedingungen in der Mauslunge existieren. Diese waren u.a. durch eine hohe Expression von CD163 und weiterer Monozyten-assoziiierter Gene gekennzeichnet, welche auf ihren monozytären Ursprung hindeuten. Alle IMs waren ausschließlich im bronchialen Interstitium und in bronchovaskulären Bündeln lokalisiert. AM, die im steady state vorrangig nicht monozytären Ursprungs sind, exprimierten im Gegensatz dazu kein CD163 (Gibbins et al., 2017). Dieses Verteilungsmuster der IMs stimmt mit dem hier vorgefundenen überein und lässt vermuten, dass es sich bei den hier detektierten CD163-positiven Zellen ebenfalls um IMs handelt und evtl. um (phänotypisch sehr ähnliche) rekrutierte Monozyten.

Zusammenfassend konnte kein Anstieg der Anzahl CD163-positiver Zellen von 24 zu 48 h mittels digitaler Zählung im AcB-Modell nachgewiesen werden. Es ergaben sich jedoch Hinweise in der pufferbehandelten AcB-Gruppe, die für eine Zeit-assoziierte Zunahme CD163-positiver Zellen in den entzündeten Bereichen sprechen und demnach weitere Untersuchungen, z.B. mit anderen Zeitpunkten post infectionem zur fundierten Evaluierung der Arbeitshypothese im AcB-Modell nötig erscheinen lassen. Zudem fanden sich Anzeichen für eine Phagentherapie-assoziierte, reduzierte CD163-Expression in den entzündeten Arealen. Aufgrund des betont perivaskulären und peribronchialen Verteilungsmusters der CD163-positiven Zellen kann vermutet werden, dass es sich hierbei um IMs und evtl. auch rekrutierte Monozyten handelt. Die genaue Rolle dieser Zellen im Rahmen der AcB-Infektion bleibt unklar und geht auch

über die Reichweite dieser Arbeit hinaus, jedoch erscheint eine antiinflammatorische und immunregulatorische Wirkung der CD163-positiven Zellen im AcB-Modell denkbar.

5.3 Marker im Staphylokokken-Modell

Im Staph-Modell zeigten sich verglichen mit dem AcB-Modell in den Lungen zumeist deutlich schwächer ausgeprägte Pneumonien. Für die 4 untersuchten Antikörper konnten in diesem Modell keine signifikanten Unterschiede zwischen den Infektions- und den PBS-Kontrollgruppen bzw. zwischen den untersuchten Zeitpunkten ermittelt werden. Jedoch erschweren in diesem Modell insbesondere die kleinen Gruppengrößen eine zuverlässige Interpretation der Daten. Dennoch lassen sich anhand geringfügiger Unterschiede gewisse Tendenzen erkennen und geringe Unterschiede vermuten.

5.3.1 CD68

Für den Pan-Makrophagenmarker CD68 konnte zwischen den Staph-Gruppen lediglich ein sehr geringer, nicht signifikanter Anstieg der CD68-positiven Zellen/mm² von 24 zu 48 h hin sowohl für die affected Area als auch für die gesamte Lungenparenchymfläche detektiert werden. Die Zunahme der als affected Area erkannten Bereiche der Lunge von 24 zu 48 h in den Infektionsgruppen (ns, da ein Tier bereits zum Zeitpunkt von 24 h großflächigere Entzündungen zeigte) belegt eine Expansion und somit Verschlimmerung der Lungenentzündung im zeitlichen Verlauf, bei der eine konstant erhöhte Makrophagedichte nachweisbar war. Des Weiteren zeigte die 48h-Staph-Gruppe im Vergleich zur 48h-PBS-Gruppe etwa doppelt so viele CD68-positive Zellen/mm² (0,2 – 1,5, ns) in der affected Area, wobei dies durch die große Streuung der Werte ebenfalls statistisch nicht signifikant war. Die zur Kontrolle durchgeführte PBS-Applikation führte somit, wie auch im AcB-Modell, ebenfalls zu einer Immunreaktion, die jedoch im Vergleich mit den infizierten Tieren schwächer ausgeprägt war. Für PBS-Kontrolltiere ist eine hilusnahe Infiltration mit Makrophagen beschrieben. In anderen Studien konnte in den PBS-Kontroll-Lungen insbesondere eine Infiltration mit T-Zellen, neben einigen Makrophagen und B-Zellen nachgewiesen werden (Dietert et al., 2014, 2018).

Makrophagen spielen bei Infektionen mit *S. aureus* insbesondere bei der Initiation und Koordination der Immunabwehr eine elementare Rolle (Pidwill et al., 2021). Sie selbst besitzen eine Vielzahl an Rezeptoren um Bestandteile grampositiver Bakterien, wie z.B. Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren zu erkennen und senken nachweislich bereits 5 h post inf. die Bakterienlast in der Lunge (Yajjala et al., 2016; Plüddemann et al., 2006). In der Literatur ist zusätzlich eine

Rekrutierung und Aktivierung weiterer Makrophagen durch die Freisetzung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie GM-CSF, M-CSF, monocyte chemotactic protein 1, macrophage inflammatory protein 3 α , IL-6, IL-1 β und IL-8 für murine Infektions-Modelle mit *S. aureus* beschrieben (Pidwill et al., 2021).

Der Verlauf der *S. aureus*-induzierten Pneumonie im murinen Modell wird dabei maßgeblich durch die verwendete Infektionsdosis und der Virulenz des verwendeten Stammes bestimmt (Yajjala et al., 2016; Wardenburg et al., 2007). Bei der hier intranasal applizierten Dosis von 5×10^7 CFU des Stammes Newman handelt es sich um eine sublethale Dosis. Wardenburg et al. schilderten bei ihren Versuchen für 8×10^7 CFU respiratorische Symptome bei allen Tieren, welche aber bereits 48 h p. inf. wieder abgeklungen waren. Eine histologische Auswertung fand leider nur für eine Gruppe mit einer Infektionsdosis von 3 bis 4×10^8 CFU statt, in der bereits 6 h nach der Applikation eine geringfügige Infiltration mit Immunzellen nachweisbar war. Sowohl 24 als auch 48 h post inf. zeigte sich eine starke Infiltration mit Immunzellen. Zudem konnten alveoläre Destruktionen, sowie auch eine Proliferation der Erreger in Form von großen Bakterienherden 24 h post inf. nachgewiesen werden. Nach 48 h waren diese Bakterienherde nicht mehr nachweisbar und es zeigten sich wieder vermehrt belüftete Bereiche (Wardenburg et al., 2007). Derartige Bakterienwolken waren bei der hier verwendeten Infektionsdosis nicht erkennbar, zudem zeigte sich 48 h post inf. eine Ausdehnung der Pneumonie und noch keine Hinweise für eine Genesung. Interessant wäre demnach auch in diesem Modell die Untersuchung zusätzlicher Zeitpunkte, sowohl in der Initialphase, z.B. 6 h post inf. als auch zu späteren Zeitpunkten (z.B. 4 und 6 Tage post inf.) zur umfassenderen Darstellung des Verlaufes der Immunreaktion und Rekrutierung CD68-positiver Zellen.

Zusammenfassend konnte eine erhöhte Anzahl CD68-positiver Zellen in den entzündlich veränderten Arealen der *S. aureus* infizierten Tiere detektiert werden. Von 24 zu 48 h post inf. konnte in den Infektionsgruppen im entzündeten Lungenparenchym eine konstant erhöhte Makrophagendichte ermittelt werden, wobei der Anteil der affected Area der Lunge in der Zeit zunahm und für eine Expansion der Pneumonie spricht.

5.3.2 Arg1

Im Staph-Modell konnte ähnlich zu dem AcB-Modell, wenn auch etwas schwächer, ebenfalls eine vermehrte Ansammlung Arg1-positiver Zellen in den entzündlich verdichteten Bereichen der Lunge nur in den Infektionsgruppen, nicht aber bei den PBS-Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Damit übereinstimmend war auch die Anzahl der digital detektierten Arg1-positiven Zellen pro mm² Lungenparenchymfläche in den Staph-Gruppen größer, als in den PBS-

Gruppen, wobei aber, mutmaßlich aufgrund der geringen Gruppengrößen, kein statistisch signifikanter Unterschied belegt werden konnte. Die Analyse der gesamten Parenchymfläche (exklusive „glass“) zeigte zwischen den Staph-Gruppen einen geringfügigen, 1,3-fachen Anstieg der Arg1-positiven Zellen von 24 zu 48 h hin, welcher jedoch nicht signifikant war, die PBS-Werte blieben hingegen mit 53,9 (24 h) bzw. 56,5 (48 h) Arg1-positiven Zellen/mm² auf einem sehr konstanten Niveau.

Humane AM zeigen in der Initialphase einer Infektion mit *S. aureus* einen proinflammatorischen, M1-ähnlichen Aktivierungszustand, der 12 h post inf. durch eine erhöhte Sekretion von TNF- α , IL-6 und IL-8 gekennzeichnet ist und somit eine robuste proinflammatorische Immunantwort auslöst. Bereits 24 h post inf. wiederum zeigen die AM eine Verringerung ihrer proinflammatorischen Zytokinproduktion und entwickeln im weiteren Verlauf der Infektion häufiger einen M2-ähnlichen Phänotyp, der durch *S. aureus* gefördert wird. Dieser ist gekennzeichnet durch eine geringere mikrobizide Aktivität und begünstigt somit das intrazelluläre Überleben der Bakterien (Brann et al., 2019). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Makrophagen nach Stimulation mit Hitze-abgetöteten *S. aureus* einen M2b-ähnlichen immunregulatorischen Phänotyp entwickeln, der u.a. durch eine TLR2-abhängige, gesteigerte Expression von IL-10, Arg1 aber auch iNOS und TNF- α gekennzeichnet war und mutmaßlich durch die Peptidoglykane der Bakterienwand getriggert wurde (Frodermann et al., 2016). Dies steht im Einklang mit dem vorliegenden Nachweis vermehrter Arg1-positiver Zellen in den entzündeten Bereichen der Staph-infizierten Tiere. Wiederum wären auch hier zusätzliche Untersuchungszeitpunkte höchst interessant. Zu erwarten wäre demnach eine deutlich geringere Anzahl Arg1-positiver Zellen zum Zeitpunkt 12 h im Vergleich zum Zeitpunkt von 24 h post inf..

Pang et al. konnten in ihrer Maus-Studie nach intravenöser Infektion mit *S. aureus* eine gesteigerte Expression von Arg1 und in geringerem Maße der NOS Isoenzyme in der Leber, den Nieren und im Blut nachweisen und ermittelten zudem dass eine Metaboliten-Applikation (L-Prolin, L-Isoleucin, L-Leucin, and L-Valin) zur Inhibition der Arginase-Aktivität führte, was aufgrund einer erhöhten phagozytotischen Erregerelimination zugleich mit einem protektiven Effekt einherging (Pang et al., 2020).

Zusammenfassend konnte eine *S. aureus*-assoziierte, vermehrte Expression von Arg1 insbesondere in den entzündlich verdichteten Lungenarealen nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten ergaben sich jedoch nicht. Somit kann die Arbeitshypothese, dass zum Zeitpunkt 48 h post inf. mehr Arg1-positive Zellen nachweisbar sind, als zum Zeitpunkt von 24 h post inf. für Arg1 im Staph-Modell nicht bestätigt werden. Wie auch bereits bei dem AcB-Modell diskutiert, ist eine zweifelsfreie Identifikation der Arg1-positiven Zellen als Makrophagen hierbei ebenfalls nicht möglich. Die genaue Rolle von Arg1 bei Infektionen mit *S. aureus* ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch kann vermutet werden,

dass eine erhöhte Aktivität der Arg1 zur vermehrten Proliferation der Erreger sowie zur Immunevasion führen kann und somit mit einem ungünstigeren Infektionsverlauf assoziiert ist und demnach eine gezielte Inhibition dieser Enzymaktivität als Therapieansatz denkbar erscheint.

5.3.3 iNOS

Im Gegensatz zu dem AcB-Modell konnten im Staph-Modell in allen Gruppen nur sehr vereinzelt iNOS-positive sowie schwach positive Zellen nachgewiesen werden. Lediglich bei einem Tier aus der 24h-Staph-Gruppe waren fokal in einem hochgradig entzündlich veränderten Lungenbereich deutlich vermehrt positive Zellsignale erkennbar. Auch zwischen den entzündlich veränderten und unveränderten Bereichen waren keine signifikanten Unterschiede ersichtlich. Wie auch im AcB-Modell zuvor kann auch hier keine zweifelsfreie Identifikation der iNOS-positiven Zellen als Makrophagen erfolgen, wenngleich die Morphologie bei der Mehrheit der Zellen hinweisend dafür ist.

S. aureus zählt anders als *Acinetobacter* zu den grampositiven Bakterien, deren Zellwände nicht aus LPS sondern zu großen Anteilen aus Peptidoglykanen und Lipoteichonsäuren bestehen. Diese werden vom Immunsystem insbesondere durch den TLR2 erkannt (Paul-Clark et al., 2006; Plüddemann et al., 2006). Paul Clark et al. wiesen in ihren in vitro Studien an murinen Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen unterschiedliche Effekte durch grampositive und gramnegative Bakterien bzw. LPS-Stimulation nach. Dabei zeigte sich nach 24 h bei den mit *S. aureus* behandelten Makrophagen über die Aktivierung des TLR2 eine erhöhte Produktion von TNF- α und erst nach 48 h eine TNF- α -abhängige Produktion von iNOS. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation mit *E. coli* oder LPS über den TLR4 bereits nach 24 h zu einem erhöhten Gehalt von iNOS (TNF- α unabhängig) und TNF- α (Paul-Clark et al., 2006). Eine Stimulation mit TNF- α führt neben IFN- γ und LPS bei Makrophagen wiederum zu einem proinflammatorischen M1-ähnlichen Aktivierungszustand, welcher durch eine vermehrte Produktion von iNOS gekennzeichnet ist (Röszer, 2015). Demnach wäre auch konträr zu der Arbeitshypothese eine TNF- α getriggerte Zunahme der iNOS-positiven Zellsignale von 24 zu 48 h denkbar gewesen, welche hier aber ebenfalls nicht nachweisbar war. Xu et al. wiederum wiesen in ihren in vitro Versuchen einen Anstieg der iNOS und TNF- α Genexpression bereits 12 h nach einer Exposition mit *S. aureus* nach (Xu et al., 2013). In einer anderen Studie bei der die Makrophagen 24 h lang mit Hitze-abgetöteten *S. aureus* stimuliert wurden, konnte neben einem erhöhten Gehalt an iNOS und TNF- α auch eine ebenfalls TLR2-abhängige, vermehrte Produktion von IL-10, Arg1 und anderen antiinflammatorischen Markern (wie z.B. CCL22) nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe ordnete die so aktivierten Makrophagen als

M2b-ähnliche immunregulatorische Subtypen ein (Frodermann et al., 2016). Dieses Beispiel verdeutlicht auch die im Microenvironment vorherrschenden, komplexen Wechselwirkungen zwischen den aktivierenden Stimuli und den sekundär freigesetzten Zyto- und Chemokinen, die sich gegenseitig beeinflussen und somit zu einem dynamischen Geschehen führen, welches sich nicht durch einzelne Marker wie iNOS oder Arg1 in eine definierte Schublade stecken lässt.

S. aureus führt demnach bei Makrophagen, wenn auch im Vergleich zu gramnegativen Bakterien etwas verzögert, zu einer erhöhten iNOS-Produktion. Dies konnte durch die vorliegende immunhistochemische Studie nicht nachgewiesen werden, wobei jedoch insbesondere Zellen mit einer schwachen Expression aufgrund der mangelnden Sensitivität der verwendeten Methodik nicht berücksichtigt werden konnten. Lediglich bei einem Tier aus der 24h-Staph-Gruppe konnten vermehrt stark iNOS-positive Zellen fokal in einem entzündeten Areal nachgewiesen werden, der Grund dafür bleibt jedoch unklar. Zudem verdeutlicht diese Einzeltierbeobachtung nochmals die durch die geringen Gruppengrößen eingeschränkte Aussagefähigkeit der Ergebnisse.

Darüber hinaus sind für *S. aureus* eine Reihe an Virulenzfaktoren beschrieben, die zu einer gewissen Resistenz gegenüber dem mikrobiziden Effekt von NO und assoziierter reaktiver Stickstoffspezies führen, sodass die iNOS-Expression von phagozytierenden Immunzellen als Abwehrmechanismus bei Infektionen mit *S. aureus* eher eine untergeordnete Rolle spielt (Pidwill et al., 2021; Grayczyk & Alonzo, 2019).

Zusammenfassend zeigten sich in dem *S. aureus*-induzierten Pneumoniemodell sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den Infektionsgruppen nur sehr vereinzelt iNOS-positive Zellen. Eine *S. aureus*-assoziierte, deutlich vermehrte iNOS-Expression war demnach nicht nachweisbar und auch zwischen den beiden Zeitpunkten von 24 und 48 h konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die Arbeitshypothese, dass zum Zeitpunkt von 24 h post inf. mehr iNOS-positive Zellen als zum Zeitpunkt 48 h nachweisbar sind, konnte somit in diesem Modell nicht bestätigt werden.

5.3.4 CD163

In dem Staph-Modell konnten für den Marker CD163 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich bei der Analyse der gesamten Lungenparenchymfläche lediglich eine sehr geringfügige, nicht signifikante Zunahme der CD163-positiven Zellen von 24 zu 48 h hin, sowohl bei den Staph-Gruppen als auch bei den Kontrollgruppen. Wie auch in dem AcB-Modell waren die CD163-positiven Zellen ausschließlich perivaskulär bzw. -bronchial lokalisiert, mit Ausnahme eines Tieres aus der 24

h-Staph-Gruppe, welches auch Infiltrationen in einem entzündlich veränderten Lungenbereich zeigte. Auch in diesem Modell wurden aufgrund des spezifischen Verteilungsmusters zusätzlich die Bronchien bzw. Bronchioli mit den umliegenden Gefäßen annotiert und ausgewertet, wobei ebenfalls keine Unterschiede bei der Anzahl der CD163-positiven Zellen zwischen zentralen und peripher gelegenen Bereichen oder aber der Infektions- und Kontrollgruppe erkennbar waren.

Fabrick et al. belegten in ihrer Studie die Rolle von CD163 als Makrophagen-Rezeptor für *S. aureus* und andere Bakterien, dem somit eine Sensorfunktion zukommt und der so zu einer gesteigerten Zytokinproduktion (TNF- α) und damit zur Aktivierung lokaler Entzündungsprozesse führt (Fabrick et al., 2009). Beim Menschen existiert auch eine lösliche (soluble) Form von CD163 (sCD163), welches beispielsweise im Rahmen einer Sepsis von aktivierten Makrophagen in großen Mengen durch proteolytische Spaltung ins Blutplasma freigesetzt wird und auch prognostischen Wert besitzt. Kneidl et al. konnten zeigen, dass sCD163 an bestimmte Fibronectine von *S. aureus* bindet, was zu einer zusätzlichen Opsonisierung des Erregers führt, sodass es zu einer verstärkten Phagozytose und Abtötung der Bakterien kommt und CD163 somit eine wichtige Rolle bei der Abwehr spielt (Kneidl et al., 2012). Mäuse sind jedoch, wie auch alle anderen nicht-Primaten, nicht in der Lage das Protein abzuspalten (Etzerodt et al., 2014). CD163^{-/-}-Mäuse zeigen sich dennoch hoch empfänglich für Infektionen mit *S. aureus*, zugleich treten bei diesen Tieren aber auch deutlich stärkere Entzündungsanzeichen bei allergischen Kontaktdermatitiden auf. CD163 spielt folglich sowohl bei der Pathogenabwehr als auch der Immunregulation eine wichtige Rolle (Fischer-Riepe et al., 2020). Die genaue Beteiligung von CD163 im *S. aureus*-Modell muss aber erst noch geklärt werden.

Wie bereits bei dem AcB-Modell ausführlicher dargelegt, fanden Yamazato et al. in ihrer Rattenstudie eine ähnliche perivaskuläre Verteilung der CD163-positiven Zellen (Yamazato et al., 2018). Ebenso kann anhand der Beobachtungen von Gibbings et al. wieder eine Klassifizierung der detektierten CD163-positiven Zellen als IMs und evtl. rekrutierte Monozyten vermutet werden (Gibbings et al., 2017).

Zusammenfassend konnten für CD163 im *S. aureus*-induzierten Pneumoniemodell keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen oder den untersuchten Zeitpunkten ermittelt werden. Auch eine nähere Untersuchung der perivaskulären und -bronchialen Areale zeigte keine Unterschiede zwischen peripher und zentral gelegenen Bereichen, den Gruppen oder Untersuchungszeitpunkten. Auffällig war, wie auch bereits im AcB-Modell beobachtet, das spezifische perivaskuläre und peribronchiale Verteilungsmuster der CD163-positiven Zellen, welches vermuten lässt, dass es sich bei den detektierten Zellen um IMs und evtl. auch rekrutierte Monozyten handelt.

5.4 Die 4 Antikörper im Vergleich

Bei der vergleichenden Betrachtung der für die jeweiligen AK detektierten positiven Zellzahlen fällt insbesondere die hohe bis sehr hohe Anzahl Arg1-positiver Zellen in den Infektionsgruppen auf, welche in beiden Modellen von 24 zu 48 h auch noch weiter anstieg, wobei dies im Staph-Modell jedoch statistisch nicht signifikant war. Ein erhöhter Gehalt iNOS-positiver Zellen konnte ebenfalls in den AcB-infizierten Tieren nachgewiesen werden, der von 24 zu 48 h geringfügig anstieg (ns). Im Gegensatz dazu zeigten sich nur vereinzelt iNOS-positive Zellen in den Staph-Gruppen und den PBS-Kontrollgruppen beider Modelle. Des Weiteren sind deutlich mehr Arg1-positive Zellen als CD68-positive Zellen bei den infizierten Tieren erkennbar, obwohl CD68 als Pan-Makrophagen-Marker gilt. Denkbar ist dabei, dass es sich bei den Arg1-positiven Zellen nicht allein um Makrophagen handelt. In der Literatur wird die spezifische Expression des Markers CD68 kontrovers diskutiert, so ist er vielfach als exklusiver Marker für Makrophagen beschrieben, zum anderen ist aber auch eine Expression durch dendritischen Zellen, Monozyten sowie sogar durch nicht myeloid-abgeleitete, humane Zellen beschrieben (Zaynagetdinov et al., 2013). Barros et al. detektierten zudem weniger CD68-positive Zellen als CD163-positive Zellen und schlussfolgerten daraus, dass nicht alle Makrophagen CD68 positiv sind und seine alleinige Verwendung zur Unterschätzung der wahren Makrophagenanzahl in humanen Proben führen kann (Barros et al., 2013). Dies konnte in den hier untersuchten murinen Modellen nicht nachvollzogen werden, da in allen Gruppen deutlich weniger Zellen für CD163 als für CD68-positiv waren und CD163 zudem ausschließlich im bronchialen Interstitium nachweisbar war.

5.5 Limitationen der Studie

Grundlegendes Anliegen dieser Arbeit war die Erarbeitung eines umfassenden Panels verschiedener Makrophagenmarker in der IHC bzw. IF, welches insbesondere durch Doppelfärbungen mit einem Pan-Marker zur Immunphänotypisierung von Makrophagen in situ dienen sollte. Leider war es trotz umfangreicher Versuche nicht möglich eine Doppelfärbung der getesteten Marker zu etablieren. Die erfolgreich etablierten Antikörper Arg1 und iNOS werden, wenn gleich z.T. nur schwach, auch von anderen Zellen exprimiert und erlauben demnach keine eindeutige Zuordnung aller positiven Zellen als reine Makrophagen. Dies ist nur durch eine Doppelfärbung möglich. Aufgrund morphologischer Kriterien kann zwar darauf geschlossen werden, dass es sich bei den positiven Zellen zumeist um Makrophagen handelt, jedoch kann der verwendete Algorithmus bei der digitalen Zählung nicht zwischen Makrophagen und

Zellen mit einer abweichenden Morphologie unterscheiden. CD68 und CD163 hingegen werden häufig als spezifische Makrophagenmarker eingesetzt. Jedoch können auch einige Monozyten sowie dendritische Zellen diese Antigene exprimieren. Eine zuverlässige Differenzierung dieser verschiedenen Zelltypen ist nur mittels multipler Parameter, wie sie beispielsweise in der Durchflusszytometrie eingesetzt werden, möglich und gestaltet sich demnach in der Immunhistochemie schwierig.

Des Weiteren erlauben immunhistochemische Färbungen aufgrund ihrer eher geringen Sensitivität keine zuverlässige Identifizierung schwacher Antigen-Expressionssignale bzw. sichere Differenzierung unterschiedlicher Expressionslevel, welche unter Umständen für eine spezifische Phänotypisierung der Zellen notwendig ist (Zaynagetdinov et al., 2013). So waren auch hier schwache bis z.T. kaum sichtbare, positive Zellsignale bei allen Markern erkennbar, welche jedoch nicht zuverlässig identifiziert werden konnten und demnach nicht in die quantitative Auswertung mit einbezogen wurden. Demnach konnten schwache Antigenexpressionen der Zellen in dieser Arbeit nicht beurteilt werden.

Wie bei anderen Tierversuchen auch schränken insbesondere die kleinen Gruppengrößen die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse stark ein, wobei insbesondere einzelne „Ausreißer“ signifikante Unterschiede unter Umständen maskieren können. Zudem ergaben sich wie z.B. beim Tier Nr. 1 aus der 24h-Staph-Gruppe auch Einzeltierbeobachtungen, die keine sichere Interpretation erlauben und deren Relevanz fraglich bleibt. In dieser Studie wurde zudem lediglich eine Schnittebene der Lungen untersucht, welche aufgrund des multifokalen Verteilungsmusters der Pneumonien unter Umständen nicht repräsentativ für das gesamte Organ ist.

Eine weitere Einschränkung stellte das Versuchsdesign der beiden Modelle dar. Da es sich hierbei ausschließlich um Archivmaterial handelte, waren die Untersuchungszeitpunkte von 24 und 48 h bereits vorgegeben. Diese sind jedoch für die Untersuchung einer zeitlichen Veränderung der Expression verschiedener Makrophagenmarker nicht ganz ideal gewählt, sodass eine größere Zeitspanne bzw. zusätzliche Zeitpunkte wünschenswert gewesen wären, um sowohl die Initialphase (z.B. 12 h post inf.), aber auch die Heilungsphase (z.B. 4 d post inf.) besser abbilden zu können. Zudem wäre auch der Zeitpunkt „0“ für eine vergleichende Betrachtung des homöostatischen Expressionsmusters interessant gewesen.

Des Weiteren handelt es sich bei den untersuchten Modellen ausschließlich um akute Pneumoniemodelle und für die Evaluierung der Arbeitshypothese wären neben anderen Zeitpunkten evtl. auch andere Modelle, beispielsweise von Th1- oder Th2-dominierten Erkrankungen interessant gewesen.

6 Schlussfolgerung

Eine in situ Phänotypisierung von Makrophagen mittels immunhistochemischer Färbungen konnte trotz umfangreicher Etablierungsversuche im Rahmen dieser Studie nur begrenzt durchgeführt werden. Erschwerend kommt die enorme Diversität der Aktivitätszustände der Makrophagen hinzu, die sich zumeist nicht allein durch die vereinzelt Expression eines spezifischen Markers definieren lässt, sondern eine ganze Palette an Variablen bietet. Zudem ist die Immunhistochemie nicht sensitiv genug, um geringe Expressionsveränderungen, welche ebenfalls phänotypische Relevanz besitzen können, zuverlässig erfassen zu können. Die Immunhistochemie erscheint demnach als eher weniger geeignet zur umfassenden Phänotypisierung von Makrophagen, wenngleich sie interessante Einblicke zur Verteilung der Zellen liefern kann, wie beispielsweise auch für den hier untersuchten Marker CD163 deutlich wurde. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit die Expressionshäufigkeit und -verteilung der Marker CD68 (Pan-Makrophagenmarker), Arg1 und CD163 (M2-assoziiert) sowie des Markers iNOS (M1-assoziiert) in einem *A. baumannii*-induzierten und einem *S. aureus*-induzierten, akuten Pneumonie-Modell analysiert und diese insbesondere hinsichtlich Zeit-assoziiert Veränderungen untersucht werden. Hierzu sind bislang keine vergleichbaren Studien bekannt.

CD68 gilt als Pan-Makrophagenmarker und gibt demnach Aufschluss über die zahlenmäßige Beteiligung der Makrophagen am Infektionsgeschehen. In allen Gruppen konnten in den entzündlich veränderten Lungenbereichen mehr CD68-positive Zellen pro mm² als in den nicht entzündlich veränderten Arealen nachgewiesen werden. Eine intranasale Applikation von PBS bei den Kontrolltieren führt ebenfalls zu einer Immunreaktion des Körpers, sodass die bei diesen Tieren beobachteten geringfügigen Entzündungsanzeichen erklärt werden können. Bei den AcB-infizierten Tieren konnte zudem zusätzlich ein deutlicher Anstieg der CD68-positiven Zellen 48 h post inf. und somit zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Makrophageninfiltration detektiert werden. Dabei handelt es sich höchst wahrscheinlich zu großen Teilen um rekrutierte, monozytär abgeleitete Makrophagen, wie sie im Rahmen akuter Entzündungsgeschehen auftreten. In dem Staph-Modell war lediglich ein geringer tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Anstieg erkennbar. Makrophagen spielen insbesondere in der initialen Phase der Staphylokokken-Infektion eine essentielle Rolle, indem sie die Erregeranzahl durch Phagozytose reduzieren und durch die Produktion verschiedener chemotaktischer Zytokine weitere Immunzellen rekrutieren. Dabei handelt es sich v.a. um neutrophile Granulozyten, welche Hauptverantwortlich für die Immunabwehr der Staphylokokken sind und das Entzündungszellbild dominieren. Für den Marker Arg1, der meist als M2-spezifisch gilt, konnte die Arbeitshypothese, dass zu einem späteren Zeitpunkt (48 h) mehr Arg1-positive Zellen als zu einem früheren Zeitpunkt

(24 h) in den entzündlich veränderten Bereichen nachweisbar sind, im AcB-Modell bestätigt werden. Im Staph-Modell konnte ebenfalls eine vermehrte Expression von Arg1 in den entzündeten Lungenarealen nachgewiesen werden, welche sich jedoch nicht so deutlich von den PBS-Kontrollgruppen abgrenzte und auch im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Änderungen zeigte. Die konkrete Bedeutung dieser erhöhten Arginase-Aktivität im AcB- und im geringeren Umfang auch im Staph-Modell bleibt zunächst unklar, da sowohl antiinflammatorische und heilungsfördernde, als auch profibrotische Effekte in anderen Pneumonie-Modellen beschrieben sind.

In umgekehrter Weise stand die Theorie, dass zu einem früheren Zeitpunkt mehr für iNOS-positive Zellen (M1-assoziiertes Marker) vorliegen als zu einem späteren Zeitpunkt. Dies konnte sowohl im AcB- als auch im Staph-Modell für den untersuchten Zeitraum von 24 zu 48 h hin nicht bestätigt werden. Zusätzliche Untersuchungszeitpunkte wären hier jedoch hilfreich um zeit-assoziierte Veränderungen aufzudecken. Dennoch konnten große Unterschiede zwischen den beiden Modellen ermittelt werden. So zeigte sich im AcB-Modell eine deutlich erhöhte iNOS-Expression in den Infektionsgruppen, welche in den Staph-Gruppen nicht erkennbar war. Dies kann durch den unterschiedlichen Aufbau der Zellwand erklärt werden. *Acinetobacter* gehören zur Gruppe der gramnegativen Erreger und besitzen demnach große Mengen an LPS, welches als Antigen vom Körper erkannt wird. Staphylokokken hingegen zählen zu den grampositiven Bakterien, deren Zellwand zu großen Teilen aus den ebenfalls antigenwirkenden Proteoglykanen- und Lipoteichonsäuren besteht. Bereits bekannt ist, dass eine Stimulation mit LPS bei Makrophagen sowohl eine Arg1 als auch eine iNOS-Expression induziert und diese beiden Marker demnach zur Differenzierung zwischen M1- und M2-ähnlicher Subtypen insbesondere bei Infektionen mit gramnegativen Erregern als ungeeignet erscheinen. Darüber hinaus gibt es für Infektionen mit *S. aureus* aber ebenfalls Berichte über eine TNF- α -abhängige, erhöhte iNOS-Expression, wobei die zeitlichen Angaben hier zwischen 24 und 48 h schwanken. Diese war in der vorliegenden Studie nicht nachvollziehbar. Geringfügig erhöhte Antigen-Expressionen konnten jedoch mit der verwendeten Methode nicht dargestellt und somit auch nicht beurteilt werden.

CD163, wird nur von Makrophagen sowie einigen Monozyten und DZ exprimiert und wird häufig als M2-assoziiertes Marker verwendet. Demnach wäre nach der Arbeitshypothese ein Anstieg der CD163-positiven Zellen von 24 zu 48 h hin zu erwarten. Dies konnte in keiner Gruppe durch die digitale Zählung nachgewiesen werden. In den entzündlich veränderten Arealen waren nur bei einigen wenigen Tieren im AcB-Modell CD163-positive Zellen nachweisbar. Dabei handelte es sich auffallend um 5 von 6 Tieren der 48h-Puffer-Gruppe und nur 1 Tier der 24h-Puffer-Gruppe, sodass dennoch ein zeitlicher Zusammenhang sowie auch ein Einfluss der Phagentherapie vermutet werden kann. Diese Zellsignale waren jedoch in ihrer Anzahl zu gering, als dass sie bei der digitalen Zählung ins Gewicht gefallen wären. Darüber hinaus zeigte

sich bei allen Tieren ein sehr spezifisches Verteilungsmuster der CD163-positive Zellen, welche fast ausschließlich perivaskulär und peribronchial nachgewiesen werden konnten. Dies lässt aufgrund anderer Studienergebnisse die Vermutung zu, dass es sich dabei vorrangig um interstitielle Makrophagen und evtl. auch einige rekrutierte Monozyten handelt.

7 Zusammenfassung

In situ Phänotypisierung von Makrophagen in akuten Entzündungsreaktionen

Makrophagen stellen als spezialisierte Immunzellen einen essentiellen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar. Sie übernehmen neben der Phagozytose und Antigenpräsentation von Pathogenen vielfältigste Aufgaben bei der Erhaltung homöostatischer Körperfunktionen, Gewebeumbauprozessen und der Immunregulation. In den letzten 20 Jahren zeigte sich zunehmend die enorme Diversität dieser einstig homogen geglaubten Zellpopulation, die sich in ihrem ontogenetischen Ursprung, ihrem Metabolismus, ihrer Funktion und ihrer Oberflächenmarkerexpression äußert. Den Grundstein dafür legten Mills et al. mit ihrer Arbeit, in der sie erstmals ein dichotomes Modell postulierten, bei dem Makrophagen durch verschiedene Stimuli (IFN- γ und/oder LPS bzw. IL-4) zwei konträre Aktivitätszustände annehmen konnten und als M1- oder M2-polarisierte Makrophagen bezeichneten. M1-Makrophagen wirken proinflammatorisch und sind durch eine erhöhte iNOS-Expression und damit vermehrte NO-Produktion gekennzeichnet. Demgegenüber stehen die antiinflammatorischen und heilungsfördernden M2-Makrophagen mit einer erhöhten Arginase-Expression und damit verbundener Ornithinproduktion. In den folgenden Jahren wurden immer weitere Stimuli und Aktivierungszustände bei Makrophagen entdeckt und insbesondere die Gruppe der M2-Makrophagen in weitere Subtypen unterteilt. Mittlerweile geht die Forschung davon aus, dass zwischen den beiden konträren Extremen M1 und M2 ein ganzes Spektrum an Aktivierungszuständen existiert.

Von Bedeutung sind diese gegensätzlichen Aktivierungszustände insbesondere beim physiologischen Ablauf von Immunreaktionen, welche sich ebenfalls grob in eine initiale, entzündungsfördernde Phase und einer sich anschließenden antiinflammatorischen und heilungsfördernden Phase einteilen lassen. Störungen bei dem hierfür erforderlichen Phänotypen-Wechsel der Makrophagen oder auch eine andauernde Dominanz eines Subtyps sind häufig mit Pathologien assoziiert, sodass deskriptive Analysen verschiedener Phänotypen bei Erkrankungen zunehmend in das Interesse der Wissenschaft gerückt sind. Zwar sind bislang zahlreiche Marker für verschiedene Phänotypen beschrieben, jedoch beruhen die meisten Ergebnisse lediglich auf In-vitro-Versuchen oder auf zytometrischen Messungen, die die genaue Verteilung der Zellen im Gewebe nicht wiedergeben können.

Ziel dieser Arbeit war es, ein umfassendes Panel verschiedener Makrophagen-Marker in der Immunhistochemie zu entwickeln, um eine Immunphänotypisierung der Makrophagen in Entzündungsreaktionen in situ durchführen zu können. Ferner sollte festgestellt werden, ob anhand dieser Färbungen auch ein Zeit-assoziiertes Phänotypenwechsel in situ darstellbar ist.

Zu einem frühen Zeitpunkt einer akuten Entzündungsreaktion wäre demnach eine vermehrte Expression M1-spezifischer Marker zu erwarten, welche im zeitlichen Verlauf abnimmt und entsprechend vice versa mit einem Anstieg der M2-Marker-Expression einhergeht.

Hierfür wurden 23 verschiedene, in der Literatur publizierte Makrophagenmarker an murinen FFPE-Gewebeproben (Lunge und Haut) mit histiozytären Immunzellinfiltraten getestet, wobei eine erfolgreiche Etablierung der immunhistochemischen Färbungen trotz umfassender Versuche nur für 4 AK (CD68, Arg1, iNOS, CD163) möglich war.

Zur Beurteilung des Phänotypenwechsels wurden die erfolgreich etablierten AK-Färbungen an Archivmaterial von zwei Bakterien-induzierten, murinen Pneumoniemodellen durchgeführt, bei denen deutliche Makrophageninfiltrationen nachweisbar waren. Dabei handelte es sich um Infektionen mit gramnegativen *Acinetobacter baumannii* (AcB) und grampositiven *Staphylococcus aureus* (Staph), von denen jeweils Gewebeproben zum Zeitpunkt 24 h und 48 h post inf. zur Verfügung standen. Die Auswertung erfolgte digital mit Hilfe von Algorithmen, welche zusätzlich zwischen entzündlich und nicht entzündlich veränderten Lungenbereichen unterscheiden konnten.

In dieser Studie gelang es somit nicht, ein umfassendes Untersuchungspanel für die immunhistochemische Phänotypisierung von Makrophagensubtypen zu etablieren. Demnach konnte auch die Beurteilung eines Zeit-assoziierten Phänotypenwechsels in den untersuchten Entzündungsreaktionen lediglich anhand der M2-assoziierten Marker Arg1 und CD163 sowie dem M1-assoziierten Marker iNOS durchgeführt werden und besitzt daher nur eine begrenzte Aussagekraft. Signifikante Zeit-assoziierte Veränderungen der Expression dieser drei Marker konnten lediglich für Arg1 im AcB-Modell nachgewiesen werden, wobei sich hier, wie erwartet, ein Anstieg der Arg1-positiven Zellzahlen pro mm² in den entzündlich veränderten Bereichen von 24 zu 48 h hin zeigte. Für iNOS und CD163 waren hingegen keine deutlichen Zeit-assoziierten Veränderungen in den Modellen erkennbar.

Dennoch konnte eine umfangreiche Analyse der Verteilung und Expressionshäufigkeit von CD68, Arg1, iNOS und CD163 in dem AcB- und dem Staph-induzierten Pneumoniemodell durchgeführt werden, wozu bislang keine vergleichbaren Studien bekannt sind.

Für den Pan-Makrophagenmarker CD68 konnte dabei in allen Gruppen und Modellen ein gegenüber den unveränderten Arealen erhöhter Gehalt CD68-positiver Zellen in den entzündlich veränderten Bereichen ermittelt werden. Insbesondere beim AcB-Modell war zudem ein zusätzlicher Anstieg der positiven Zellsignale von 24 zu 48 h deutlich und somit eine vermehrte Makrophageninfiltration zu diesem Zeitpunkt nachweisbar.

Arg1-positive Zellen konnten im hochgradigen (AcB) bis mittelgradigen (Staph) Umfang in den entzündlich veränderten Lungenarealen der Infektionsgruppen nachgewiesen werden. Ein erhöhter Gehalt iNOS-positiver Zellen in den entzündlich veränderten Arealen war in den AcB-Infektionsgruppen, nicht aber in den Staph- oder PBS-Kontrollgruppen nachweisbar. In der

Literatur ist eine Koexpression der Marker Arg1 und iNOS durch eine Stimulation mit LPS beschrieben, sodass diese Marker insbesondere zur Identifizierung M1- oder M2-ähnlicher Subtypen bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien als eher ungeeignet erscheinen.

Besonders auffallend war in dieser Studie das fast ausschließlich peribronchiale und perivaskuläre Verteilungsmuster der CD163-positiven Zellen, welches sich deutlich von den anderen AK unterschied und anhand der Literatur die Vermutung erlaubt, dass es sich dabei vorrangig um interstitielle Lungenmakrophagen handelt. In den entzündlich veränderten Bereichen konnten hingegen bis auf wenige Ausnahmen keine CD163-positiven Zellen nachgewiesen werden.

Eine umfangreiche Phänotypisierung von Makrophagensubtypen mittels immunhistochemischer Färbungen in situ stellt sich somit weiterhin als sehr herausfordernd dar. Infektionen mit *Acinetobacter baumannii* und *Staphylococcus aureus* sind häufig aufgrund ihrer multiplen Resistenzen nur schwer therapierbar, sodass es dringend neuer Therapien bedarf. Dabei sind neben der Entwicklung neuer Antibiotika auch gezielte, immunmodulatorische Therapieansätze in das Interesse der Forschung gerückt. Mit dieser Studie konnte ein erster Einblick zur Expression der Marker CD68, CD163, iNOS und Arg1 gewonnen werden, wobei insbesondere bei den *Acinetobacter*-induzierten Pneumonien eine vermehrte Beteiligung von Arg1 und iNOS auffallend war, deren genaue Wirkungsweise und Bedeutung in diesem Zusammenhang aber erst noch geklärt werden muss.

8 Summary

In situ phenotyping of macrophages in acute inflammatory responses

As specialized immune cells, macrophages are an essential component of the innate immune system. In addition to phagocytosis and antigen presentation of pathogens, they perform a wide variety of tasks in the maintenance of homeostatic body functions, tissue remodeling processes and immune regulation. Over the last 20 years, the enormous diversity of this once homogeneous cell population has become increasingly apparent in its ontogenetic origin, metabolism, function and surface marker expression. The foundation for this was laid by Mills et al. in their work, in which they postulated for the first time a dichotomous model in which macrophages could adopt two contrasting states of activity in response to different stimuli (IFN- γ and/or LPS or IL-4) and termed them M1- or M2-polarized macrophages. M1 macrophages have a proinflammatory effect and are characterized by increased iNOS expression and thus increased NO production. In contrast, M2 macrophages are anti-inflammatory and promote healing, with increased arginase expression and associated ornithine production. In the following years, more and more stimulation scenarios and activation states were discovered in macrophages and in particular the group of M2 macrophages was subdivided into further subtypes. In the meantime, research assumes that a whole spectrum of activation states exists between the two contrary extremes M1 and M2.

These opposing activation states are of importance in the physiological course of immune reactions, which can also be roughly divided into an initial, inflammatory phase and a subsequent anti-inflammatory and pro-healing phase. Disturbances in the necessary switch of the macrophage phenotype or a persistent dominance of a subtype are often associated with pathologies, so that descriptive analyses of different phenotypes in diseases have increasingly attracted the interest of science. Although numerous markers for different phenotypes have been published to date, most results are based only on in vitro experiments or on flow cytometric measurements, which cannot reflect the exact distribution of cells in the tissue.

The aim of this work was to develop a comprehensive panel of different macrophage markers in immunohistochemistry in order to perform immunophenotyping of macrophages in inflammatory responses in situ. Furthermore, by using the established stains to determine whether time-associated phenotype change can also be visualized in situ. At an early stage of an acute inflammatory reaction, an increased expression of M1-specific markers would be expected, which decreases over time and is accompanied by an increase of M2-marker expression.

For this purpose, 23 different published macrophage markers were tested on murine FFPE tissue samples (lung and skin) with histiocytic immune cell infiltrates. Despite extensive experiments, successful establishment of immunohistochemical staining was only possible for 4 antibodies (CD68, Arg1, iNOS, CD163).

To assess phenotype change, the successfully established stainings were performed on archival material from two bacteria-induced murine pneumonia models in which clear macrophage infiltration was detectable. These were infections with gram-negative *Acinetobacter baumannii* (AcB) and gram-positive *Staphylococcus aureus* (Staph), from each of which tissue samples were available at 24 h and 48 h post-infection. The evaluation was performed digitally with the help of algorithms, which could additionally distinguish between inflammatory and non-inflammatory altered lung areas.

Thus, this study failed to establish a comprehensive examination panel for immunohistochemical phenotyping of macrophage subtypes. Accordingly, the assessment of a time-associated phenotype change in the investigated inflammatory responses could only be performed using the M2-associated markers Arg1 and CD163 as well as the M1-associated marker iNOS and therefore has limited significance. Significant time-associated changes in the expression of these three markers could only be detected for Arg1 in the AcB model, where, as expected, an increase in Arg1-positive cell numbers per mm² in the inflammatory areas from 24 to 48 h was observed. For iNOS and CD163, however, no clear time-associated changes were detectable in the models. Nevertheless, a comprehensive analysis of the distribution and expression frequency of CD68, Arg1, iNOS and CD163 was performed in the AcB- and Staph-induced pneumonia model, for which no comparable studies are known to date.

For the pan-macrophage marker CD68, an increased content of CD68-positive cells in the inflammatory altered areas could be determined in all groups and models compared to the unaltered areas. In the AcB model in particular, an additional increase in positive cell signals from 24 to 48 h was also evident and thus a further increased macrophage infiltration at this time point was detectable.

Arg1-positive cells could be detected in high (AcB) to moderate (Staph) extent in the inflammatory altered lung areas of the infection groups. Increased levels of iNOS-positive cells in the inflamed areas were detectable in the AcB infection groups but not in the Staph or PBS control groups. Coexpression of the markers Arg1 and iNOS by stimulation with LPS has been described in the literature, so that these markers appear to be rather unsuitable, especially for the identification of M1- or M2-like subtypes in infections with gram-negative bacteria.

Particularly striking in this study was the almost exclusively peribronchial and perivascular distribution pattern of the CD163-positive cells, which differed markedly from the other antibodies

and, based on the literature, allows the assumption that these are primarily interstitial lung macrophages. In contrast, with few exceptions, no CD163-positive cells could be detected in the areas with inflammatory changes.

A comprehensive phenotyping of macrophage subtypes by immunohistochemical staining in situ is therefore still very challenging. Infections with *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* are commonly difficult to treat due to their multiple resistances, so that new therapies are urgently needed. In addition to the development of new antibiotics, targeted immunomodulatory therapeutic approaches have also become the focus of research. With this study, a first insight into the expression of the markers CD68, CD163, iNOS and Arg1 could be gained. Especially in *Acinetobacter*-induced pneumonias, an increased involvement of Arg1 and iNOS was striking, but their exact mode of action and significance in this context still has to be clarified.

9 Literatur

Abdullah, M., Kähler, D., Vock, C., Reiling, N., Kugler, C., Drömann, D., Rupp, J., Hauber, H. P., Fehrenbach, H., Zabel, P., Vollmer, E., Dalhoff, K., & Goldmann, T. (2012). Pulmonary haptoglobin and CD163 are functional immunoregulatory elements in the human lung. *Respiration*, 83(1), 61–73. doi: 10.1159/000329868

Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., & Buchrieser, C. (2007). *Legionella pneumophila* - A human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64(4), 432–448. doi: 10.1007/s00018-006-6391-1

Alvarado-Vazquez, P. A., Bernal, L., Paige, C. A., Grosick, R. L., Moracho Vilriales, C., Ferreira, D. W., Ulecia-Morón, C., & Romero-Sandoval, E. A. (2017). Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. *Immunobiology*, 222(8–9), 900–912. doi: 10.1016/j.imbio.2017.05.011

Anders, C. B., Lawton, T. M. W., & Ammons, M. C. B. (2019). Metabolic immunomodulation of macrophage functional plasticity in nonhealing wounds. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 32(3), 204–209. doi: 10.1097/QCO.0000000000000550

Ardain, A., Marakalala, M. J., & Leslie, A. (2020). Tissue-resident innate immunity in the lung. *Immunology*, 159(3), 245–256. doi: 10.1111/imm.13143

Aschoff, L. (1924). Das reticuloendotheliale System. *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd.*, 26, 1–118. doi: 10.1007/978-3-642-90639-8

Baardman, J., Verberk, S. G. S., Prange, K. H. M., van Weeghel, M., van der Velden, S., Ryan, D. G., Wüst, R. C. I., Neele, A. E., Speijer, D., Denis, S. W., Witte, M. E., Houtkooper, R. H., O’neill, L. A., Knatko, E. V., Dinkova-Kostova, A. T., Lutgens, E., de Winther, M. P. J., & Van den Bossche, J. (2018). A Defective Pentose Phosphate Pathway Reduces Inflammatory Macrophage Responses during Hypercholesterolemia. *Cell Rep.*, 25(8), 2044-2052.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.092

Badylak, S. F., Valentin, J. E., Ravindra, A. K., McCabe, G. P., & Stewart-Akers, A. M.

(2008). Macrophage Phenotype as a Determinant of Biologic Scaffold Remodeling. *Tissue Eng. Part A*, 14(11), 1835–1842. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0264

Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W. W., & Mowat, A. M. I. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C^{hi} monocyte precursors. *Mucosal Immunol.*, 6(3), 498–510. doi: 10.1038/mi.2012.89

Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B., & Niedobitek, G. (2013). Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One*, 8(11), 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0080908

Bassler, K., Schulte-Schrepping, J., Warnat-Herresthal, S., Aschenbrenner, A. C., & Schultze, J. L. (2019). The Myeloid Cell Compartment—Cell by Cell. *Annu. Rev. Immunol.*, 37(1), 269–293. doi: 10.1146/annurev-immunol-042718-041728

Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., de Leval, L., Van Rooijen, N., Le Moine, A., Vanderplasschen, A., Cataldo, D., Drion, P.-V., Moser, M., Lekeux, P., & Bureau, F. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.*, 119(12), 3723–3738. doi: 10.1172/JCI39717

Beljaars, L., Schippers, M., Reker-Smit, C., Martinez, F. O., Helming, L., Poelstra, K., & Melgert, B. N. (2014). Hepatic localization of macrophage phenotypes during fibrogenesis and resolution of fibrosis in mice and humans. *Front. Immunol.*, 5(SEP), 13–15. doi: 10.3389/fimmu.2014.00430

Benoit, M., Desnues, B., & Mege, J.-L. (2008). Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J. Immunol.*, 181(6), 3733–3739. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3733

Bigley, V., Haniffa, M., Doulatov, S., Wang, X. N., Dickinson, R., McGovern, N., Jardine, L., Pagan, S., Dimmick, I., Chua, I., Wallis, J., Lordan, J., Morgan, C., Kumararatne, D. S., Doffinger, R., Van Der Burg, M., Van Dongen, J., Cant, A., Dick, J. E., ... Collin, M. (2011). The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J. Exp. Med.*, 208(2), 227–234. doi: 10.1084/jem.20101459

Biswas, S. K. (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*, 107(5), 2112–2122. doi: 10.1182/blood-2005-01-0428

Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.*, 11(10), 889–896. doi: 10.1038/ni.1937

Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: No ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 48(1), 1–12. doi: 10.1086/595011

Brann, K. R., Fullerton, M. S., Onyilagha, F. I., Prince, A. A., Kurten, R. C., Rom, J. S., Blevins, J. S., Smeltzer, M. S., & Voth, D. E. (2019). Infection of primary human alveolar macrophages alters staphylococcus aureus toxin production and activity. *Infect. Immun.*, 87(7), 1–17. doi: 10.1128/IAI.00167-19

Brown, B. N., Sicari, B. M., & Badylak, S. F. (2014). Rethinking regenerative medicine: A macrophage-centered approach. *Front. Immunol.*, 5(NOV), 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2014.00510

Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G., & Long, E. O. (2006). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol. Rev.*, 214(1), 73–91. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x

Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J., & Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.*, 67(1), 97–103. doi: 10.1002/jlb.67.1.97

Cai, Y., Sugimoto, C., Arainga, M., Alvarez, X., Didier, E. S., & Kuroda, M. J. (2014). In Vivo Characterization of Alveolar and Interstitial Lung Macrophages in Rhesus Macaques: Implications for Understanding Lung Disease in Humans. *J. Immunol.*, 192(6), 2821–2829. doi: 10.4049/jimmunol.1302269

Chen, W. (2020). Host Innate Immune Responses to *Acinetobacter baumannii* Infection.

Front. Cell. Infect. Microbiol., 10(September), 1–16. doi: 10.3389/fcimb.2020.00486

Cheng, Y., & Rong, J. (2018). Macrophage Polarization as a Therapeutic Target in Myocardial Infarction. *Curr. Drug Targets*, 19(6), 651–662. doi: 10.2174/1389450118666171031115025

Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab. Investig.*, 97(1), 4–13. doi: 10.1038/labinvest.2016.116

Chitu, V., & Stanley, E. R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.*, 18(1), 39–48. doi: 10.1016/j.coi.2005.11.006

Choi, S., Park, C., Ahn, M., Lee, J. H., & Shin, T. (2012). Immunohistochemical study of arginase 1 and 2 in various tissues of rats. *Acta Histochem.*, 114(5), 487–494. doi: 10.1016/j.acthis.2011.09.002

Collin, M., & Milne, P. (2016). Langerhans cell origin and regulation. *Curr. Opin. Hematol.*, 23(1), 28–35. doi: 10.1097/MOH.0000000000000202

Davies, L. C., Rosas, M., Smith, P. J., Fraser, D. J., Jones, S. A., & Taylor, P. R. (2011). A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur. J. Immunol.*, 41(8), 2155–2164. doi: 10.1002/eji.201141817

de Oliveira-Junior, E. B., Bustamante, J., Newburger, P. E., & Condino-Neto, A. (2011). The human NADPH oxidase: Primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand. J. Immunol.*, 73(5), 420–427. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02501.x

Dietert, K., Gutbier, B., Wienhold, S. M., Reppe, K., Jiang, X., Yao, L., Chaput, C., Naujoks, J., Brack, M., Kupke, A., Peteranderl, C., Becker, S., von Lachner, C., Baal, N., Slevogt, H., Hocke, A. C., Witzernath, M., Opitz, B., Herold, S., ... Gruber, A. D. (2017). Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia. *PLoS One*, 12(11), e0188251. doi: 10.1371/journal.pone.0188251

Dietert, K., Nouailles, G., Gutbier, B., Reppe, K., Berger, S., Jiang, X., Schauer, A. E.,

Hocke, A. C., Herold, S., Slevogt, H., Witzenrath, M., Suttorp, N., & Gruber, A. D. (2018). Digital image analyses on whole-lung slides in mouse models of acute pneumonia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 58(4), 440–448. doi: 10.1165/rcmb.2017-0337MA

Dietert, K., Reppe, K., Mundhenk, L., Witzenrath, M., & Gruber, A. D. (2014). mCLCA3 modulates IL-17 and CXCL-1 induction and leukocyte recruitment in murine *Staphylococcus aureus* pneumonia. *PLoS One*, 9(7), 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0102606

Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer Cells in the Liver. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 785–797). John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/cphy.c120026

Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M. P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegon, I., Catala, L., Ifrah, N., Descamps, P., Gamelin, E., Gascan, H., Hebbbar, M., & Jeannin, P. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*, 110(13), 4319–4330. doi: 10.1182/blood-2007-02-072587

Dunning, H. S., & Furth, J. (1935). Studies on the Relation between Microglia, Histiocytes and Monocytes. *Am. J. Pathol.*, 11(6), 895-914.5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19970240>

Durante, W., Johnson, F. K., & Johnson, R. A. (2007). Arginase: A critical Regulator of Nitric Oxide Synthesis and vascular Function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 34(9), 906–911. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04638.x

Eapen, M. S., Hansbro, P. M., McAlinden, K., Kim, R. Y., Ward, C., Hackett, T. -L., Walters, E. H., & Sohal, S. S. (2017). Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Sci. Rep.*, 7(1), 13392. doi: 10.1038/s41598-017-13888-x

El Kasmi, K. C., Pugliese, S. C., Riddle, S. R., Poth, J. M., Anderson, A. L., Frid, M. G., Li, M., Pullamsetti, S. S., Savai, R., Nagel, M. A., Fini, M. A., Graham, B. B., Tuder, R. M., Friedman, J. E., Eltzschig, H. K., Sokol, R. J., & Stenmark, K. R. (2014). Adventitial Fibroblasts Induce a Distinct Proinflammatory/Profibrotic Macrophage Phenotype in Pulmonary Hypertension. *J. Immunol.*, 193(2), 597–609. doi: 10.4049/jimmunol.1303048

El Kasmi, K. C., Qualls, J. E., Pesce, J. T., Smith, A. M., Thompson, R. W., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R. J., König, T., Schleicher, U., Koo, M., Kaplan, G., Fitzgerald, K. A., Tuomanen, E. I., Orme, I. M., Kanneganti, T., Bogdan, C., Wynn, T. A., & Murray, P. J. (2008). Toll-like receptor–induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.*, 9(12), 1399–1406. doi: 10.1038/ni.1671

Engel, K. B., & Moore, H. M. (2011). Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(5), 537–543. doi: 10.5858/2010-0702-rair.1

Etzerodt, A., Rasmussen, M. R., Svendsen, P., Chalaris, A., Schwarz, J., Galea, I., Møller, H. J., & Moestrup, S. K. (2014). Structural basis for inflammation-driven shedding of CD163 ectodomain and tumor necrosis factor- α in macrophages. *J. Biol. Chem.*, 289(2), 778–788. doi: 10.1074/jbc.M113.520213

Fabriek, B. O., Bruggen, R. Van, Deng, D. M., Ligtenberg, A. J. M., Nazmi, K., Schornagel, K., Vloet, R. P. M., Dijkstra, C. D., & Van Den Berg, T. K. (2009). The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*, 113(4), 887–892. doi: 10.1182/blood-2008-07-167064

Fabriek, B. O., Polfliet, M. M. J., Vloet, R. P. M., Van Der Schors, R. C., Ligtenberg, A. J. M., Weaver, L. K., Geest, C., Matsuno, K., Moestrup, S. K., Dijkstra, C. D., & Van Den Berg, T. K. (2007). The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood*, 109(12), 5223–5229. doi: 10.1182/blood-2006-08-036467

Fang, W., Zhai, X., Han, D., Xiong, X., Wang, T., Zeng, X., He, S., Liu, R., Miyata, M., Xu, B., & Zhao, H. (2018). CCR2-dependent monocytes/macrophages exacerbate acute brain injury but promote functional recovery after ischemic stroke in mice. *Theranostics*, 8(13), 3530–3543. doi: 10.7150/thno.24475

Fantin, A., Vieira, J. M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhij, S., Peri, F., Wilson, S. W., & Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 116(5), 829–840. doi: 10.1182/blood-2009-12-257832

Ferenbach, D., & Hughes, J. (2008). Macrophages and dendritic cells: What is the difference? *Kidney Int.*, 74(1), 5–7. doi: 10.1038/ki.2008.189

Fischer-Riepe, L., Daber, N., Schulte-Schrepping, J., Véras De Carvalho, B. C., Russo, A., Pohlen, M., Fischer, J., Chasan, A. I., Wolf, M., Ulas, T., Glander, S., Schulz, C., Skryabin, B., Wollbrink, Dipl.-Ing, A., Steingraeber, N., Stremmel, C., Koehle, M., Gärtner, F., Vettorazzi, S., ... Barczyk-Kahlert, K. (2020). CD163 expression defines specific, IRF8-dependent, immune-modulatory macrophages in the bone marrow. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 146(5), 1137–1151. doi: 10.1016/j.jaci.2020.02.034

Fleetwood, A. J., Dinh, H., Cook, A. D., Hertzog, P. J., & Hamilton, J. A. (2009). GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on Type I interferon signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 86(2), 411–421. doi: 10.1189/jlb.1108702

Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A., & Cook, A. D. (2007). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. *J. Immunol.*, 178(8), 5245–5252. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5245

Foster, T. J. (2009). Colonization and infection of the human host by staphylococci: Adhesion, survival and immune evasion. *Vet. Dermatol.*, 20(5–6), 456–470. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00825.x

Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., Macintyre, A. N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J. C., & Makowski, L. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: Glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.*, 289(11), 7884–7896. doi: 10.1074/jbc.M113.522037

Frodermann, V., van Duijn, J., Van Puijvelde, G. H. M., Van Santbrink, P. J., Lagraauw, H. M., de Vries, M. R., Quax, P. H. A., Bot, I., Foks, A. C., de Jager, S. C. A., & Kuiper, J. (2016). Heat-Killed staphylococcus aureus reduces atherosclerosis by inducing anti-inflammatory macrophages. *J. Intern. Med.*, 279(6), 592–605. doi: 10.1111/joim.12484

Gaïni, S., Pedersen, S. S., Koldkjær, O. G., Pedersen, C., Moestrup, S. K., & Møller, H. J. (2008). New immunological serum markers in bacteraemia: Anti-inflammatory soluble

CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 151(3), 423–431. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03586.x

Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.*, 12(11), 1035–1044. doi: 10.1038/ni.2109

Garaicoa-Pazmino, C., Fretwurst, T., Squarize, C. H., Berglundh, T., Giannobile, W. V., Larsson, L., & Castilho, R. M. (2019). Characterization of macrophage polarization in periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 46(8), 830–839. doi: 10.1111/jcpe.13156

Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K. G., Gordonov, S., Mazloom, A. R., Ma'ayan, A., Chua, W.-J., Hansen, T. H., Turley, S. J., Merad, M., & Randolph, G. J. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.*, 13(11), 1118–1128. doi: 10.1038/ni.2419

Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D. A., Mowat, A. M., & Randolph, G. J. (2010b). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 10(6), 453–460. doi: 10.1038/nri2784

Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010a). Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* (80-.), 327(5966), 656–661. doi: 10.1126/science.1178331

Gensel, J. C., & Zhang, B. (2015). Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.*, 1619, 1–11. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.045

Gibbins, S. L., Thomas, S. M., Atif, S. M., McCubbrey, A. L., Desch, A. N., Danhorn, T., Leach, S. M., Bratton, D. L., Henson, P. M., Janssen, W. J., & Jakubzick, C. V. (2017). Three unique interstitial macrophages in the murine lung at steady state. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 57(1), 66–76. doi: 10.1165/rcmb.2016-0361OC

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Primitive Macrophages. *Science* (80-.), 701(November), 841–845.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, 3(1), 23–35. doi: 10.1038/nri978

Gordon, S., Plüddemann, A., & Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.*, 262(1), 36–55. doi: 10.1111/imr.12223

Gottfried, E., Kunz-Schughart, L. A., Weber, A., Rehli, M., Peucker, A., Müller, A., Kastenberger, M., Brockhoff, G., Andreesen, R., & Kreutz, M. (2008). Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand. J. Immunol.*, 67(5), 453–463. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x

Gracia-Hernandez, M., Sotomayor, E. M., & Villagra, A. (2020). Targeting Macrophages as a Therapeutic Option in Coronavirus Disease 2019. *Front. Pharmacol.*, 11(October), 1–16. doi: 10.3389/fphar.2020.577571

Grayczyk, J. P., & Alonzo, F. (2019). Staphylococcus aureus lipoic acid synthesis limits macrophage reactive oxygen and nitrogen species production to promote survival during infection. *Infect. Immun.*, 87(10), 1–16. doi: 10.1128/IAI.00344-19

Gross, T. J., Kremens, K., Powers, L. S., Brink, B., Knutson, T., Domann, F. E., Philibert, R. A., Milhem, M. M., & Monick, M. M. (2014). Epigenetic Silencing of the Human NOS2 Gene: Rethinking the Role of Nitric Oxide in Human Macrophage Inflammatory Responses. *J. Immunol.*, 192(5), 2326–2338. doi: 10.4049/jimmunol.1301758

Guillot, A., & Tacke, F. (2019). Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights. *Hepatol. Commun.*, 3(6), 730–743. doi: 10.1002/hep4.1356

Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321. doi: 10.1038/nature07039

Hamann, J., Koning, N., Pouwels, W., Ulfman, L. H., van Eijk, M., Stacey, M., Lin, H. H., Gordon, S., & Kwakkenbos, M. J. (2007). EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *Eur. J. Immunol.*, 37(10), 2797–2802. doi: 10.1002/eji.200737553

Hao, N. B., Lü, M. H., Fan, Y. H., Cao, Y. L., Zhang, Z. R., & Yang, S. M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012. doi: 10.1155/2012/948098

Haschemi, A., Kosma, P., Gille, L., Evans, C. R., Burant, C. F., Starkl, P., Knapp, B., Haas, R., Schmid, J. A., Jandl, C., Amir, S., Lubec, G., Park, J., Esterbauer, H., Bilban, M., Brizuela, L., Pospisilik, J. A., Otterbein, L. E., & Wagner, O. (2012). The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.*, 15(6), 813–826. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.023

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E. R., Ginhoux, F., ... Merad, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38(4), 792–804. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.004

Haydar, D., Gonzalez, R., Garvy, B. A., Garneau-Tsodikova, S., Thamban Chandrika, N., Bocklage, T. J., & Feola, D. J. (2021). Myeloid arginase-1 controls excessive inflammation and modulates T cell responses in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Immunobiology*, 226(1), 152034. doi: 10.1016/j.imbio.2020.152034

Hochstedler, C. M., Leidinger, M. R., Maher-Sturm, M. T., Gibson-Corley, K. N., & Meyerholz, D. K. (2013). Immunohistochemical detection of arginase-I expression in formalin-fixed lung and other tissues. *J. Histotechnol.*, 36(4), 128–134. doi: 10.1179/2046023613Y.0000000032

Högger, P., Dreier, J., Droste, A., Buck, F., & Sorg, C. (1998). Identification of the Integral Membrane Protein RM3/1 on Human Monocytes as a Glucocorticoid-Inducible Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Family (CD163). *J. Immunol.*, 161(4), 1883 LP – 1890. <http://www.jimmunol.org/content/161/4/1883.abstract>

Hussell, T., & Bell, T. J. (2014). Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. *Nat. Rev. Immunol.*, 14(2), 81–93. doi: 10.1038/nri3600

Im, S., Yousef, L., Blaschitz, C., Liu, J. Z., Edwards, R. A., Young, S. G., Raffatellu, M., & Osborne, T. F. (2011). Linking Lipid Metabolism to the Innate Immune Response in

Macrophages through Sterol Regulatory Element Binding Protein-1a. *Cell Metab.*, 13(5), 540–549. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.001

Infantino, V., Convertini, P., Cucci, L., Panaro, M. A., Di Noia, M. A., Calvello, R., Palmieri, F., & Iacobazzi, V. (2011). The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem. J.*, 438(3), 433–436. doi: 10.1042/BJ20111275

Jablonski, K. A., Amici, S. A., Webb, L. M., Ruiz-Rosado, J. D. D., Popovich, P. G., Partida-Sanchez, S., & Guerau-De-arellano, M. (2015). Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS One*, 10(12), 5–11. doi: 10.1371/journal.pone.0145342

Joly-Guillou, M. L., Wolff, M., Pocardalo, J. J., Walker, F., & Carbon, C. (1997). Use of a new mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia to evaluate the postantibiotic effect of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41(2), 345–351. doi: 10.1128/AAC.41.2.345

Jung, A. L., Stoiber, C., Herkt, C. E., Schulz, C., Bertrams, W., & Schmeck, B. (2016). *Legionella pneumophila*-Derived Outer Membrane Vesicles Promote Bacterial Replication in Macrophages. *PLoS Pathog.*, 12(4), 1–26. doi: 10.1371/journal.ppat.1005592

Kapetanovic, R., Jouvion, G., Fitting, C., Parlato, M., Blanchet, C., Huerre, M., Cavaillon, J. M., & Adib-Conquy, M. (2010). Contribution of NOD2 to lung inflammation during *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Microbes Infect.*, 12(10), 759–767. doi: 10.1016/j.micinf.2010.05.003

Kim, C.-H., Jeong, Y.-J., Lee, J., Jeon, S.-J., Park, S.-R., Kang, M.-J., Park, J.-H., & Park, J.-H. (2013). Essential role of toll-like receptor 4 in *Acinetobacter baumannii*-induced immune responses in immune cells. *Microb. Pathog.*, 54, 20–25. doi: 10.1016/j.micpath.2012.08.008

Kitowska, K., Zakrzewicz, D., Königshoff, M., Chrobak, I., Grimminger, F., Seeger, W., Bulau, P., & Eickelberg, O. (2008). Functional role and species-specific contribution of arginases in pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, 294(1), 34–45. doi: 10.1152/ajplung.00007.2007

Klopfleisch, R. (2016). Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model – Phenotypes, functions and markers. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 43, pp. 3–13). doi: 10.1016/j.actbio.2016.07.003

Kneidl, J., Löffler, B., Erat, M. C., Kalinka, J., Peters, G., Roth, J., & Barczyk, K. (2012). Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides. *Cell. Microbiol.*, 14(6), 914–936. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01766.x

Kono, H., & Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(4), 279–289. doi: 10.1038/nri2215

Koo, S. jie, Szczesny, B., Wan, X., Putluri, N., & Garg, N. J. (2018). Pentose phosphate shunt modulates reactive oxygen species and nitric oxide production controlling *Trypanosoma cruzi* in Macrophages. *Front. Immunol.*, 9(FEB). doi: 10.3389/fimmu.2018.00202

Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., Golda, A., Maciag-Gudowska, A., Brix, K., Shaw, L., Foster, T., & Potempa, J. (2008). A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: The silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 3(1). doi: 10.1371/journal.pone.0001409

Kung, J. T., Brooks, S. B., Jakway, J. P., Leonard, L. L., & Talmage, D. W. (1977). Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase*. *J. Exp. Med.*, 146(3), 665–672. doi: 10.1084/jem.146.3.665

Kusaka, Y., Kajiwara, C., Shimada, S., Ishii, Y., Miyazaki, Y., Inase, N., Standiford, T. J., & Tateda, K. (2018). Potential Role of Gr-1 + CD8 + T Lymphocytes as a Source of Interferon- γ and M1/M2 Polarization during the Acute Phase of Murine *Legionella pneumophila* Pneumonia. *J. Innate Immun.*, 10(4), 328–338. doi: 10.1159/000490585

Lacoma, A., Cano, V., Moranta, D., Regueiro, V., Domínguez-Villanueva, D., Laabei, M., González-Nicolau, M., Ausina, V., Prat, C., & Bengoechea, J. A. (2017). Investigating intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* within a murine alveolar macrophage cell line. *Virulence*, 8(8), 1761–1775. doi: 10.1080/21505594.2017.1361089

Langston, P. K., Shibata, M., & Horng, T. (2017). Metabolism supports macrophage activation. *Front. Immunol.*, 8(JAN), 1–7. doi: 10.3389/fimmu.2017.00061

Laskin, D. L., Sunil, V. R., Gardner, C. R., & Laskin, J. D. (2011). Macrophages and tissue injury: Agents of defense or destruction? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 51, 267–288. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105812

Lech, M., & Anders, H. J. (2013). Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 1832(7), 989–997. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.12.001

Lee, H. H., Aslanyan, L., Vidyasagar, A., Brennan, M. B., Tauber, M. S., Carrillo-Sepulveda, M. A., Dores, M. R., Rigel, N. W., & Martinez, L. R. (2020). Depletion of alveolar macrophages increases pulmonary neutrophil infiltration, tissue damage, and sepsis in a murine model of acinetobacter baumannii pneumonia. *Infect. Immun.*, 88(7), 1–15. doi: 10.1128/IAI.00128-20

Lin, E. Y., Li, J. F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., Qian, H., Xue, X. N., & Pollard, J. W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.*, 66(23), 11238–11246. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1278

Liu, Y., Stewart, K. N., Bishop, E., Marek, C. J., Kluth, D. C., Rees, A. J., & Wilson, H. M. (2008). Unique Expression of Suppressor of Cytokine Signaling 3 Is Essential for Classical Macrophage Activation in Rodents In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.*, 180(9), 6270–6278. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6270

Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.*, 117(1), 175–184. doi: 10.1172/JCI29881

Maarsingh, H., Dekkers, B. G. J., Zuidhof, A. B., Bos, I. S. T., Menzen, M. H., Klein, T., Flik, G., Zaagsma, J., & Meurs, H. (2011). Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. *Eur. Respir. J.*, 38(2), 318–328. doi: 10.1183/09031936.00057710

MacMicking, J. D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous

immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 12(5), 367–382. doi: 10.1038/nri3210

MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.*, 15(1), 323–350. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323

Maniecki, M. B., Møller, H. J., Moestrup, S. K., & Møller, B. K. (2006). CD163 positive subsets of blood dendritic cells: The scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes. *Immunobiology*, 211(6–8), 407–417. doi: 10.1016/j.imbio.2006.05.019

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 25(12), 677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 23(11), 549–555. doi: 10.1016/S1471-4906(02)02302-5

Martinez, F. O. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.*, 13(13), 453. doi: 10.2741/2692

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.*, 6, 13. doi: 10.12703/P6-13

Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J. Immunol.*, 177(10), 7303–7311. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.7303

Mattila, J. T., Ojo, O. O., Kepka-Lenhart, D., Marino, S., Kim, J. H., Eum, S. Y., Via, L. E., Barry, C. E., Klein, E., Kirschner, D. E., Morris, S. M., Lin, P. L., & Flynn, J. L. (2013). Microenvironments in Tuberculous Granulomas Are Delineated by Distinct Populations of Macrophage Subsets and Expression of Nitric Oxide Synthase and Arginase Isoforms. *J. Immunol.*, 191(2), 773–784. doi: 10.4049/jimmunol.1300113

Maus, U. A., Janzen, S., Wall, G., Srivastava, M., Blackwell, T. S., Christman, J. W.,

Seeger, W., Welte, T., & Lohmeyer, J. (2006). Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 35(2), 227–235. doi: 10.1165/rcmb.2005-0241OC

Mayer, A. K., Bartz, H., Fey, F., Schmidt, L. M., & Dalpke, A. H. (2008). Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment. *Eur. J. Immunol.*, 38(6), 1689–1699. doi: 10.1002/eji.200737936

McConnell, M. J., Actis, L., & Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(2), 130–155. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. doi: 10.1038/nature07201

Metschnikow, I. I. (1880). Über die intracelluläre Verdauung bei Coelenteraten. *Zool. Anz.*, 3, 261–263.

Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.*, 164(12), 6166–6173. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166

Mills, C. D., Lenz, L. L., & Harris, R. A. (2016). A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. *Cancer Res.*, 76(3), 513–516. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1737

Mills, C. D., & Ley, K. (2014). M1 and M2 macrophages: The chicken and the egg of immunity. *J. Innate Immun.*, 6(6), 716–726. doi: 10.1159/000364945

Mills, C. D., Shearer, J., Evans, R., & Caldwell, M. D. (1992). Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *J. Immunol.*, 149(8), 2709–2714. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1401910>

Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G., & Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH 1 and TH 2 cytokines. *Eur. J. Immunol.*, 25(4), 1101–1104. doi: 10.1002/eji.1830250436

Moestrup, S. K., & Moller, H. J. (2004). CD163: A regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann. Med.*, 36(5), 347–354. doi: 10.1080/07853890410033171

Montoya, D., Mehta, M., Ferguson, B. G., Teles, R. M. B., Krutzik, S. R., Cruz, D., Pellegrini, M., & Modlin, R. L. (2019). Plasticity of antimicrobial and phagocytic programs in human macrophages. *Immunology*, 156(2), 164–173. doi: 10.1111/imm.13013

Moore, P. F. (2014). A Review of Histiocytic Diseases of Dogs and Cats. *Vet. Pathol.*, 51(1), 167–184. doi: 10.1177/0300985813510413

Mora, A. L., Torres-González, E., Rojas, M., Corredor, C., Ritzenthaler, J., Xu, J., Roman, J., Brigham, K., & Stecenko, A. (2006). Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 35(4), 466–473. doi: 10.1165/rcmb.2006-0121OC

Morales-Nebreda, L., Misharin, A. V., Perlman, H., & Scott Budinger, G. R. (2015). The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *Eur. Respir. Rev.*, 24(137), 505–509. doi: 10.1183/16000617.0031-2015

Mori, M., Gotoh, T., Nagasaki, A., Takiguchi, M., & Miyanaka, K. (1998). Arginine metabolism and nitric oxide production. *Pathophysiology*, 5, 60. doi: 10.1016/s0928-4680(98)80513-0

Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.*, 73(2), 209–212. doi: 10.1189/jlb.0602325

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(12), 958–969. doi: 10.1038/nri2448

Mould, K. J., Jackson, N. D., Henson, P. M., Seibold, M., & Janssen, W. J. (2019). Single cell RNA sequencing identifies unique inflammatory airspace macrophage subsets. *JCI Insight*, 4(5), 1–17. doi: 10.1172/jci.insight.126556

Munder, M. (2009). Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system: REVIEW. *Br. J. Pharmacol.*, 158(3), 638–651. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x

Munder, M., Eichmann, K., & Modolell, M. (1998). Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J. Immunol.*, 160(11), 5347–5354. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605134>

Munier, A. L., Biard, L., Legrand, M., Rousseau, C., Lafaurie, M., Donay, J. L., Flicoteaux, R., Mebazaa, A., Mimoun, M., & Molina, J. M. (2019). Incidence, risk factors and outcome of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections during an outbreak in a burn unit. *Int. J. Infect. Dis.*, 79, 179–184. doi: 10.1016/j.ijid.2018.11.371

Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.-L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008

Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(11), 723–737. doi: 10.1038/nri3073

Nair, M. G., Du, Y., Perrigoue, J. G., Zaph, C., Taylor, J. J., Goldschmidt, M., Swain, G. P., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A., Karow, M., Stevens, S., Pearce, E. J., & Artis, D. (2009). Alternatively activated macrophage-derived RELM- α is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. *J. Exp. Med.*, 206(4), 937–952. doi: 10.1084/jem.20082048

Naujoks, J., Tabeling, C., Dill, B. D., Hoffmann, C., Brown, A. S., Kunze, M., Kempa, S., Peter, A., Mollenkopf, H. J., Dorhoi, A., Kershaw, O., Gruber, A. D., Sander, L. E., Witznath, M., Herold, S., Nerlich, A., Hocke, A. C., van Driel, I., Suttorp, N., ... Opitz, B. (2016). IFNs Modify the Proteome of Legionella-Containing Vacuoles and Restrict Infection Via IRG1-Derived Itaconic Acid. *PLoS Pathog.*, 12(2). doi: 10.1371/journal.ppat.1005408

Newton, H. J., Ang, D. K. Y., Van Driel, I. R., & Hartland, E. L. (2010). Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 23(2), 274–298. doi: 10.1128/CMR.00052-09

Nicholson, S., Bonecini-Almeida, M. D. G., Lapa E Silva, J. R., Nathan, C., Xie, Q. W., Mumford, R., Weidner, J. R., Calaycay, J., Geng, J., Boechat, N., Linhares, C., Rom, W., & Ho, J. L. (1996). Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J. Exp. Med.*, 183(5), 2293–2302. doi: 10.1084/jem.183.5.2293

Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Front. Immunol.*, 10(MAY), 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084

Palmieri, E. M., Menga, A., Martín-Pérez, R., Quinto, A., Riera-Domingo, C., De Tullio, G., Hooper, D. C., Lamers, W. H., Ghesquière, B., McVicar, D. W., Guarini, A., Mazzone, M., & Castegna, A. (2017). Pharmacologic or Genetic Targeting of Glutamine Synthetase Skews Macrophages toward an M1-like Phenotype and Inhibits Tumor Metastasis. *Cell Rep.*, 20(7), 1654–1666. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.054

Pang, R., Zhou, H., Huang, Y., Su, Y., & Chen, X. (2020). Inhibition of Host Arginase Activity Against Staphylococcal Bloodstream Infection by Different Metabolites. *Front. Immunol.*, 11(July), 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2020.01639

Patel, V. I., & Metcalf, J. P. (2018). Airway macrophage and dendritic cell subsets in the resting human lung. *Crit. Rev. Immunol.*, 38(4), 303–331. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2018026459

Paul-Clark, M. J., Mc Master, S. K., Belcher, E., Sorrentino, R., Anandarajah, J., Fleet, M., Sriskandan, S., & Mitchell, J. A. (2006). Differential effects of Gram-positive versus Gram-negative bacteria on NOSII and TNF α in macrophages: Role of TLRs in synergy between the two. *Br. J. Pharmacol.*, 148(8), 1067–1075. doi: 10.1038/sj.bjp.0706815

Peterson, K. R., Cottam, M. A., Kennedy, A. J., & Hasty, A. H. (2018). Macrophage-Targeted Therapeutics for Metabolic Disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 39(6), 536–546. doi: 10.1016/j.tips.2018.03.001

Philippidis, P., Mason, J. C., Evans, B. J., Nadra, I., Taylor, K. M., Haskard, D. O., & Landis, R. C. (2004). Hemoglobin Scavenger Receptor CD163 Mediates Interleukin-10 Release and Heme Oxygenase-1 Synthesis: Antiinflammatory Monocyte-Macrophage

Responses In Vitro, in Resolving Skin Blisters In Vivo, and after Cardiopulmonary Bypass Surgery. *Circ. Res.*, 94(1), 119–126. doi: 10.1161/01.RES.0000109414.78907.F9

Pidwill, G. R., Gibson, J. F., Cole, J., Renshaw, S. A., & Foster, S. J. (2021). The Role of Macrophages in *Staphylococcus aureus* Infection. *Front. Immunol.*, 11(January), 1–30. doi: 10.3389/fimmu.2020.620339

Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S., & Gordon, S. (2006). The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Expert Rev. Mol. Med.*, 8(28), 1–25. doi: 10.1017/S1462399406000159

Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A. C., Léone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., Dormont, D., & Gras, G. (2005). Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.*, 142(3), 481–489. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x

Porta, C., Riboldi, E., Ippolito, A., & Sica, A. (2015). Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin. Immunol.*, 27(4), 237–248. doi: 10.1016/j.smim.2015.10.003

Price, J. V., & Vance, R. E. (2014). The Macrophage Paradox. *Immunity*, 41(5), 685–693. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.015

Qiu, H., KuoLee, R., Harris, G., Van Rooijen, N., Patel, G. B., & Chen, W. (2012). Role of macrophages in early host resistance to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS One*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0040019

Qualls, J. E., Neale, G., Smith, A. M., Koo, M.-S., DeFreitas, A. A., Zhang, H., Kaplan, G., Watowich, S. S., & Murray, P. J. (2010). Arginine Usage in *Mycobacteria*-Infected Macrophages Depends on Autocrine-Paracrine Cytokine Signaling. *Sci. Signal.*, 3(135), ra62–ra62. doi: 10.1126/scisignal.2000955

Raes, G., De Baetselier, P., Noël, W., Beschin, A., Brombacher, F., & Hassanzadeh Gh, G. (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 71(4), 597–602. doi: 10.1189/jlb.71.4.597

Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get

Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. *Vet. Pathol.*, 51(1), 42–87. doi: 10.1177/0300985813505879

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.*, 5(OCT), 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2014.00532

Recalcati, S., Gammella, E., & Cairo, G. (2019). Ironing out macrophage immunometabolism. *Pharmaceuticals*, 12(2), 1–10. doi: 10.3390/ph12020094

Recalcati, S., Locati, M., Gammella, E., Invernizzi, P., & Cairo, G. (2012). Iron levels in polarized macrophages: Regulation of immunity and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 11(12), 883–889. doi: 10.1016/j.autrev.2012.03.003

Recalcati, S., Locati, M., Marini, A., Santambrogio, P., Zaninotto, F., De Pizzol, M., Zammataro, L., Girelli, D., & Cairo, G. (2010). Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur. J. Immunol.*, 40(3), 824–835. doi: 10.1002/eji.200939889

Reddy, S. P., & Mehta, D. (2017). Lung Interstitial Macrophages Redefined: It Is Not That Simple Anymore. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 57(2), 135–136. doi: 10.1165/rcmb.2017-0158ED

Röszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.*, 2015, 1–16. doi: 10.1155/2015/816460

Russell, W., & Burch, R. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique* (1st ed.). Methuen & Co LTD.

Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., Miyake, T., Matsushita, K., Okazaki, T., Saitoh, T., Honma, K., Matsuyama, T., Yui, K., Tsujimura, T., Standley, D. M., Nakanishi, K., Nakai, K., & Akira, S. (2010). The Jmjd3-lrf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.*, 11(10), 936–944. doi: 10.1038/ni.1920

Schulz, C., Perdiguero, E. G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K.,

Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E. W., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J., & Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science* (80-.), 335(6077), 86–90. doi: 10.1126/science.1219179

Semba, H., Takeda, N., Isagawa, T., Sugiura, Y., Honda, K., Wake, M., Miyazawa, H., Yamaguchi, Y., Miura, M., Jenkins, D. M. R., Choi, H., Kim, J. W., Asagiri, M., Cowburn, A. S., Abe, H., Soma, K., Koyama, K., Katoh, M., Sayama, K., ... Komuro, I. (2016). HIF-1 α -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nat. Commun.*, 7(May), 1–10. doi: 10.1038/ncomms11635

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.*, 233(9), 6425–6440. doi: 10.1002/jcp.26429

Shaykhiev, R., Krause, A., Salit, J., Strulovici-Barel, Y., Harvey, B.-G., O'Connor, T. P., & Crystal, R. G. (2009). Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Immunol.*, 183(4), 2867–2883. doi: 10.4049/jimmunol.0900473

Shi, L., Jiang, Q., Bushkin, Y., Subbian, S., & Tyagi, S. (2019). Biphasic dynamics of macrophage immunometabolism during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *MBio*, 10(2), 1–19. doi: 10.1128/mBio.02550-18

Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.*, 122(3), 787–795. doi: 10.1172/JCI59643

Slavjansky, K. (1866). Experimentelle Beiträge zur Pneumonokoniosis-Lehre. *Arch. Für Pathol. Anat. Und Physiol. Und Für Klin. Med.*, 48(2), 326–332. doi: 10.1007/BF01986371

Smith, M. W., Schmidt, J. E., Rehg, J. E., Orihuela, C. J., & McCullers, J. A. (2007). Induction of pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Comp. Med.*, 57(1), 82–89.

Soroosh, P., Doherty, T. A., Duan, W., Mehta, A. K., Choi, H., Adams, Y. F., Mikulski, Z., Khorram, N., Rosenthal, P., Broide, D. H., & Croft, M. (2013). Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J. Exp.*

Med., 210(4), 775–788. doi: 10.1084/jem.20121849

Stein, B. M., Keshav, S., Harris, N., & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation By Michael Stein, Satish Keshav, Neil Harris,* and Siamon Gordon. *J Exp Med*, 176(July), 287–292.

Stempin, C. C., Dulgerian, L. R., Garrido, V. V., & Cerban, F. M. (2010). Arginase in parasitic infections: Macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010. doi: 10.1155/2010/683485

Stingl, G., Wolff-Schreiner, E. C., Pichler, W. J., Gschnait, F., Knapp, W., & Wolff, K. (1977). Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature*, 268(5617), 245–246. doi: 10.1038/268245a0

Stout, R. D., & Suttles, J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.*, 76(3), 509–513. doi: 10.1189/jlb.0504272

Sulahian, T. H., Högger, P., Wahner, A. E., Wardwell, K., Goulding, N. J., Sorg, C., Droste, A., Stehling, M., Wallace, P. K., Morganelli, P. M., & Guyre, P. M. (2000). Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*, 12(9), 1312–1321. doi: 10.1006/cyto.2000.0720

Tan, S. Y. S., & Krasnow, M. A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Dev.*, 143(8), 1318–1327. doi: 10.1242/dev.129122

Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., ... O'Neill, L. A. J. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*, 496(7444), 238–242. doi: 10.1038/nature11986

Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., & Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 901–944. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816

Thapa, B., & Lee, K. (2019). Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB Rep.*, 52(6), 360–372. doi: 10.5483/BMBRep.2019.52.6.140

Thomas, E. D., Ramberg, R. E., Sale, G. E., Sparkes, R. S., & Golde, D. W. (1976). Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science*, 192(4243), 1016–1018. doi: 10.1126/science.775638

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 28(3), 603–661. doi: 10.1128/CMR.00134-14

Tsuchiya, T., Nakao, N., Yamamoto, S., Hirai, Y., Miyamoto, K., & Tsujibo, H. (2012). NK1.1 + cells regulate neutrophil migration in mice with *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Microbiol. Immunol.*, 56(2), 107–116. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00402.x

van den Berg, M. P., Meurs, H., & Gosens, R. (2018). Targeting arginase and nitric oxide metabolism in chronic airway diseases and their co-morbidities. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 40, 126–133. doi: 10.1016/j.coph.2018.04.010

van den Bossche, J., Baardman, J., Otto, N. A., van der Velden, S., Neele, A. E., van den Berg, S. M., Luque-Martin, R., Chen, H. J., Boshuizen, M. C. S., Ahmed, M., Hoeksema, M. A., de Vos, A. F., & de Winther, M. P. J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep.*, 17(3), 684–696. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.008

van den Heuvel, M. M., Tensen, C. P., van As, J. H., van Den Berg, T. K., Fluitsma, D. M., Dijkstra, C. D., Döpp, E. A., Droste, A., van Gaalen, F. A., Sorg, C., Högger, P., & Beelen, R. H. J. (1999). Regulation of CD163 on human macrophages: Cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J. Leukoc. Biol.*, 66(5), 858–866. doi: 10.1002/jlb.66.5.858

van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes. *J. Exp. Med.*, 128(3), 415–435. doi: 10.1084/jem.128.3.415

Veremeyko, T., Siddiqui, S., Sotnikov, I., Yung, A., & Ponomarev, E. D. (2013). IL-4/IL-

13-dependent and independent expression of miR-124 and its contribution to M2 phenotype of monocytic cells in normal conditions and during allergic inflammation. *PLoS One*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0081774

Verreck, F. A. W., De Boer, T., Langenberg, D. M. L., Hoeve, M. A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., De Waal-Malefyt, R., & Ottenhoff, T. H. M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(13), 4560–4565. doi: 10.1073/pnas.0400983101

Viniegra, A., Goldberg, H., Çil, Fine, N., Sheikh, Z., Galli, M., Freire, M., Wang, Y., Van Dyke, T. E., Glogauer, M., & Sima, C. (2018). Resolving Macrophages Counter Osteolysis by Anabolic Actions on Bone Cells. *J. Dent. Res.*, 97(10), 1160–1169. doi: 10.1177/0022034518777973

Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The metabolic signature of macrophage responses. *Front. Immunol.*, 10(JULY), 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2019.01462

Volkman, A. (1966). The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal exudates in rats. *J. Exp. Med.*, 124(2), 241–254. doi: 10.1084/jem.124.2.241

Volkman, A., Chang, N. C., Strausbauch, P. H., & Morahan, P. S. (1983). Differential effects of chronic monocyte depletion on macrophage populations. *Lab. Invest.*, 49(3), 291–298. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6887784>

Volkman, A., & Gowans, J. L. (1965). The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *Br. J. Exp. Pathol.*, 46, 62–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14295560>

Wang, L. xun, Zhang, S. xi, Wu, H. juan, Rong, X. lu, & Guo, J. (2019a). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J. Leukoc. Biol.*, 106(2), 345–358. doi: 10.1002/JLB.3RU1018-378RR

Wang, S., Ye, Q., Wang, K., Zeng, X., Huang, S., Yu, H., Ge, Q., Qi, D., & Qiao, S. (2019b). Enhancement of Macrophage Function by the Antimicrobial Peptide Sublancin Protects Mice from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Res.*, 2019. doi: 10.1155/2019/3979352

Wang, T., Liu, H., Lian, G., Zhang, S. Y., Wang, X., & Jiang, C. (2017). HIF1 α -Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators Inflamm.*, 2017. doi: 10.1155/2017/9029327

Wardenburg, J. B., Patel, R. J., & Schneewind, O. (2007). Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect. Immun.*, 75(2), 1040–1044. doi: 10.1128/IAI.01313-06

Welch, J. S., Escoubet-Lozach, L., Sykes, D. B., Liddiard, K., Greaves, D. R., & Glass, C. K. (2002). T H2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 277(45), 42821–42829. doi: 10.1074/jbc.M205873200

Westphalen, K., Gusarova, G. A., Islam, M. N., Subramanian, M., Cohen, T. S., Prince, A. S., & Bhattacharya, J. (2014). Sessile alveolar macrophages modulate immunity through connexin 43-based epithelial communication. *Nature*, 506(7489), 503–506. doi: 10.1038/nature12902.Sessile

Whyte, C. S., Bishop, E. T., Ruckerl, D., Gaspar-Pereira, S., Barker, R. N., Allen, J. E., Rees, A. J., & Wilson, H. M. (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *J. Leukoc. Biol.*, 90(5), 845–854. doi: 10.1189/jlb.1110644

Wienhold, S.-M., Brack, M., Nouailles, G., Seitz, C., Ross, A., Ziehr, H., Dietert, K., Gurtner, C., Kershaw, O., Gruber, A. D., Rohde, M., Suttorp, N., Rohde, C., & Witzernath, M. (2018c). Therapeutic intratracheal phage application against *Acinetobacter baumannii* lung infection in mice. *Respir. Infect.*, PA5453. doi: 10.1183/13993003.congress-2018.pa5453

Wienhold, S., Brack, M., Nouailles, G., Seitz, C., Ross, A., Ziehr, H., Gurtner, C., Dietert, K., Gruber, A., Rohde, M., Suttorp, N., Rohde, C., & Witzernath, M. (2018a). Therapeutic intratracheal application of a lytic phage against *Acinetobacter baumannii* lung infection in mice. *Pneumologie*, 72(S 01), S67–S68. doi: 10.1055/s-0037-1619296

Wienhold, S., Brack, M., Nouailles, G., Seitz, C., Ross, A., Ziehr, H., Gurtner, C., Dietert, K., Gruber, A., Rohde, M., Suttorp, N., Rohde, C., & Witzernath, M. (2018b). Therapeutic

intratracheal application of a lytic phage against *Acinetobacter baumannii* lung infection in mice. *Herbsttagung Der Sekt. Zellbiologie Und Infekt. Und Tuberkulose Der Dtsch. Gesellschaft Für Pneumol. Und Beatmungsmedizin e.V.*, 72. doi: 10.1055/s-0037-1615315

Wilson, H. M. (2014). SOCS proteins in macrophage polarization and function. *Front. Immunol.*, 5(JUL), 1–5. doi: 10.3389/fimmu.2014.0035

Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445–455. doi: 10.1038/nature12034

Wynn, T. A., & Vannella, K. M. (2016). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, 44(3), 450–462. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015

Wynn, T., & Barron, L. (2010). Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin. Liver Dis.*, 30(03), 245–257. doi: 10.1055/s-0030-1255354

Xu, F., Kang, Y., Zhang, H., Piao, Z., Yin, H., Diao, R., Xia, J., & Shi, L. (2013). Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of staphylococcus aureus pulmonary infection. *J. Infect. Dis.*, 208(3), 528–538. doi: 10.1093/infdis/jit177

Xu, L., Hilliard, B., Carmody, R. J., Tsabary, G., Shin, H., Christianson, D. W., & Chen, Y. H. (2003). Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology*, 110(1), 141–148. doi: 10.1046/j.1365-2567.2003.01713.x

Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., DeNardo, D., Gohel, T. D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M. R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T. C., ... Schultze, J. L. (2014). Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*, 40(2), 274–288. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.006

Yajjala, V. K., Thomas, V. C., Bauer, C., Scherr, T. D., Fischer, K. J., Fey, P. D., Bayles, K. W., Kielian, T., & Sun, K. (2016). Resistance to Acute Macrophage Killing Promotes Airway Fitness of Prevalent Community-Acquired *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Immunol.*, 196(10), 4196–4203. doi: 10.4049/jimmunol.1600081

Yamazato, Y., Yamazato, M., Ishida, A., Fujita, J., & Ohya, Y. (2018). Intratracheal

Administration of Autologous Bone Marrow-Derived Cells Ameliorates Monocrotaline-Induced Pulmonary Vessel Remodeling and Lung Inflammation in Rats. *Lung*, 196(2), 147–155. doi: 10.1007/s00408-017-0075-5

Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91. doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001

Zaynagetdinov, R., Sherrill, T. P., Kendall, P. L., Segal, B. H., Weller, K. P., Tighe, R. M., & Blackwell, T. S. (2013). Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 49(2), 180–189. doi: 10.1165/rcmb.2012-0366MA

Zhang, W., Baban, B., Rojas, M., Tofigh, S., Virmani, S. K., Patel, C., Behzadian, M. A., Romero, M. J., Caldwell, R. W., & Caldwell, R. B. (2009). Arginase activity mediates retinal inflammation in endotoxin-induced uveitis. *Am. J. Pathol.*, 175(2), 891–902. doi: 10.2353/ajpath.2009.081115

Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M., & Cohen, P. L. (2012). Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction. *J. Immunol.*, 189(7), 3508–3520. doi: 10.4049/jimmunol.1200662

Zwadlo, G., Voegelé, R., Osthoff, K. S., & Sorg, C. (1987). A Monoclonal Antibody to a Novel Differentiation Antigen on Human Macrophages Associated with the Down-Regulatory Phase of the Inflammatory Process. *Pathobiology*, 55(6), 295–304. doi: 10.1159/000163432

10 Anhang

Tabelle 10: Einstellungen der verwendeten Algorithmen im AcB-Modell

	Acinetobacter			
	CD68	Arg1	iNOS	CD163
*** Algorithm Inputs ***				
Algorithm	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9
Version	9.2	9.2	9.2	9.2
Image Zoom	1	1	1	1
Classifier	27_IHC affected _unaffected	27_IHC affected _unaffected	27_IHC affected _unaffected	27_IHC affected _unaffected
Class List*	affected	affected	affected	affected
Classifier Neighborhood	52	52	52	52
Pixel Size (um)	0.2533	0.2533	0.2533	0.2533
Clear Area Intensity	240	240	240	240
Counterstain Red OD	0.697	0.697	0.697	0.697
Counterstain Green OD	0.643	0.643	0.643	0.643
Counterstain Blue OD	0.318	0.318	0.318	0.318
Biomarker 1 Red OD	0.245	0.245	0.245	0.245
Biomarker 1 Green OD	0.509	0.509	0.509	0.509
Biomarker 1 Blue OD	0.825	0.825	0.825	0.825
Biomarker 2 Red OD	0	0	0	0
Biomarker 2 Green OD	0	0	0	0
Biomarker 2 Blue OD	0	0	0	0
Type	All Stains	All Stains	All Stains	Default
Method	Automatic	Automatic	Automatic	Automatic
-- Threshold Lower Limit	0	0	0	0
-- Threshold Upper Limit	230	210	210	230
Smoothing (um)	1	1	1	1
Smoothing (Pixels)	4	4	4	4
Merging	1.8	1.9	1.9	2.1
Trimming	Medium	Medium	Medium	Medium
Min Size (um ²)	7	7	7	7
Min Size (Pixels)	109	109	109	109
Max Size (um ²)	1000000	1000	1000	1000
Max Size (Pixels)	15585800	15586	15586	15586
Roundness	0.1	0.1	0.1	0
Compactness	0	0	0	0
Elongation	0.1	0.1	0.1	0
Remove Light Objects	0	0	0	0
Weak (1+) Threshold	200	200	200	185
Moderate (2+) Threshold	187	180	187	177
Strong (3+) Threshold	165	160	170	165
Dark Nuclei Removal	0	0	0	0
Display Plots	No	No	No	No

*Darstellung der Analysen der affected Areas. Für die Analysen der unaffected Areas wurde unter Class-List „unaffected“ ausgewählt.

Tabelle 11: Einstellungen der verwendeten Algorithmen im Staph-Modell

	Staphylokokken			
	CD68	Arg1	iNOS	CD163
*** Algorithm Inputs ***				
Algorithm	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9
Version	9.2	9.2	9.2	9.2
Image Zoom	1	1	1	1
Classifier	27_IHC affected _unaffected	27_IHC affected _unaffected	27_IHC affected _unaffected	27_IHC affected _unaffected
Class List*	affected	affected	affected	affected
Classifier Neighborhood	52	52	52	52
Pixel Size (um)	0.2533	0.2533	0.2533	0.2533
Clear Area Intensity	240	240	240	240
Counterstain Red OD	0.696858	0.696858	0.696858	0.697
Counterstain Green OD	0.643073	0.643073	0.643073	0.643
Counterstain Blue OD	0.317563	0.317563	0.317563	0.318
Biomarker 1 Red OD	0.244583	0.244583	0.244583	0.245
Biomarker 1 Green OD	0.509334	0.509334	0.509334	0.509
Biomarker 1 Blue OD	0.825081	0.825081	0.825081	0.825
Biomarker 2 Red OD	0	0	0	0
Biomarker 2 Green OD	0	0	0	0
Biomarker 2 Blue OD	0	0	0	0
Type	All Stains	All Stains	All Stains	Default
Method	Automatic	Automatic	Automatic	Automatic
-- Threshold Lower Limit	0	0	0	0
-- Threshold Upper Limit	230	210	210	230
Smoothing (um)	1	1	1	1
Smoothing (Pixels)	4	4	4	4
Merging	1.8	1.9	1.9	2.1
Trimming	Medium	Medium	Medium	Medium
Min Size (um ²)	7	7	7	7
Min Size (Pixels)	109	109	109	109
Max Size (um ²)	1000000	1000	1000	1000
Max Size (Pixels)	15585800	15586	15586	15586
Roundness	0.1	0.1	0.1	0
Compactness	0	0	0	0
Elongation	0.1	0.1	0.1	0
Remove Light Objects	0	0	0	0
Weak (1+) Threshold	220	200	220	185
Moderate (2+) Threshold	215	190	205	177
Strong (3+) Threshold	190	180	185	165
Dark Nuclei Removal	0	0	0	0
Display Plots	No	No	No	No

*Darstellung der Analysen der affected Areas. Für die Analysen der unaffected Areas wurde unter Class-List „unaffected“ ausgewählt.

Tabelle 12: Phagen- vs. Pufferbehandlung -CD68-positive Zellen/mm² affected Area im AcB-Modell

CD68	(+Z)/mm ² *		Faktor der Differenz	Oberes KI	Unteres KI	p-Wert
	Puffer	Phagen				
24h-AcB	244,7	199,4	0,82	2,08	0,32	0,96490
48h-AcB	524	720,4	1,38	3,50	0,54	0,8474
24h-PBS	311,5	313,9	1,01	3,47	0,29	>0,9999
48h-PBS	310,9	238,9	0,77	2,42	0,25	0,9581

*(+Z)/mm² Geometrischer Mittelwert

Tabelle 13: Phagen- vs. Pufferbehandlung -Arg1-positive Zellen/mm² affected Area im AcB-Modell

Arg1	(+Z)/mm ² *		Faktor der Differenz	Oberes KI	Unteres KI	p-Wert
	Puffer	Phagen				
24h-AcB	649,2	665,6	1,03	1,49	0,70	0,99960
48h-AcB	1211	1010	0,83	1,21	0,57	0,6101
24h-PBS	167,8	176,3	1,05	1,73	0,64	0,9982
48h-PBS	178,7	168,6	0,94	1,50	0,60	0,9955

*(+Z)/mm² Geometrischer Mittelwert

Tabelle 14: Phagen- vs. Pufferbehandlung -iNOS-positive Zellen/mm² affected Area im AcB-Modell

iNOS	(+Z)/mm ² *		Faktor der Differenz	Oberes KI	Unteres KI	p-Wert
	Puffer	Phagen				
24h-AcB	181,9	144,1	0,79	2,20	0,29	0,95990
48h-AcB	169,4	215,8	1,27	3,55	0,46	0,9536
24h-PBS	5,499	5,781	1,05	4,07	0,27	>0,9999
48h-PBS	2,862	2,804	0,98	3,43	0,28	>0,9999

*(+Z)/mm² Geometrischer Mittelwert

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Robert Klopffleisch** für die stets pragmatische Betreuung dieser Arbeit, für sein Vertrauen sowie für die vielen fachlichen sowie nicht-fachlichen Gespräche.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Sophie Merz für ihre unermüdliche und zuverlässige Unterstützung, ihre Freundschaft und ihr Verständnis in allen Lebenslagen.

Bei Frau Dr. Kristina Dietert, Ph.D., bedanke ich mich für ihren fachlichen Rat und die zur Verfügung gestellten Lungenproben des Staphylokokken-Modells.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Martin Witzernath der Charité Berlin für die zur Verfügung gestellten Lungenproben des Acinetobacter-Modells.

Bei Frau Nicole Huth bedanke ich mich für ihre kompetente technische Unterstützung im Labor.

Bei Alexander Bartel vom Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie bedanke ich mich für seine kompetente statistische Beratung.

Bei Hannah Pischon, Ph.D., Moritz Radbruch, Florian Bartenschlager und Dr. Christof Bertram bedanke ich mich herzlich für die vielen lustigen Mittags- und Kaffeepausen.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie danke ich für die nette Atmosphäre und so manches unterhaltsame Gespräch auf dem Gang.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und insbesondere meinem Mann Martin für ihre immerwährende Unterstützung und Liebe.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Interessenskonflikte:

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

Berlin, den 01.12.2021

Anne Petrick