

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Funktion von intrazerebralen Makrophagen beim *Staphylococcus aureus*-induzierten Hirnabszess im Kontext der IL-4R-abhängigen Aktivierung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lydia Zobel, geb. Richter

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.06.2017

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	V
Abstract	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der humane Hirnabszess.....	1
1.2 Der Hirnabszess im Tiermodell	4
1.3 Die zerebrale Immunantwort	5
1.3.1 Das T _H 1/T _H 2-Konzept	6
1.3.2 Die phänotypische Plastizität aktivierter Makrophagen.....	8
1.3.2.1 Struktur und Funktion des IL-4-Rezeptors	10
1.3.2.2 Alternative Aktivierung von Makrophagen	12
1.3.3 Die Rolle alternativ aktivierter Makrophagen in verschiedenen Krankheitsmodellen	13
1.3.4 Bedeutung der T _H 2/M2-Antwort für die Wundheilung und Fibrose	15
1.4 Bisherige Erkenntnisse am Modell des <i>S. aureus</i> -induzierten Hirnabszesses .	17
1.5 Ziel des Forschungsprojektes	19
2 MATERIAL	21
2.1 Allgemeine Chemikalien.....	21
2.2 Molekulargewichtsmarker.....	21
2.3 Zellkulturreagenzien	21
2.4 Reagenzien für die Histologie	22
2.5 Antikörper.....	22
2.6 PCR-Sonden	23
2.7 Kommerzielle Kits und Enzyme.....	24
2.8 Laborausüstung und Hilfsmittel.....	24

3 METHODEN	25
3.1 Mäuse	25
3.2 Genotypisierung der IL-4R α ^{-/-} -Mäuse	25
3.3 Infektionsmodell	26
3.3.1 Kultivierung der Bakterien.....	26
3.3.2 Herstellung der Bakterien-Agarose-Kügelchen.....	27
3.3.3 Injektion der mit <i>S. aureus</i> beladenen Agarose-Kügelchen	27
3.3.4 Klinische Überwachung der Krankheitsaktivität	28
3.3.5 Sektion der Mäuse und Gehirnentnahme	29
3.3.5.1 Konservierung für histologische Untersuchungen.....	29
3.3.5.2 Weiterverarbeitung für die Durchflusszytometrie	30
3.3.6 Ausplattieren der Zellsuspension für die Bestimmung der KBE	30
3.4 Durchflusszytometrie.....	30
3.4.1 Zellseparation mit Hilfe eines Percoll-Gradienten	31
3.4.2 Zellfärbungen.....	32
3.4.2.1 Kultivierung und Stimulation der T-Zellen	32
3.4.2.2 Färbung von Oberflächen-Antigenen.....	32
3.4.2.3 Färbung intrazellulärer Antigene.....	33
3.4.3 Kompensationsbeads	33
3.4.4 Messung mit dem Durchflusszytometer.....	33
3.5 Histopathologie	34
3.5.1 Herstellung der Gefrierschnitte, allgemeine Vor- und Nachbehandlung	34
3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E).....	35
3.5.3 Gram-Färbung	35
3.5.4 Immunhistochemische Färbungen.....	36
3.5.4.1 Immunfluoreszenz-Färbungen.....	37
3.6 Quantitative <i>Real-Time</i> Polymerase-Kettenreaktion	37
3.6.1 RNA-Isolation.....	37
3.6.2 cDNA-Synthese	38
3.6.3 qPCR	39
3.6.4 Analysemethode und Auswertung	39
3.7 Statistische Auswertung.....	40
3.8 Versuchsaufbau	40

4 ERGEBNISSE	43
4.1 Klinischer Verlauf der Hirnabszessentwicklung.....	43
4.2 Quantitative Bestimmung zerebraler Bakterien und Leukozyten.....	44
4.3 Zellulärer Aufbau, Zytokin- und Chemokinprofil im Verlauf der Hirnabszessentwicklung.....	46
4.3.1 Dominierende Zellpopulationen und Mediatoren der Frühphase.....	46
4.3.2 Molekulare Mechanismen der Spätphase der Abszessbildung, speziell der Kapselbildung	52
4.4 Charakteristik der Hirnabszessentwicklung bei IL-4R α ^{-/-} -Mäusen	56
4.4.1 Klinischer Verlauf bei IL-4R α -Defizienz	56
4.4.2 Einfluss der IL-4R α -Defizienz in der Spätphase der Infektion.....	58
4.4.2.1 Quantitative Bestimmung zerebraler Bakterien und Leukozyten	58
4.4.2.2 Abszessmorphologie und spezifische Mechanismen der Kapselbildung bei IL-4R α -Defizienz.....	59
4.4.2.3 Makrophagenpolarisation bei IL-4R α -Defizienz	64
4.4.3 Potentielle IL-4R α -unabhängige Immunregulationsmechanismen.....	66
 5 DISKUSSION.....	68
5.1 Makrophagenpolarisation im Verlauf der Hirnabszessentwicklung	69
5.2 Der Einfluss der T _H 2/M2-Antwort auf den Krankheitsverlauf und die Kapselbildung.....	73
5.3 Relevanz des IL-4R α für die Immunantwort und Kapselbildung.....	76
5.4. Potentielle IL-4R α -unabhängige Aktivierungswege	80
5.5 Fazit und Ausblick	84
5.5.1 Unterschiede zur humanen Situation	85
5.5.2 Therapeutische Konsequenz.....	86
 6 Literaturverzeichnis.....	88
 Eidesstattliche Versicherung	XII
Lebenslauf.....	XIV
Publikationliste.....	XV
Danksagung.....	XVI

Zusammenfassung

Der Hirnabszess stellt trotz Einführung der Antibiotikatherapie und moderner Diagnostik auch heute noch eine relevante Erkrankung des ZNS dar, insbesondere in Entwicklungsländern. Es handelt sich um eine fokale Entzündung des Zentralnervensystems, die als Reaktion auf eine erregerbedingte Zerstörung von Hirnparenchym entsteht und in einer fibrösen Abkapselung des Entzündungsherdes zum Schutz des umliegenden gesunden Gewebes resultiert. Er bietet ein ideales Modell zur Untersuchung des Zusammenspiels immunstimulatorischer und -regulatorischer Reaktionen im Verlauf einer Infektion mit einer akuten und einer chronischen Phase mit abschließender fibröser Reaktion.

Die Entwicklung des Hirnabszesses verläuft sowohl im humanen ZNS als auch im für diese Arbeit verwendeten, murinen Modell des *Staphylococcus aureus*-induzierten Hirnabszess in charakteristischen, aufeinanderfolgenden Stadien. So zeigte sich bei der Untersuchung von infizierten C57BL/6-Mäusen (Wildtyp) eine auf die Infektion folgende massive Einwanderung von CD11b- bzw. F4/80-positiven Entzündungszellen wie Granulozyten und Makrophagen, sowie eine Aktivierung von Mikroglia. Begleitet wurde diese von einer Hochregulation der Genexpression T_H1-assoziiierter proinflammatorischer und bakterizider Mediatoren wie *Il12a*, *Tnf*, *Ifng*, sowie *Nos2* (iNOS). Es bildete sich in der Folge aus einer diffusen Zerebritis ein nekrotisches Zentrum mit zwischen Granulozyten und iNOS-exprimierenden M1-Makrophagen eingelagerten Bakterienkolonien, gesäumt durch infiltrierende CD4-positive T-Zellen. Nach, z.T. aber auch überlappend mit der initialen T_H1/M1-dominierten Immunreaktion konnte eine Umstellung der Zellpopulationen und deren Sekretionsmuster hin zu einer antiinflammatorischen T_H2/M2-Antwort beobachtet werden, welche die Heilungsphase und fibröse Abkapselung des Hirnabszesses bestimmte. Dies zeigte sich in der Genexpression T_H2- bzw. M2-assoziiierter Mediatoren wie *Il4* und *Il13*, sowie *Mrc1* (CD206), *Clec10a* (CD301), *Chi3l3* (Ym1) und *Ccl17* und zusätzlich von fibroseinduzierenden Zytokinen wie *Il10* und *Tgfb1*. Zudem konnten sogenannte alternativ aktivierte CD206⁺-Makrophagen in direkter Umgebung der schützenden Kollagenkapsel nachgewiesen werden und zeigten eine räumliche Assoziation mit dem Wachstumsfaktor VEGF-A. Basierend auf diesen Ergebnissen postulierten wir, dass

derart aktivierte M2-Makrophagen für die Kapselbildung in der T_H2-medierten Reparaturphase notwendig sind.

Die anschließende Untersuchung IL-4R α -defizienter Mäuse, denen der gemeinsame Rezeptor für die Schlüsselzytokine IL-4 und IL-13 der T_H2-Immunreaktion fehlt, ergab keinen von der Wildtyp-Maus differenzierenden spezifischen klinischen Phänotyp. Allerdings zeigte sich eine signifikante Herabregulation der T_H2-Zytokine *Il13* und *Il5*, sowie der profibrotischen Mediatoren *Il10*, *Tgfb1* und *Ccl17*. Diese führte morphologisch zwar zu einer alterierten M2-Antwort und Fibrosereaktion, dennoch konnte eine Expression der charakteristischen Marker und eine konsekutive Kapselbildung im chronischen Stadium detektiert werden. Eine mögliche Induktion kompensatorischer Immunmechanismen für eine IL-4R α -unabhängige alternative Aktivierung bzw. Bildung der Kollagenkapsel konnte durch die Analyse potentieller Signalwege über IL-13/IL-13R α 2, IL-10R, IL-17A/IL-17R α , sowie TLR/MyD88 jedoch nicht gezeigt werden.

Abstract

Despite the introduction of antibiotics and improved diagnostics brain abscess still is a serious, life-threatening infection, especially in developing countries. It is a focal inflammation of the central nervous system, which develops as a reaction to the destruction of cerebral tissue by invading pathogens and results in a fibrous encapsulation to protect the surrounding healthy brain parenchyma.

The development of brain abscess in humans, matching our model of murine *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess, is characterized by a distinctive sequence of morphological and immunological events.

The present work examining C57BL/6 mice (wildtype) showed a massive invasion of granulocytes and macrophages as well as an activation of microglia as an initial inflammatory reaction to the infection. This process was accompanied by an upregulation of gene expression of T_H1-associated proinflammatory and bactericidal mediators such as *Il12a*, *Tnf*, *Ifng* and *Nos2* (iNOS). Subsequently, a focal inflammatory lesion developed, characterized by a central necrosis comprising bacteria, granulocytes and iNOS-positive M1-macrophages, surrounded by several layers of CNS-invasive CD4⁺ lymphocytes. Partially overlapping, the early T_H1/M1-dominated immune response was followed by antiinflammatory T_H2/M2-mediated mechanisms, leading to capsule formation during advanced stages of disease. Accordingly, qPCR-analysis showed an increase of key T_H2-dependent markers such as *Il4*, *Il13*, *Mrc1* (CD206), *Clec10a* (CD301), *Chi3l3* (Ym1) and *Ccl17* as well as an upregulation of *Il10* and *Tgfb1*, two main cytokines associated with fibrosis. Furthermore, CD206-positive alternatively activated macrophages (M2) were found in the immediate vicinity of the protective capsule and were closely associated with VEGF-A.

Based on these findings, we hypothesized that alternatively activated macrophage polarization is crucial for beneficial capsule formation during the healing phase of brain abscess formation.

Remarkably, IL-4R α -deficient mice, which do not signal via the T_H2-master cytokines IL-4 and IL-13 did not show a distinctive clinical phenotype although they developed a brain abscess morphology divergent from identically infected wildtype mice. Downregulation of gene expression of the T_H2-associated cytokines *Il13* and *Il5* in addition to downregulation of the profibrotic mediators *Il10*, *Tgfb1* and *Ccl17*

morphologically altered the response of M2 macrophages and fibroblasts. Nevertheless, expression of CD206 on macrophages along with a fibrous capsule could be detected. This indicated the possibility of IL-4R α -independent alternative activation of macrophages and IL-4R α -independent formation of a fibrous capsule in brain abscess. However, gene expression of known potential compensatory immune mechanisms acting via the IL-13/IL-13R α 2-, IL-10R-, IL-17A/IL-17R α - or TLR/MyD88-axis were not significantly different in IL-4R α ^{-/-} mice as compared to wildtype mice.

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
APC	Antigen-präsentierende Zellen bzw. Allophycocyanin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
CT	Computertomographie
C _T -Wert	cycle threshold (Schwellenwert-Zyklus)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidinphenylindol
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FIZZ	found in the inflammatory zone
FoxP3	forkhead box P3
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
GATA3	GATA-DNA-Sequenz bindendes Protein 3
GFAP	glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution (Hanks' Salzlösung)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRPO	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.c.	intrazerebral
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-4R α	Interleukin-4-Rezeptor alpha
IL-4R $\alpha^{-/-}$ Maus	Interleukin-4-Rezeptor alpha defiziente Maus
IL-10R	Interleukin-10-Rezeptor
IL-13R α	Interleukin-13-Rezeptor alpha
IL-17R α	Interleukin-17-Rezeptor alpha
iNOS	inducible nitric oxide synthase (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase)
IRF	interferon regulatory factor
Jak	Janus-Kinase
KBE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton (atomare Masseinheit)
l	Liter
LB-Medium	lysogeny broth medium
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
M1	sog. „klassisch aktivierte“ Makrophagen
M2 (a,b,c)	sog. „alternativ aktivierte“ Makrophagen
mg	Milligramm
MGL	Macrophage Galactose N-Acetyl-Galactosamine Specific Lectin
MHC	major histocompatibility complex (Hauptkompatibilitätskomplex)
min	Minute
ml	Milliliter
MMPs	matrix metalloproteases (Matrix-Metalloproteinasen)
μ l	Mikroliter
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
MR	regulatory macrophages (regulatorische Makrophagen)
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid, isotonische Kochsalzlösung 0,9%
n.d.	not detected (nicht nachgewiesen)
n.i.	nicht infiziert
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid

PFA	Paraformaldehyd
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
p.i.	post infectionem (nach der Infektion)
qPCR	quantitative <i>Real-Time</i> (<i>Echtzeit</i> -) PCR
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RQ	relative quantity (relative Quantität)
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
STAT	signal transducer and activator of transcription (Signaltransduktoren und Aktivatoren der Signaltransduktion)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TGF- β	transforming growth factor beta (Transformierender Wachstumsfaktor beta)
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TLR	toll-like receptor (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor (Gefäßendothelwachstumsfaktor)
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Der humane Hirnabszess

Der Hirnabszess ist eine lokale Entzündung des Zentralnervensystems, die mit erregerbedingter Zerstörung von Gewebe, zentraler Eiterbildung und anschließender bindegewebiger Abgrenzung des umgebenden Gewebes einhergeht.

Mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 1 pro 100 000 Einwohner stellt der Hirnabszess heute in sogenannten Industrieländern eine relativ seltene Erkrankung dar. In Entwicklungs- und Schwellenländern wie Indien und Afrika sind die Menschen jedoch weitaus häufiger betroffen (1-5). Aufgrund der frühzeitigen Diagnosestellung und modernen Therapiemöglichkeiten von zugrundeliegenden entzündlichen Prozessen wie Sinusitiden oder Otitiden schien das Auftreten von Hirnabszessen bis in die frühen 90er Jahre langsam zu sinken (1). Allerdings belegen einige Studien auch einen Anstieg der Inzidenz, welcher durch die steigende Zahl von opportunistischen Infektionen bei Immunsupprimierten, speziell bei HIV-Patienten, aber auch durch die bessere Diagnostik mit hochmodernen bildgebenden Verfahren erklärt wird (2-4).

Fortschritte in der Diagnostik und Therapie führten im Laufe der Zeit zudem zu einer Senkung der Morbidität und Letalität des Hirnabszesses. Ein Durchbruch in der Behandlung gelang dabei erstmals dem schottischen Chirurgen William Macewen, der Ende des 19. Jahrhunderts die Notwendigkeit der frühzeitigen Diagnose und Lokalisation des Abszesses sowie der neurochirurgischen Intervention erkannte (6). Weitere Meilensteine waren die Einführung der modernen Antibiotikatherapie um 1950, der Computertomographie 1974, neuer stereotaktischer Biopsie- und Aspirations- sowie verbesserter mikrobiologischer Untersuchungsmethoden (7). Trotz der deutlichen Reduktion der Letalität des Hirnabszesses von nahezu 100% vor dem späten 19. Jahrhundert auf je nach Studie 4 - 40% in den 70er Jahren bis heute - v.a. abhängig vom initialen neurologischen Befund, von Ursache und Behandlung - bleibt der Hirnabszess als potentiell lebensgefährliche Infektion vor allem in Entwicklungsländern ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem (3,5,8-13).

Ein Hirnabszess entsteht grundsätzlich, wenn bestimmte Mikroorganismen in das Parenchym des ZNS gelangen und diese nicht wieder komplett eliminiert werden können. Zusätzlich werden in diesem speziellen Fall Abwehrmechanismen in Gang gesetzt, die den Erreger an der Ausbreitung in das Gehirnparenchym hindern.

Das Erregerspektrum ist dabei abhängig vom infektiösen Primärherd und Immunstatus des Patienten. Ursache ist in etwa 50% der Fälle eine Absiedlung von Bakterien eines nahe gelegenen Entzündungsherdes wie beispielsweise einer Otitis media, Sinusitis, Mastoiditis oder einer Entzündung der Zähne (14-17). Hierbei entstehen meist solitäre, rindennah gelegene Abszesse im Frontal- oder Temporallappen sowie im Cerebellum. Es handelt sich dabei vorwiegend um Mischinfektionen aerober Streptokokken, Enterobakterien, Staphylokokken, *Haemophilus sp.*, *Pseudomonas sp.* bzw. anaerober *Bacteroides sp.* (4). Bei 10 - 25% der Betroffenen kommt es zu einer hämatogenen Streuung von Erregern, wodurch oftmals multifokale Abszesse im Versorgungsbereich der Arteria cerebri media entstehen. Als Primärherd lassen sich hierfür vor allem Endokarditiden und pulmonale Infekte, aber auch intraabdominelle Infektionen, Osteomyelitiden oder Hautinfektionen identifizieren (3-5,12,14,18). Auch in diesem Kontext stellen Streptokokken und Staphylokokken die häufigsten Erreger dar. Eine weitere Eintrittspforte für Erreger bieten penetrierende Kopfverletzungen oder neurochirurgische Eingriffe, wobei der Abszess nachfolgend am Ort des Traumas entsteht. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist bei diesem Infektionsmechanismus das am häufigsten isolierte Bakterium (3,4,7,19). Bei immunsupprimierten Patienten wie HIV-Infizierten oder Transplantatempfängern ist das Erregerspektrum deutlich breiter; sie erleiden Infektionen durch z.B. *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, *Aspergillus spp.* oder *Cryptococcus neoformans* (2). Neben den beschriebenen Infektionswegen wird in ca. 20 - 30% der Fälle keine Ursache gefunden; man bezeichnet solche Hirnabszesse als kryptogen (7).

Ist die Integrität des Gehirns einmal verletzt und können sich Erreger im Gehirn absiedeln, vollzieht sich die Entwicklung des Hirnabszesses in einer typischen Stadiensequenz, welche mittels neuropathologischer Untersuchungen und bildgebender Verfahren charakterisiert wurden. Nach dem initialen Stadium, in dem es zu einer diffusen Entzündung sowie zur Bildung eines Ödems kommt, entwickelt sich der Abszess über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen mit seinem typischen, geschichteten Aufbau, d.h. der zentralen, konfluierenden Nekrose umgeben von eingewanderten Entzündungszellen und einer bindegewebigen Kapsel (20,21).

Die Symptome, die ein Hirnabszess hervorrufen kann, sind u.a. abhängig von der Größe und Lokalisation der Läsion, von der Virulenz der Erreger sowie der Schwere des umliegenden Ödems, allerdings meistens unspezifisch. Kopfschmerzen sind das am häufigsten berichtete Symptom, oftmals begleitet von Übelkeit und Erbrechen als

Zeichen des erhöhten intrakraniellen Drucks (7,8,12). Je nach Studie leiden 20 - 80% der Patienten unter Fieber, was ebenso darauf hindeutet, wie wenig diagnostisch kalkulierbar und unspezifisch sich das Beschwerdebild beim Hirnabszess darstellt (4). Weiterhin können Bewusstseinsstörungen, Papillenödem, Meningismus und fokale neurologische Symptome wie Hemiparese, Aphasie, Sehstörungen, Ataxie sowie Krampfanfälle auftreten (2,12).

Die geringe Spezifität der Symptome erklärt, warum der Hirnabszess schwer zu diagnostizieren und schlecht von anderen raumfordernden Prozessen im ZNS abgrenzbar ist. Zudem geben weder Laborwerte wie die Leukozytenzahl oder die Blutsenkungsgeschwindigkeit, noch eine Untersuchung des Liquors einen klaren Hinweis auf einen sich entwickelnden oder bestehenden Abszess (2,10). Das Anzüchten der Erreger in Blutkulturen gelingt ebenfalls nur selten (5,10). Die diagnostischen Methoden der Wahl sind deshalb heutzutage die Darstellung des Hirnabszesses mittels kranialer Computertomografie (cCT) oder Magnetresonanztomografie (cMRT), insbesondere mit Diffusionsgewichtung (DWI), bei denen sich im fortgeschrittenen Stadium eine typisch ringförmige Kontrastmittelanreicherung zeigt, sowie die Sicherung der Diagnose durch eine stereotaktische Hirnbiopsie. Neuere Methoden wie die Diffusions-Tensor-Bildgebung und die Protonen-MR-Spektroskopie können in Zukunft helfen, den Hirnabszess differentialdiagnostisch insbesondere vom Glioblastom oder zerebralen Tumoren anderer Genese abzugrenzen (5).

Das Behandlungskonzept für den Hirnabszess besteht im Wesentlichen aus einer frühzeitigen Verabreichung antimikrobieller Wirkstoffe, meist in Kombination mit einer chirurgischen Intervention, wenn der Patient operationsfähig ist. Mit Hilfe der minimal-invasiven CT-gestützten stereotaktischen Feinnadelaspiration kann der Abszess entlastet, der Erreger isoliert und eine gezielte intravenöse antibiotische Behandlung begonnen werden. Diese dauert in der Regel sechs bis acht Wochen und ihr Erfolg wird durch bildgebende Verfahren (z.B. CT-Aufnahmen) alle zwei Wochen kontrolliert. Kommt es durch die Drainage zu keiner Besserung oder wurde ein multiresistenter Keim nachgewiesen, kann der Abszess auch chirurgisch komplett entfernt werden. Diese Methode wird aufgrund ihrer Invasivität allerdings nur noch selten angewandt. Neben der umstrittenen adjuvanten Gabe von Glucocorticoiden zur Therapie des umgebenden Hirnödems, wird der prophylaktische temporäre Einsatz von Antikonvulsiva zur Vorbeugung von zerebralen Krampfanfällen empfohlen (5,7). Eine

weitere gefürchtete, in der Regel tödliche Komplikation ist die Ruptur des eitrigen Abszessinhalts in das Ventrikelsystem mit Entstehung einer Ventrikulitis (5).

Zusammengefasst stellt der Hirnabszess noch immer eine schwerwiegende, klinisch relevante Erkrankung des ZNS dar, dessen zugrundeliegende infektionsimmunologische Vorgänge bisher nur unzureichend untersucht sind und dessen therapeutische Versorgung komplex und oftmals schwer zu managen ist.

1.2 Der Hirnabszess im Tiermodell

Tierexperimentelle Modelle haben entscheidend dazu beigetragen das Verständnis über die Entstehung des Hirnabszesses zu verbessern. Dabei wurden Modelle in verschiedenen Tierarten wie Primaten, Katzen und Kaninchen etabliert (22-26). Richard Britt, Dieter Enzmann und Kollegen untersuchten um 1980 erstmals die genauen histopathologischen Vorgänge bei der Entwicklung eines durch alpha-hämolyisierende Streptokokken induzierten Hirnabszesses bei Hunden und korrelierten die Befunde mit ihren aus CT-Untersuchungen und Autopsien gewonnenen Erkenntnissen über den humanen Hirnabszess (20,27).

Der Verlauf der Entstehung eines Hirnabszesses wird seitdem in vier Stadien eingeteilt. In der Initialphase, der frühen Zerebritis, kommt es nach dem Eindringen der Bakterien in den ersten drei Tagen zunächst zu einer diffusen Entzündung des Hirnparenchyms mit Einwanderung von Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen. Es bildet sich in der Folge eine zentral einschmelzende Nekrose, die von gut vaskularisiertem Gewebe und einem stetig wachsenden Ödem umgeben wird. In der Phase der späten Zerebritis, an den Tagen vier bis neun nach der Infektion (post infectionem, p.i.), erreicht die Entzündungsreaktion ihr Maximum, eingewanderte Makrophagen und T-Lymphozyten bilden einen Randsaum um das eitrige Zentrum, Fibroblasten beginnen mit der Bildung von Retikulin als Vorläufer der Kollagenkapsel und es entwickelt sich eine periphere Aktivierung von Astrozyten. Das sich anschließende Stadium der frühen Kapselbildung (Tag 10 bis 13 p.i.) ist charakterisiert durch den Rückgang der zentralen Entzündung und die Ausbildung der bindegewebigen Kapsel, wodurch die Erregerausbreitung verhindert und das umliegende Hirnparenchym geschützt wird. Ab Tag 14 p.i. beginnt die Phase der späten Kapselbildung, in der sich der endgültige, typische Aufbau des Hirnabszesses herausbildet: Im Zentrum entsteht eine eitrige Nekrose, gesäumt von

eingewanderten Entzündungszellen und Fibroblasten. Diese sind umgeben von einer Kollagenkapsel an die sich eine Zone aus prominenter astrozytärer „Glioze“, reaktiver Mikrogliaaktivierung und ödematösem Hirngewebe anschließt (21,28).

Diese Stadien der Hirnabszessentstehung konnten auch im experimentellen Modell mit Nagetieren nachvollzogen werden (29,30). Nicolas A. Flaris und William F. Hickey veröffentlichten 1992 ein Modell des *Staphylococcus aureus*-induzierten Hirnabszesses in der Ratte, dessen histopathologische Eigenschaften denen des humanen, traumatisch bedingten Hirnabszesses sehr nahe kommen (28). Die Weiterentwicklung dieses Modells und dessen Übertragung auf die Maus brachten weitere wichtige Erkenntnisse über die infektionsimmunologischen Mechanismen während der Entstehung eines Hirnabszesses, insbesondere da hier eine Vielzahl gentechnisch modifizierter Tiere zur Verfügung steht (31-40).

1.3 Die zerebrale Immunantwort

Das Immunsystem wird in zwei Anteile untergliedert, die angeborene, unspezifische Immunabwehr und die erworbene, adaptive Immunabwehr, die sehr eng miteinander interagieren.

Vermittler der angeborenen Immunabwehr sind dabei hauptsächlich Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), welche u.a. durch Phagozytose und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine die Erreger bekämpfen und weitere Effektorzellen anlocken, aber auch Epithelien, die eine anatomische und physiologische Barriere darstellen, sowie das Komplementsystem. Eine spezifische Bindung/Erkennung krankheitsassoziierter Moleküle von z.B. Bakterien, Viren und Pilzen erfolgt u.a. über sogenannte „Toll-like Rezeptoren“ (TLR), die u.a. auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden. Körpereigene Zellen kann das angeborene Immunsystem hingegen durch das Vorhandensein des „Haupthistokompatibilitätskomplex“ (MHC) erkennen, der für die MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Rezeptoren kodiert und damit auch eine Verbindung zwischen unspezifischer und spezifischer Abwehr darstellt. Über MHC-I, das sich auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers befindet, können CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert werden während der MHC-II-Komplex der Präsentation aufbereiteter Antigene auf Zelloberflächen professioneller Antigen-präsentierender Zellen (APC) wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten dient. Diese werden mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors von T-Helferzellen (T_H -Zellen) erkannt, die in der Folge einerseits

B-Lymphozyten zur Antikörper-Produktion (humorale Immunität) stimulieren, andererseits über die Ausschüttung von Zytokinen wiederum Makrophagen aktivieren (zellvermittelte Immunität) (41).

Das ZNS galt lange als immunprivilegiertes Organ, das ohne ortsständige APC und ohne ein konventionelles lymphatisches System eine „herabregulierte“ bzw. „nicht effiziente“ Aktivierbarkeit des Immunsystems aufweist (42). Der Umstand, dass im ZNS die Produktion vieler antiinflammatorischer Mediatoren nachgewiesen werden konnte, sowie die Existenz einer Blut-Hirn-Schranke, die das Eindringen von Zellen, Antikörpern, Zytokinen und Komplementfaktoren in zentralnervöses Gewebe zum Großteil verhindert, unterstützt diese Theorie (43). Inzwischen ist aber gesichert, dass aktivierte Leukozyten wie Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können um dort direkt eine Immunantwort auf Krankheitserreger hervorzurufen. Zudem sind ZNS-spezifische Makrophagen, d.h. Mikroglia, perivaskuläre und meningeale Makrophagen, zur Phagozytose und Präsentation von ins Gehirn eindringenden Erregern befähigt, sodass dem Gehirn heute eine „spezielle“, aber durchaus sehr effektive Immunabwehr zugeschrieben wird (44-46).

1.3.1 Das T_H1/T_H2-Konzept

Bei den im vorherigen Abschnitt erwähnten T_H-Zellen handelt es sich um naive T-Lymphozyten (T_H0), die den CD4-Rezeptor tragen (CD4⁺ T-Zellen). Mosmann *et al.* beschrieben dabei 1986 erstmals zwei Subpopulationen dieser Zellen, die die Autoren abhängig von ihrem Zytokinprofil als T_H1- bzw. T_H2-Zellen bezeichneten und deren Existenz auch im Menschen nachgewiesen wurde (47-49). In den Folgejahren stellte sich heraus, dass die T-Zell-Aktivierung über die T_H1/T_H2-Dichotomie hinaus eine hohe Diversität zeigt. So wurden immer neue Typen von T-Zellen, die T_H3-Zellen, T_H17-Zellen und die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) entdeckt, deren sich zum Teil überlappende Funktionen im Rahmen der Immunantwort bis heute intensiv untersucht werden (41,50).

Nach Bindung einer CD4⁺ T-Zelle an den MHC-II-Rezeptor einer APC und unter Mitwirkung kostimulatorischer Faktoren kommt es zur Polarisierung der naiven T_H-Zellen hin zu einer der verschiedenen Effektorzellen (41). Welcher Weg der T-Zell-Aktivierung eingeschlagen wird, ist entscheidend abhängig von der Art des eindringenden Erregers sowie der Antigendosis (51). Unter dem Einfluss von Interleukin-12 (IL-12) und Gamma-Interferon (IFN-γ), die u.a. von Makrophagen, dendritischen Zellen und NK-Zellen

sezerniert werden, entwickelt sich aus einer naiven T_H0 -Zelle eine aktivierte T_H1 -Zelle, die ihrerseits v.a. die proinflammatorischen Zytokine $IFN-\gamma$, IL-2 und $TNF-\alpha$ produziert (41). Die Zytokinausschüttung durch T_H1 -Zellen führt nicht nur zu einer weiteren Stimulation von T_H0 -Zellen, Makrophagen und anderen APCs in Richtung einer T_H1 -Antwort, sondern es kommt gleichzeitig über $IFN-\gamma$ zu einer Unterdrückung der T_H2 -Polarisation und damit zu einem sich selbst verstärkenden Regulationskreis (41,52,53). Diese T_H1 -induzierte Hochregulation der zellvermittelten Immunantwort stellt den effektivsten Mechanismus für die Abwehr von intrazellulären Pathogenen, aber auch von Krebszellen dar (51,54).

Demgegenüber führt der T_H2 -Weg über eine Aktivierung von B-Lymphozyten, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten zur Produktion von Zytokinen und Antikörpern, insbesondere IgE, die insbesondere der Bekämpfung von Allergenen und Parasiten, v.a. Würmern, dienen. Unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 differenzieren T_H0 -Zellen zu T_H2 -Zellen, die daraufhin selbst IL-4, aber auch IL-5, IL-6, IL-10, IL-11 und IL-13 ausschütten (41,51,53-55). Für die Vermittlung der Effekte von IL-4 und IL-13 sind der IL-4-Rezeptor (IL-4R) sowie die Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA3 von entscheidender Bedeutung (53,56,57)

Eine überschießende Aktivierung oder Fehlregulation sowohl des T_H1 - als auch des T_H2 -Weges kann Krankheiten auslösen. So ist die T_H1 -Antwort zwar wichtig für die Wirtsabwehr, sie führt aber auch zu einer vom Pathogen induzierten Inflammation und dadurch zu Gewebeschäden. Zudem soll die T_H1 -vermittelte Zellaktivierung organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose, dem Typ 1 Diabetes mellitus, der Arthritis oder dem Morbus Crohn zugrunde liegen. Die T_H2 -Polarisation wird oft als Antwort des Immunsystems auf eine übertriebene proinflammatorische Reaktion angesehen und führt nachfolgend zur Wundheilung. Eine Überstimulation der T_H2 -Antwort wird hingegen beispielsweise mit Atopie und Asthma oder auch mit einer Granulombildung im Rahmen z.B. parasitärer Infektionen in Verbindung gebracht (51,58,59).

Kommt es schließlich zur Differenzierung der T_H -Zellen in Richtung einer der beiden Subpopulationen, wird der eingeschlagene Weg durch autokrine Sekretion der jeweiligen Zytokine sowie durch Aktivierung nachfolgender Effektorzellen stimuliert und gleichzeitig der konträre Weg inhibiert, sodass jeweils eine der T_H -Antworten dominant ist (51-53,60).

Den erst später entdeckten regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen) werden immunmodulatorische Eigenschaften nachgesagt. Im Rahmen einer Parasiteninfektion konnten suppressive Effekte von T_{reg} -Zellen sowohl auf die T_H1 - als auch auf die T_H2 -Antwort nachgewiesen werden (61). Nachfolgende Studien erkannten die Rolle des Transkriptionsfaktors FoxP3 für die T_{reg} -Differenzierung und deren Fähigkeit zur Suppression von Effektorzellen der angeborenen und erworbenen Immunantwort, die sie *in vivo* vor allem über die Sekretion von IL-10 und TGF- β vermitteln (62-64). Beide Zytokine sind dabei in der Lage die T-Zellen und Makrophagen sowie die Produktion der entzündungsfördernden Mediatoren wie TNF- α , IFN- γ , IL-12 und iNOS zu unterdrücken (65-69).

1.3.2 Die phänotypische Plastizität aktivierter Makrophagen

Makrophagen üben als hämatopoetische Zellen, deren Vorläufer im Blut zirkulierende Monozyten sind, vielseitige Aufgaben im Rahmen der Immunantwort aus. Als mobile, einwandernde oder ortsständige, organspezifische Makrophagen können sie, abhängig vom lokalen Mikromilieu, flexibel auf physiologische Stimuli reagieren und je nach Kontext und Stadium einer Erkrankung auf unterschiedliche Weise „aktiv“ werden (70,71). So sind sie mit ihren zytotoxischen, bakteriziden und phagozytierenden Eigenschaften nicht nur an der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr im Rahmen u.a. von Entzündungsreaktionen, Infektionen, Tumorerkrankungen sowie im Allgemeinen an der Gewebshomöostase z.B. im Fettgewebe beteiligt, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung. Um diese vielfältigen Aufgaben erfüllen zu können, sind spezialisierte Aktivierungsmechanismen nötig.

In Anlehnung an das T_H1/T_H2 -Modell wurde auch für Makrophagen eine Dichotomie sich gegenseitig regulierender Polarisierungsformen beschrieben. Michael Stein, Siamon Gordon und Kollegen etablierten in diesem Zusammenhang die Bezeichnungen „klassisch aktiviert“ und „alternativ aktiviert“ bzw. zur Vereinfachung auch M1- und M2-Makrophagen (72-74). T_H -Zellen und ihre sezernierten Zytokine haben im Rahmen der spezifischen Immunantwort entscheidenden Einfluss auf die unterschiedliche Differenzierung von Makrophagen (41,60,75,76). Analog zu T_H1 -Zellen besitzen M1-Makrophagen vorwiegend proinflammatorische Eigenschaften. Sie erkennen u.a. über Toll-like-Rezeptoren körperfremde Bestandteile, Bakterien (u.a. das Zellwandmolekül LPS), Viren und andere Erreger, phagozytieren diese und präsentieren sie mittels MHC-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche den T_H -Zellen. Durch

eine gegenseitige Aktivierung insbesondere über IFN- γ und TNF- α kommt es nachfolgend zur Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 sowie TNF- α durch die M1-Makrophagen. Diese steigern außerdem ihre Fähigkeit zur Antigen-Präsentation und ihre antimikrobielle Kompetenz durch Hochregulation von MHC-II, der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) sowie der Sekretion radikaler Sauerstoffmetabolite (41,76,77). Neben der Art der Stimulation ist die Expression der iNOS ein wesentliches Merkmal zur Abgrenzung von M1- zu M2-Makrophagen im Immunsystem der Maus. Durch Katalysierung des Abbaus von L-Arginin zu Citrullin und Stickstoffoxid, welches wiederum zu reaktiven Stickstoffspezies reagieren kann, trägt die iNOS zu den für die Erregerabwehr so wichtigen zytotoxischen und bakteriziden Fähigkeiten bei (78-80).

Analog zu einer überschießenden T_H1-Antwort kann auch eine zu starke Aktivierung proinflammatorischer M1-Makrophagen zu einer Gewebszerstörung führen und muss daher eng kontrolliert werden. Dieser unerwünschte Nebeneffekt kann nach erfolgreicher Elimination des Erregers reversibel sein. Liegt allerdings eine chronische oder wiederholte Entzündung vor, fällt das Ausmaß der Gewebszerstörung deutlich größer aus. Nicht selten kommt es dann zu einer unkontrollierten Zytokinausschüttung und Hyperinflammation, die u.a. zu Krankheitsbildern wie der Sepsis oder, wie schon erwähnt, zu organspezifischen Autoimmunerkrankungen führen können (36,81).

Im Gegensatz zu den M1-Makrophagen wurden zunächst alle Makrophagen, die nicht den Kriterien der klassisch durch IFN- γ aktivierten Population entsprachen, als alternativ aktivierte Makrophagen oder M2-Makrophagen bezeichnet. Da sich diese Gruppe in ihren Aktivierungsmechanismen und ihrem Zytokin-Sekretionsmuster allerdings als sehr heterogen herausstellte, stieß das M1/M2-Konzept sehr schnell an seine Grenzen. In der Folge wurden verschiedenste Bezeichnungen wie immunregulatorische, antiinflammatorische oder Wundheilungsmakrophagen sowie unterschiedliche Einteilungen geprägt, darunter die oft benutzte Unterscheidung von M2a-, M2b- und M2c-Makrophagen (71,82-84). Sogenannte alternativ aktivierte M2a-Makrophagen differenzieren sich dabei im Rahmen einer T_H2-Antwort unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 (74). Ihre bakteriziden und inflammatorischen Eigenschaften sind stark eingeschränkt, dafür zeichnen sie sich durch die Expression des Enzyms Arginase-1 aus, welches sie befähigt L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff umzuwandeln. Da Ornithin eine Vorstufe von Polyaminen und Prolin ist, wirken M2 proliferativ und tragen zur Produktion von Extrazellulärmatrix wie Kollagen bei (84).

Dieser Mechanismus ist dabei nicht nur wichtig für den Heilungsprozess, sondern stellt auch einen kompetitiven Stoffwechselweg zur iNOS der M1 dar. So kommt es nicht nur zu einer gegenseitigen Regulation durch Zytokine, wobei IFN- γ in der Lage ist Arginase-1 zu unterdrücken während T_H2-Zytokine effektiv iNOS supprimieren, sondern auch zum Wettbewerb um das Substrat L-Arginin, zu dem Arginase-1 eine höhere Affinität besitzt (85). IL-4 und IL-13 induzieren darüber hinaus die Bildung verschiedener sogenannter „Marker der alternativen Aktivierung“ von Makrophagen. Kontrovers diskutiert wird die Sekretion von IL-10 und TGF- β . Während einige Autoren diese Fähigkeit den M2a-Makrophagen zuschreiben, betonen Andere die immunsuppressiven Eigenschaften der beiden Zytokine, die sich deutlich von IL-4 und IL-13 unterscheiden und beschreiben eine separate Makrophagensubpopulation, die möglicherweise von T_{reg}-Zellen durch die Ausschüttung von IL-10 und TGF- β selbst oder durch Glucocorticoide aktiviert wird (M2c bzw. regulatorische Makrophagen) (74,83,84). Besagte regulatorische Makrophagen (MR) werden dabei durch eine besonders starke Sekretion von IL-10 und TGF- β sowie nachfolgende Suppression von T-Zellen charakterisiert (84). Das Spektrum wird erweitert durch M2b-Makrophagen, die sich womöglich unter dem Einfluss von Immunkomplexen oder IL-1R/TLR-Liganden differenzieren (82,83,86).

Als Folge einer Dysregulation können M2 eine unkontrollierte und damit für den Wirt schädliche Fibrose verursachen, allergische Reaktionen hervorrufen oder sogar Erregern ein Überleben in ihrem Zytoplasma ermöglichen (87-89)

Die Tatsache, dass die Makrophagen-Subpopulationen im Gegensatz zu T-Zellen auch nach erfolgter Differenzierung abhängig u.a. vom lokalen Zytokinmilieu in einander umwandelbar sind, vergrößert die Komplexität der Makrophagen-Phänotypen und deren funktionelle Plastizität weiterhin (51,70).

In der vorliegenden Arbeit verwende ich die Begriffe „M2-Makrophagen“ und „alternativ aktivierte Makrophagen“ gleichbedeutend für unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 stehende, polarisierte Makrophagen.

1.3.2.1 Struktur und Funktion des IL-4-Rezeptors

Der IL-4-Rezeptorkomplex ist ein Zytokinrezeptor, der von T- und B-Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Hepatozyten und Muskelzellen sowie in Endothelien, Epithelien und Hirngewebe exprimiert wird (57). Es gibt zwei Typen des

IL-4-Rezeptors, die wiederum jeweils aus zwei Untereinheiten bestehen. Der Typ I IL-4R setzt sich dabei aus der IL-4R α -Kette (CD124) und der γ c-Kette (gamma common bzw. CD132) zusammen während der Typ II IL-4R neben der IL-4R α -Kette das IL-13R α 1-Protein, eine Komponente des IL-13-Rezeptors, besitzt (Abbildung 1).

Die Wirkungen des IL-4R werden durch die Bindung von IL-4 und IL-13 vermittelt. Die IL-4R α -Kette, ein transmembranes Glykoprotein, stellt dabei die hochaffine Bindungsstelle für IL-4 dar, während IL-13 an IL-13R α 1 koppelt. Die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor führt zur Heterodimerisation der IL-4R α -Kette mit der γ c-Kette bzw. der IL-13R α -Kette und zur Aktivierung nachfolgender Signalwege. Es kommt zur Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Jak 1 und 3, die wiederum direkt oder durch Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste der zytoplasmatischen Region der IL-4R α -Untereinheit eine Aktivierung von STAT6 sowie der IRS-1/2-Signalkaskade initiieren (57). Die entscheidende Rolle von STAT6 bei der Vermittlung IL-4-abhängiger Effekte wurde in Experimenten mit STAT6-defizienten Mäusen belegt, in denen es u.a. zu einer verminderten T_H2-Antwort kam (90,91).

Sowohl das unterschiedliche Expressionsmuster der zwei Rezeptortypen als auch die Existenz verschiedener Signalwege sind Grund für die sich zum Teil überlappenden, zum Teil exklusiven pleiotropen Effekte, die durch IL-4 und IL-13 hervorgerufen werden. Gemeinsam ist IL-4 und IL-13 beispielsweise die Fähigkeit, die Expression von MHC-II-Molekülen und die Ausschüttung von Chemokinen zu induzieren sowie die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in Makrophagen zu unterdrücken.

Da IL-4 und IL-13 als klassische Vertreter der T_H2/M2-Antwort gelten, die an der Induktion alternativ aktivierter Makrophagen maßgeblich beteiligt sind, wird das Vorhandensein des IL-4-Rezeptors als Voraussetzung dafür angesehen, dass Makrophagen „alternativ aktiviert“ werden können (92).

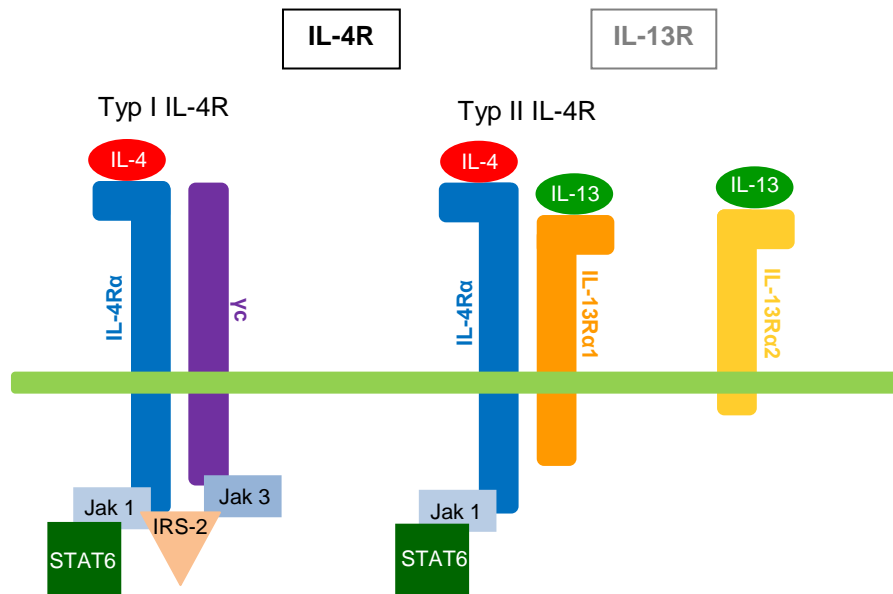


Abbildung 1: Struktur des IL-4-Rezeptors und IL-13-Rezeptors mit nachfolgendem Signalweg (abgewandelte Darstellung einer Grafik von Oh *et al.* (93)).

1.3.2.2 Alternative Aktivierung von Makrophagen

Als Marker der alternativen Aktivierung von Makrophagen wurden verschiedene Zytokine, Oberflächenmoleküle, Enzyme und Transkriptionsfaktoren beschrieben, deren Induktion in Makrophagen u.a. von IL-4 und IL-13 abhängt (74).

Michael Stein berichtete dabei 1992 erstmals von einer IL-4-induzierten Expression des Mannose-Rezeptors CD206 als charakteristisches Merkmal einer Makrophagen-Population, die sich von klassisch aktivierten Makrophagen durch die verminderte Sekretion proinflammatorischer Zytokine und die Hemmbarkeit durch IFN- γ unterschied (72). Darüber hinaus wurden neben dem schon erwähnten IL-4R α , dem Schlüsselenzym Arginase-1 sowie STAT6 eine Vielzahl von weiteren Markern entdeckt, deren Bedeutung für die alternative Aktivierung jedoch zum Teil umstritten ist. So wurden unzählige Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren beschrieben, die von M2-Makrophagen exprimiert werden und die für die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Effektorzellen des Immunsystems von Bedeutung sind. Unter ihnen CCL18, CCL17 und CCL22, die im Rahmen einer M2-Antwort induziert und gleichzeitig von T_H1-Zytokinen inhibiert werden können (82). Von IL-4 und IFN- γ wiederum antagonistisch kontrollierte Proteine sind Ym1, ein Chinitase-ähnliches Lektin, und FIZZ1 (auch Restin-like Molecule alpha, RELM α), die antientzündliche Eigenschaften besitzen sowie, vergleichbar mit dem Mannose-Rezeptor, an der rezeptorvermittelten Endozytose durch Erkennen von Kohlenhydratstrukturen beteiligt sein sollen (74,94,95).

In einem experimentellen Modell mit Parasiten wiesen Raes *et al.* 2005 dazu die Expression eines weiteren Proteins der Lektin-Familie, MGL (CD301), auf humanen und murinen Peritoneal- und Alveolarmakrophagen nach, das ebenso von der Signaltransduktion über den IL-4-Rezeptor abhängig war und mit anderen Markern der alternativen Aktivierung koexprimiert wurde (96). Weitere Untersuchungen wiesen CD301 auf Bindegewebsmakrophagen u.a. der Haut, des Gastrointestinaltraktes, der Lunge und in perivaskulären Regionen nach, wo sie der Phagozytose glykosylierter Antigene dienen, aber auch entscheidenden Einfluss auf die Bildung von Granulationsgewebe im Rahmen chronischer Entzündungen haben (97,98).

1.3.3 Die Rolle alternativ aktivierter Makrophagen in verschiedenen Krankheitsmodellen

Der Verlauf und der Ausgang vieler Krankheiten hängt entscheidend von der $T_H1/2$ -Polarisierung sowie der nachfolgenden Differenzierung von M1- oder M2-Makrophagen ab, d.h. davon wie das Immunsystem es schafft, eine adäquate Immunantwort auf ein spezielles Pathogen zu generieren. Krankheitserreger können allerdings selbst auf unterschiedliche Weise mit den Zellen der unspezifischen Immunabwehr interagieren, die Zytokinausschüttung und damit das $T_H1/2$ -Gleichgewicht beeinflussen und so ihr eigenes Überleben bestimmen (49,51,84). Die Bedeutung der alternativen Aktivierung von Makrophagen wurde insbesondere in chronischen Erkrankungen, bei Allergien, Protozoen-, Wurm- sowie Pilzinfektionen mit Hilfe von IL-4R α -Knockout-Mäusen gezeigt. Abhängig von der Art des Pathogens stellte sich dabei eine $T_H2/M2$ -Differenzierung für die Immunabwehr als nützlich oder schädlich heraus (49,84,99). Generell wird vermutet, dass eine Infektion mit intrazellulären Erregern wie Mykobakterien, Toxoplasmen, Leishmanien oder Trypanosomen eine $T_H1/M1$ -Antwort hervorruft um eine erfolgreiche Immunantwort zu generieren, während die Abwehr extrazellulärer Pathogene wie Würmer eher von einer funktionierenden $T_H2/M2$ -Antwort abhängt (100,101).

Entscheidend zu diesen Erkenntnissen beigetragen haben die Untersuchungen von Reiner und Kollegen zur Immunantwort im Rahmen der murinen Leishmaniose, einer Infektion durch intrazelluläre protozoische Parasiten. Sie konnten zeigen, dass die Elimination des Erregers und damit das Überleben des Wirtes von einer „robusten“ T_H1 -Antwort abhängig war, während eine T_H2 -Polarisierung zu einer Exazerbation der Erkrankung führte (75). Die Tatsache, dass es in IL-4-, IL-13-, IL-4R α - sowie

STAT6-defizienten Mäusen zu einer Kontrolle der Leishmanien-Infektion kam, bestätigte den Verdacht auf einen ungünstigen Einfluss der T_H2 -Antwort auf eine frühe Erregerbekämpfung (102,103). Dennoch wurde nachgewiesen, dass in den resistenten Mäusen nicht eine verminderte T_H2 -Entwicklung, sondern vielmehr die gestörte Differenzierung von alternativ aktivierten Makrophagen Grund für die Kontrolle der akuten Infektion war, da u.a. die Synthese von Polyaminen durch das M2-Enzym Arginase-1 das intrazelluläre Wachstum der Parasiten förderte (103-105). Auch das bessere Überleben des Parasiten *Trypanosoma cruzi* sowie der Bakterien *Mycobacterium tuberculosis* und *Franciscella tularensis* wurde auf die T_H2 /M2-Antwort zurückgeführt (84,106).

Eine M1-Makrophagen-vermittelte proinflammatorische Immunreaktion ist ebenfalls assoziiert mit der Kontrolle akuter Bakterieninfektionen. So sind deren bakterizide Fähigkeiten entscheidend für die Elimination u.a. von *Listeria monocytogenes*, *Mycobakterium tuberculosis*, *Streptococcus spezieis* oder Salmonellen während die Entwicklung chronischer Infektionen und das Überleben von Erregern mit der Induktion alternativ aktivierter Makrophagen in Verbindung gebracht wird. Einigen Bakterien gelingt es durch die Beeinflussung der Makrophagenpolarisation hin zu einer M2-Antwort beispielsweise dem nitrosativen Stress zu entgehen (89).

Im Gegensatz zu Infektionen durch Protozoen und Bakterien, für deren Kontrolle eine T_H1 -Antwort mit proinflammatorischen Zytokinen und zytotoxischen M1-Makrophagen essentiell ist, rufen Allergene und Helminthen (Würmer) im Wirt vornehmlich eine T_H2 -polarisierte Immunreaktion hervor (100,108). In Experimenten mit den gastrointestinalen Nematoden (Fadenwürmer) *Nippostrongylus brasiliensis* sowie *Trichinella spiralis* konnte die Abhängigkeit der erfolgreichen Wurmbekämpfung vom IL-4R α gezeigt werden (109,110). Dabei waren IL-4R α -Knockout-Mäuse allerdings schwerer von der Wurminfektion betroffen als IL-4-defiziente Mäuse, sodass die Autoren IL-13 eine entscheidende Rolle zuwiesen (111,112). Weitere Untersuchungen konnten die Existenz alternativ aktivierter Makrophagen durch den Nachweis gesteigerter Expression von CD206, Ym1, FIZZ1 und Arginase-1 sowie deren Beteiligung an einer wirksamen Immunreaktion bestätigen (113,114).

Im Rahmen einer Schistosomiasis, einer Infektion mit Trematoden (Saugwürmer), kommt es durch die Eiablage von erwachsenen Würmern zur Polarisation der frühen T_H1 -Antwort hin zu einer T_H2 -Antwort. Obwohl diese mit Hilfe von Versuchen mit IL-4- sowie IL-4R α -Knockout-Mäusen als essentiell für die Regulation der akuten,

zytotoxischen Immunreaktion, für die Bildung von Granulomen um die Wurmeier und somit für das Überleben beschrieben wurde, führte eine zu lang anhaltende T_H2-Antwort gleichzeitig zu chronischer Morbidität und Fibroseentstehung (109,115,116). Vor allem IL-13 und nachfolgend aktivierte Arginase-1-exprimierende M2-Makrophagen wurden in diesem Kontext als wesentliche Mediatoren einer unkontrollierten Organfibrose identifiziert (87,117). Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Entstehung von chronischen Atemwegserkrankungen, von Asthma und Allergien angenommen (118,119).

Auch eine bronchiale Hyperreaktivität im Rahmen einer *Cryptococcus neoformans*-induzierten Infektion wurde mit der überschießenden Sekretion von IL-13 in Verbindung gebracht (120). In weiteren Experimenten mit diesem Pilz konnte zudem gezeigt werden, dass eine unkontrollierte zerebrale Kryptokokkose mit einer IL-4-Rezeptor alpha-abhängigen Differenzierung alternativ aktivierter Makrophagen assoziiert war (121).

Die Bedeutung der IL-4R α -vermittelten Aktivierung von Makrophagen wurde neben den intensiven Studien am Infektionsmodell zudem in Autoimmunerkrankungen, so zum Beispiel im Mausmodell der Multiplen Sklerose oder des Diabetes mellitus Typ 1 sowie im Rahmen von Allergien und Asthma und in Tumorerkrankungen untersucht. Auch hier zeigten sich vielfältige, zum Teil konträre Wirkungen dieser Makrophagen auf den Krankheitsverlauf (122-124).

1.3.4 Bedeutung der T_H2/M2-Antwort für die Wundheilung und Fibrose

Eine erfolgreiche Immunreaktion als Antwort auf einen eindringenden Erreger, ein Trauma oder körpereigene, veränderte Zellen umfasst nicht nur eine reaktive Entzündungsreaktion, sondern auch die zeitnahe Beendigung derselben durch die aktive Induktion antiinflammatorischer Signale und der Reparatur des meist begleitenden Gewebeschadens. Damit der Vorgang der Wundheilung erfolgreich abläuft, braucht es eine gut gesteuerte Immunreaktion mit Einwanderung von Immunzellen, Bildung von Granulationsgewebe, Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen sowie eine geordnete Ablagerung von Extrazellulärmatrix und Induktion von Angiogenese. Im Idealfall resultiert daraus eine vollständige Ausheilung und Wiederherstellung der ursprünglichen Gewebsphysiologie. Kommt es jedoch zu einer Fehlregulation der Immunreaktion bzw. zu einer chronischen Entzündung, können je nach Kausalität der zugrunde liegenden Erkrankung

Narbengewebe, Granulome oder eine Fibrose entstehen (125). Obwohl Gewebsumbau und Reparaturprozesse initial eine wichtige Reaktion auf einen persistierenden Entzündungsreiz sind, können sie eine überschießende, schädliche Ablagerung von Extrazellulärmatrix zur Folge haben. Beispielhafte Erkrankungen hierfür sind die Lungenfibrose, die Leberzirrhose, die systemische Sklerose oder das allergische Asthma (126).

Eine entscheidende Rolle für die Herabregulation einer Immunreaktion spielen Makrophagen. Sie phagozytieren einerseits am Ort des Geschehens apoptotische Entzündungszellen und nekrotisches Gewebe, andererseits sind sie an immunregulatorischen Vorgängen und Wundheilungsprozessen beteiligt. Darüber hinaus kann eine gegenseitige Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten aber auch zu einer persistierenden Entzündungsreaktion führen.

Die verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen besitzen pro- und antifibrotische Eigenschaften (127,128). Wichtige Vermittler von Reparaturmechanismen und Fibrose sind T_H2 /M2-Zytokine, während $IFN-\gamma$ und IL-12 diesen entgegensteuern (129-131). IL-4 und IL-13 sind dabei in der Lage über den IL-4-Rezeptor auf Fibroblasten die Produktion von Kollagen und Fibronectin zu induzieren (129,132). Versuche mit STAT6-defizienten Mäusen und der Einsatz von Antikörpern gegen IL-13 unterstrichen die fibrotischen Effekte einer funktionierenden T_H2 -Antwort im Rahmen einer Schistosoma-Infektion (58,129,133). In der Lunge konnte gezeigt werden, dass IL-13 zudem über die Stimulation der Sekretion von TGF- β durch Makrophagen zur Fibrose beiträgt (134,135). IL-10 und TGF- β fördern außerdem die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die Synthese von Kollagen sowie des Wachstumsfaktors VEGF und hemmen gleichzeitig den Abbau von Extrazellulärmatrix (128,136,137). Durch gezielte Depletion von Makrophagen konnte im murinen Wundheilungsmodell eine reduzierte Produktion von VEGF und TGF- β mit einer attenuierten Reepithelialisierung, Kollagenablagerung sowie gestörter Angiogenese in Verbindung gebracht werden (138).

Die durch T_H2 -Zytokine induzierte Arginase-1 stellt das Schlüsselenzym sowohl in alternativ aktivierten Makrophagen als auch in Fibroblasten für die Produktion von Prolin dar, welches wiederum essentiell für die Kollagensynthese ist (87,92,139). M2-Makrophagen können daher selbst profibrotische Mediatoren und Kollagenvorstufen sezernieren, zudem aber auch durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen

Fibroblasten anlocken sowie diese über IL-4, IL-13 und TGF- β direkt aktivieren (130,140,141).

In der Folge wurde der Begriff „Wundheilungsmakrophagen“ für via IL-4 und IL-13 aktivierte Makrophagen etabliert, die die klassischen Marker alternativer Aktivierung exprimieren und dadurch die Kollagensynthese, den Gewebsumbau, die Neovaskularisation und letztendlich die Wundheilung maßgeblich fördern (84,92).

1.4 Bisherige Erkenntnisse am Modell des *S.aureus*-induzierten Hirnabszesses

Wie bereits erwähnt, wurden die histopathologischen Vorgänge im Rahmen des Hirnabszesses zunächst im Hund untersucht, später aber auch auf Modelle in der Ratte und Maus übertragen, die den Krankheitsverlauf des traumatisch bedingten humanen Hirnabszesses sehr genau widerspiegeln (20,28,32).

In den ersten Stunden nach der intrazerebralen Infektion durch *S. aureus* kommt es zur Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α sowie zu einer starken Invasion von neutrophilen Granulozyten. Da die Abszessgröße und Bakterienbelastung durch Depletion von Neutrophilen bzw. Neutrophilen-anlockenden Chemokinen signifikant zunahm, wurde ihnen eine entscheidende Rolle für die Erregerbekämpfung in der akuten Phase des Hirnabszesses zugesprochen. Die zusätzliche Ausschüttung multipler Chemokine wie CCL3, CCL4, CXCL1 und CCL2 durch aktivierte Astrozyten und Mikroglia sowie durch eingewanderte Leukozyten führt innerhalb der Folgetage zur Anlockung von F4/80-positiven Makrophagen und CD4- sowie CD8-positiven Lymphozyten zum Ort der Entzündung. Deren Einwandern wird zudem durch eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für bis zu 14 Tage auf Grund u.a. der Expression der Adhäsionsmoleküle PECAM und ICAM-1 auf Gefäßendothelzellen erleichtert (31,32,142). Die Frühphase der Hirnabszessentwicklung wird somit dominiert durch die reaktive Aktivierung ortsständiger Zellen, die Rekrutierung wichtiger Effektorzellen des Immunsystems aus der Peripherie sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Dieser Vorgang ist essentiell für eine erfolgreiche Bakterienelimination, führt aber auch zu einer lokal überschießenden und anhaltenden Entzündungsreaktion mit erheblichem Untergang von umgebenen Hirnparenchym (142). Unerlässlich scheint daher die konsequente Herabregulation der Entzündungsreaktion nach der Akutphase.

Weitere vergleichende Studien von Wildtyp- mit GFAP-, IL-1-, bzw. TNF- α -defizienten Mäusen zeigten größere, schlechter demarkierte Hirnabszesse, eine stärkere Infiltration

CD45-positiver Leukozyten, erhöhte Erregerzahlen sowie eine gesteigerte Morbidität und Mortalität bei den Knockout-Mäusen (33,34,36). Eine Expression der immunstimulatorischen Mediatoren TNF- α , IFN- γ , IL-12 und iNOS konnte bei Wildtyp-Mäusen in stark abnehmender Ausprägung an den Tagen 1 bis 21 p.i. beobachtet werden während eine TNF- α -Defizienz zu einer deutlich reduzierten Transkription von iNOS bei F4/80-positiven Leukozyten mit resultierender ineffektiver Bakterienelimination führte (36,38). Mit Hilfe von TLR-Knockout-Mäusen konnte außerdem eine entscheidende Rolle von Toll-like-Rezeptoren für eine erfolgreiche Immunantwort nachgewiesen werden (37,38).

Die immunregulatorische Rolle von IL-10 im Rahmen des Hirnabszesses wurde mit Hilfe von IL-10-defizienten Mäusen untersucht. Auch hier konnte eine stark erhöhte Rekrutierung von Leukozyten, Granulozyten und Makrophagen in der Akutphase sowie eine gesteigerte, wenn auch etwas verzögerte, Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden. Da IL-10 wie auch TNF- α die Apoptose von Neutrophilen, Makrophagen und T-Zellen fördern, konnte in den entsprechenden Knockout-Mäusen eine persistierende Hyperinflammation festgestellt werden (35,36). Dass es dennoch in allen Untersuchungen zu einer erhöhten Bakterienbelastung kam, unterstreicht wie wichtig die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Signalen für eine effektive Immunantwort ist.

Die definitive Kapselbildung mit Ablagerung von Kollagen, Fibronectin, die Existenz von Myofibroblasten und Einsprossung von Kapillaren konnte ca. ab Tag 7 p.i., als Reaktion auf die inflammatorische, zytotoxische T_H1-Antwort, nachgewiesen werden, um das umliegende Gehirnparenchym zu schützen (28). In einer weiteren Studie ausschließlich der Akutphase bis Tag 10 p.i. wurde zudem gezeigt, dass aus dem Knochenmark stammende fibrozytenartige Zellen mit der Kollagenkapsel assoziiert sind und dass Fibrose-vermittelnde Mediatoren wie TGF- β sowie Marker der alternativen Aktivierung an Tag 7 p.i. maximal exprimiert werden (143).

Neueste Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit Fokus auf die IL-12- bzw. IL-17-abhängige Immunantwort sowie Granulozyten konnten zudem bei infizierten Wildtyp-Mäusen eine Hochregulation von T_H2/M2-Mediatoren in der chronischen Phase mit maximaler Expression an Tag 21 p.i. sowie eine Koexpression von Markern alternativer Aktivierung mit angiogenen Faktoren wie VEGF detektieren (39).

1.5 Ziel des Forschungsprojektes

Aus den dargelegten bisherigen Erkenntnissen resultierte eine Reihe von Fragestellungen:

Lassen sich im Verlauf der murinen Hirnabszessentwicklung unterschiedlich polarisierte Makrophagenpopulationen nachweisen?

Können einzelnen Makrophagen-Phänotypen spezifische Rezeptor-, Zytokin- sowie Chemokinexpressionsmuster zugeordnet werden?

Haben Makrophagen der Spätphase ein für den Hirnabszess spezifisches Polarisationsprofil oder lassen sie sich einem M2-Subtyp zuordnen?

Welche Zellpopulationen und Mediatoren beeinflussen die Differenzierung der Makrophagen im Verlauf der Abszessentstehung und über welche Mechanismen geschieht die Signaltransduktion?

Existiert eine zeitliche und funktionelle Überlappung im Auftreten verschiedener Makrophagen-Subpopulationen?

Falls es zur Differenzierung von M2-Makrophagen kommt, spielen diese eine Rolle für die Konsolidierung und Abkapselung des Abszesses?

Sind die T_H2 -Zytokine IL-4 und IL-13 auch im Rahmen des Hirnabszesses relevant für die Polarisierung von M2-Makrophagen?

Findet in Abwesenheit des IL-4-Rezeptors eine funktionelle Aktivierung von M2-Makrophagen statt und gibt es Unterschiede in der Immunantwort sowie der Kapselbildung?

Basierend auf diesen Fragen entwickelten wir zwei zentrale Hypothesen, für deren Beantwortung wir verschiedene Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse von beteiligten Zellpopulationen, Rezeptoren, Zytokinen und Chemokinen anwandten (siehe Methodenteil):

Hypothese 1: Im Verlauf der Abszessentwicklung sind verschiedene Makrophagen-Subpopulationen aktiv, die ein definiertes Markerprofil aufweisen und spezifische Funktionen besitzen.

Hypothese 2: Die Differenzierung zu M2-Makrophagen im Spätstadium der Abszessentwicklung ist an der Bildung einer fibrösen Kapsel beteiligt, die für das Überleben der infizierten Maus entscheidend ist. Sie ist zudem abhängig von der funktionellen Signaltransduktion, vermittelt durch T_H2 -Zytokine IL-4 und IL-13 über

deren gemeinsamen Rezeptor IL-4R α . In Abwesenheit des IL-4R α entsteht keine oder nur eine alterierte Abszesskapsel.

Zusammengefasst stellt der Hirnabszess trotz Einführung der Antibiotikatherapie und verbesserter Diagnostik auch heute noch eine relevante Erkrankung des ZNS dar, insbesondere in Entwicklungsländern und aufgrund der stetig steigenden HIV-Prävalenz. Wesentliche Grundlage des überlebenswichtigen Prozesses der Abkapselung des Infektionsherdes ist eine koordiniert ablaufende Immunreaktion mit enger Interaktion aller beteiligten Zellpopulationen und Mediatoren. Daher bietet der murine experimentelle Hirnabszess ein ideales Modell zur Untersuchung des Zusammenspiels immunstimulatorischer und -regulatorischer Reaktionen im Verlauf einer Infektion mit einer akuten und einer chronischen Phase mit abschließender Wundheilung bzw. fibröser Reaktion.

In der Literatur sind zahlreiche Kasuistiken menschlicher Hirnabszesse zu finden. Noch nicht ausreichend bekannt sind jedoch die funktionelle Relevanz individueller Zellen des ZNS und des Immunsystems sowie deren Interaktionen und gegenseitige Regulation während der Entwicklung eines Hirnabszesses. Insbesondere die Rolle der Makrophagenaktivierung im Rahmen einer akuten bakteriellen Infektion des ZNS ist bisher nicht und in der Körperperipherie nur in Ansätzen erforscht. Zudem wurde in den bisher begrenzt durchgeführten Studien zum Hirnabszess das chronische Stadium, in dem es zu Reparaturmechanismen wie der lebenswichtigen Abkapselung des Entzündungsherdes kommt, kaum untersucht.

Ziel des Projektes ist die Charakterisierung der Makrophagen-Polarisation im Rahmen der Hirnabszessentstehung, deren Bedeutung für die Kapselbildung sowie der zugrunde liegenden Rolle der Signaltransduktion über den IL-4R α .

Therapeutische Relevanz könnte dabei die Modulation der einzelnen beteiligten Zellpopulationen und Mediatoren hin zu einer verbesserten Erregerelimination sowie einer verringerten Schädigung umliegenden Hirngewebes durch eine frühzeitige Abkapselung haben.

2 MATERIAL

2.1 Allgemeine Chemikalien

Produkt	Hersteller/Händler
Agarose	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Ethanol	JT Baker, Center Valley, USA
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glykogen UltraPure RNase-frei 20µg/µl	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	Actavis, München, Deutschland
LB-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mineralöl (Heavy Mineral Oil 400-5)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchloridlösung	Fresenius, Schweinfurt, Deutschland
TAE-Puffer 10x	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Xylazin	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

Tabelle 1: Allgemeine Chemikalien und ihre Hersteller

2.2 Molekulargewichtsmarker

Produkt	Hersteller/Händler
Easy Ladder I	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Hyper Ladder II	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland

Tabelle 2: Molekulargewichtsmarker für die Genotypisierung und ihre Hersteller

2.3 Zellkulturreagenzien

Produkt	Zusammensetzung
Erythrozytenlysepuffer	155mM Ammoniumchlorid 10mM Kaliumbikarbonat 0.086mM EDTA
FACS Puffer	PBS (pH 7.4) 1% FCS
Fixationspuffer	PBS (pH 7.4) 1% FCS 5% PFA

Tabelle 3: Pufferlösungen und ihre Zusammensetzung

Produkt	Hersteller/Händler
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
DPBS Pulver (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) mit /ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Percoll	GE Healthcare Live Science, Freiburg, Deutschland
RPMI 1640 Zellkulturmedium mit L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypan Blau	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Zellkulturreagenzien und ihre Hersteller

2.4 Reagenzien für die Histologie

Produkt	Hersteller/Händler
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aquatex Einschlussmittel	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aluminiumkaliumsulfatdodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin-Y	Brunschwig Chemie, Amsterdam Niederlande
Ethanol	JT Baker, Center Valley, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Paschin, Österreich
Grams Kristallviolett, Fertiglösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung	Chroma/Waldeck, Münster, Deutschland
Lugols Lösung, Fertiglösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämatoxylin Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normales Eselserum	AbD Serotec, Raleigh, USA
Normales Kaninchenserum	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Normales Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlingame, USA
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
ROTI-HISTOKITT II Einschlussmittel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tek	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Xylol	JT Baker, Center Valley, USA
VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA

Tabelle 5: Reagenzien für die Immunhistologie und ihre Hersteller

2.5 Antikörper

Antigen	Klon	Spezifität	Verdünnung	Hersteller/Händler
CD4	GK1.5	Ratte anti Maus	1:100	BD Biosciences, San Jose, USA
CD11b	M1/70	Ratte anti Maus	1:100	BD Biosciences, San Jose, USA
CD31	MEC13.3	Ratte anti Maus	1:200	BD Biosciences, San Jose, USA
CD206	MR5D3	Ratte anti Maus	1:100	AbD Serotec, Raleigh, USA
F4/80	Cl:A3-1	Ratte anti Maus	1:100	AbD Serotec, Raleigh, USA
iNOS	polyklonal	Kaninchen anti Maus	1:500	Calbiochem, Beeston, Großbritannien
Kollagen VI	polyklonal	Kaninchen anti Maus	1:500	Abcam, Cambridge, Großbritannien
VEGF-A	polyklonal	Kaninchen anti Maus	1:100	Santa Cruz, Biotechnology; USA

Tabelle 6: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie

	Spezifität	Verdünnung	Hersteller/Händler
Cy3	Esel anti Ratte	1:300	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy3	Ziege anti Kaninchen	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
DyLight 649	Ziege anti Ratte	1:300	Dianova, Hamburg, Deutschland
Meerrettichperoxidase	Ziege anti Ratte	1:100	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Meerrettichperoxidase	Ziege anti Kaninchen	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Hersteller/Händler
CD4	APC-eFluor780	RM4-5	1:150	eBioscience, San Diego, USA
CD11b	PE	M1/70	1:400	BD Biosciences, San Jose, USA
CD16/CD32	-	2.4G2	1:100	BD Biosciences, San Jose, USA
CD45	APC-Cy7	30-F11	1:200	BD Biosciences, San Jose, USA
IFN- γ	FITC	XMG1.2	1:200	eBioscience, San Diego, USA
IL-4R α	Biotin	Cl:A3-1/MIL4R-M1	1:100	BD Biosciences, San Jose, USA
CD3e	-	145-2C11		BD Biosciences, San Jose, USA
CD28	-	37.51		BD Biosciences, San Jose, USA

Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Sekundärreagenz	Konjugat	Hersteller/Händler
Streptavidin	APC	BD Biosciences, San Jose, USA

Tabelle 9: Sekundärreagenz für die Durchflusszytometrie

2.6 PCR-Sonden

TaqMan [®] Gene Expression Assay	Referenznummer
<i>Arg1</i>	Mm01190441_g1
<i>Ccl17</i>	Mm00516136_m1
<i>Chi3l3</i>	Mm00657889_mH
<i>Clec10a</i>	Mm00546124_m1
<i>Hprt</i>	Mm00446968_m1
<i>Ifng</i>	Mm00801778_m1
<i>Il4</i>	Mm00445260_m1
<i>Il4ra</i>	Mm01275139_m1
<i>Il5</i>	Mm00439646_m1
<i>Il10</i>	Mm00439616_m1
<i>Il10r</i>	Mm00434151_m1
<i>Il12a</i>	Mm00434165_m1
<i>Il13</i>	Mm00434204_m1
<i>Il13ra2</i>	Mm00515166_m1
<i>Il17a</i>	Mm00439619_m1
<i>Il17ra</i>	Mn00434222_m1
<i>Mrc1</i>	Mm00485173_g1
<i>Myd88</i>	Mm00440338_m1
<i>Nos2</i>	Mm00440485_m1
<i>Tnf</i>	Mm00443258_m1
<i>Tlr2</i>	Mm00442346_m1
<i>Stat6</i>	Mm01160477_m1
<i>Tgfb1</i>	Mm00441724_m1

Tabelle 10: TaqMan[®] Sonden und deren Referenznummer, erworben von Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

2.7 Kommerzielle Kits und Enzyme

Produkt	Hersteller/Händler
2x Red PCR Master Mix	Stratec, Birkenfeld, Deutschland
CompBeads „Compensation Particles Anti-Rat/Anti-hamster Ig, κ“ set	BD Biosciences, San Jose, USA
Cytofix / Cytoperm Kit	BD Biosciences, San Jose, USA
Cytofix / Cytoperm Fixation / Permeabilizytion Kit	BD Biosciences, San Jose, USA
DAKO ARK KIT Peroxidase K3954	DAKO, Hamburg, Deutschland
DNase free Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
GolgiStop	BD Biosciences, San Jose, USA
High-Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Liquid DAB+ Substrat Chromogen System	DAKO, Hamburg, Deutschland
peqGOLD TriFast	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	Life Technologies, Darmstadt

Tabelle 11: Kommerzielle Kits und Enzyme und ihre Hersteller

2.8 Laborausrüstung und Hilfsmittel

Produkt	Hersteller/Händler
FACS Canto II	BD Biosciences, San Jose, USA
Gelelektrophoresekammer horizontal	Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch Oldendorf
Hamilton-Spritze 700 MIKROLITER 10µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Kryostat Cryo-Star Microm HM560	Microm, Walldorf, Deutschland
Microplate Reader TECAN Infinite 200	Tecan, Grödig, Österreich
Neubauerzählkammer	Assistent, Sondheim, Deutschland
Olympus BX50	Olympus, Tokio, Japan
PCR-Thermocycler Uno-Cycler	VWR, Darmstadt, Deutschland
<i>Real-Time</i> PCR System 7900 HT	Applied Biosystems, Foster City, USA
Stereotaxierahmen	Stoelting, Wood Dale, USA
Sterile Werkbank	Heraeus Christ, Zürich, Schweiz
Transluminator G:Box Syngene	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zeiss Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland

Tabelle 12: Laborausrüstung und Hilfsmittel sowie ihre Hersteller

3 METHODEN

Alle Versuche wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes § 8 und nach Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Aktenzeichen G0325/09) durchgeführt. Bei allen Experimenten und der Erstellung der Doktorarbeit wurden die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ eingehalten.

3.1 Mäuse

Es wurden homozygote C57BL/6-Mäuse (erworben bei der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin, FEM, Charité-Universitätsmedizin Berlin), welche uns als Wildtyp (WT) dienten und IL-4R α ^{-/-}-Mäuse desselben genetischen Hintergrundes (erworben beim Max-Planck-Institut für Evolutionäre Anthropologie, Leipzig) im Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet. Die Haltung der Mäuse erfolgte während der Zucht und Experimente nach Standardrichtlinien in der FEM.

3.2 Genotypisierung der IL-4R α ^{-/-}-Mäuse

Zur Genotypisierung jeder Knockout-Maus diente ein Stück Schwanzspitze (2 mm).

Schwanzspitzenlyse:

Die Schwanzspitzen wurden in 300 μ l Schwanzspitzenlyse-Puffer (Tris HCl, pH 9 10 mM, KCl 50 mM, NP40% 0,5%, Tween 20 0,5%) unter Zugabe von 0,1 mg/ml Proteinase K über Nacht bei 55°C auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte die Inaktivierung der Proteinase K durch Erhitzen der Proben auf 95°C für 10 Minuten sowie eine abschließende Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten.

PCR:

Für die PCR wurden 2 μ l des Überstandes jeder Probe 1:10 verdünnt. 1 μ l der verdünnten DNA wurde mit den entsprechenden Primerpaaren (Tabelle 14) sowie dem 2x Red PCR Master Mix (Strattec) angesetzt.

Im PCR-Cycler erfolgte die Vervielfältigung der DNA unter folgenden Bedingungen:

Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen	Vorgang
94°C	1 min		Initiale Denaturierung
94°C	30 s	40	DNA-Denaturierung
57°C	20 s	40	Primerhybridisierung
72°C	45 s	40	Elongation
72°C	10 min		Finale Elongation

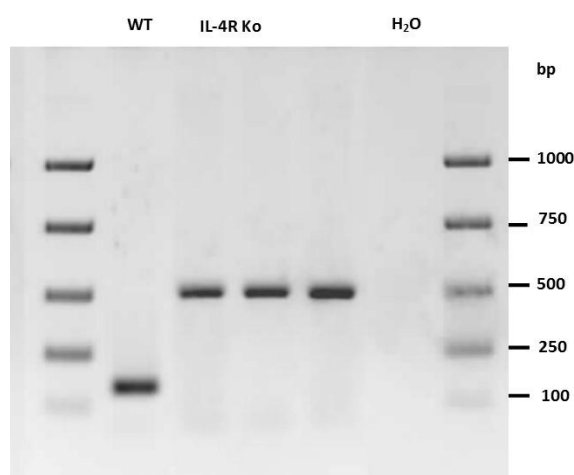
Tabelle 13: PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der IL-4R α ^{-/-}-Mäuse

Mausstamm	Primersequenz [5'-3']	Aplikon-Größe [bp]	Konzentration
IL-4R α ^{-/-} s	GGC TGC TGA CCT GGA ATA ACC	500	0,75 μ l
IL-4R α ^{-/-} as	CCT TTG AGA ACT GCG GGC T		10 μ M
WT s	GTA CAG CGC ACA TTG TTT TT	168	0,75 μ l
WT as	CTC GGC GCA CTG ACC CAT CT		10 μ M

Tabelle 14: Primersequenzen für die Genotypisierung

Gelelektrophorese:

15 μ l der PCR-Produkte wurden auf einem 1-2%igen Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen. Die Laufzeit betrug 40 Minuten bei 100 Volt. Durch Behandlung des Gels mit Ethidiumbromid (10 mg/ml) konnten die DNA-Banden unter UV-Licht nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben sichtbar gemacht werden. Die Wildtyp-Bande erschien bei 168 bp und die Knockout-Bande bei 500 bp (Abbildung 2).

Abbildung 2: Gelelektrophoresebild für die Genotypisierung der IL-4R α ^{-/-}-Mäuse.

3.3 Infektionsmodell

Zur Beantwortung der Fragestellungen wurde die von Flaris und Hickey 1992 publizierte Methode des experimentellen *Staphylococcus aureus*-induzierten Hirnabszesses (ursprünglich bei Ratten, von uns für ein Mausmodell adaptiert) benutzt (28,34).

3.3.1 Kultivierung der Bakterien

Staphylococcus aureus (Referenzstamm ATCC25923) wurde bei 37°C für 24 Stunden in LB-Medium unter wiederholter spektrometrischer Bestimmung der optischen Dichte

angezüchtet. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 - entsprechend der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien - wurde das beimpfte Medium aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Bakterienkonzentration wurde durch Ausplattieren serieller Verdünnungsreihen als Dreifachbestimmung auf LB-Agarplatten und Anzucht für 24 Stunden bei 37°C bestimmt. Die berechnete Bakterienkonzentration betrug ca. 1×10^8 /ml.

3.3.2 Herstellung der Bakterien-Agarose-Kügelchen

Zu 200 µl der gezüchteten Staphylokokken und 1,4%iger Low Melt-Agarose wurde vorgewärmtes steriles Mineralöl tropfenweise und unter ständigem Rühren hinzugefügt und langsam abgekühlt. Nach dreimaligem Zentrifugieren des Bakterien-Agarose-Gemisches in PBS bei Raumtemperatur für je 10 Minuten wurden die fertigen Agarose-Kügelchen in 500 µl PBS bei -80°C gelagert.

Die Bakterienkonzentration der Agarose-Kügelchen wurde durch erneutes Ausplattieren serieller Verdünnungsreihen als Dreifachbestimmung auf LB-Agarplatten und Anzucht für 24 Stunden bei 37°C bestimmt.

Die so hergestellten Bakterien-Agarose-Kügelchen entsprachen einer Konzentration von ca. $1-2 \times 10^4$ KBE/5 µl (KBE = Kolonie bildende Einheiten).

3.3.3 Injektion der mit *S. aureus* beladenen Agarose-Kügelchen

Für die intrazerebrale Injektion der *Staphylococcus aureus*-beladenen Agarose-Kügelchen wurden die Versuchstiere mit einer Dosis von 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht des Narkosemittels intraperitoneal anästhesiert. Als Narkosemittel diente dabei eine Mischung aus Ketamin und Xylazin in einem 10 ml-Ansatz (Tabelle 15).

Wirkstoff	Menge
Ketamin (50 mg/ml)	1.6 ml
Xylazin (Rompun 2%)	0.7 ml
NaCl 0,9%	7.7 ml

Tabelle 15: Zusammensetzung des Narkosemittels

Nach einer etwa 5-minütigen Wartezeit wurde der Schädel der Maus frontal mit einem jodhaltigen Desinfektionsmittel gereinigt um dann einen ca. 1 cm langen Hautschnitt in longitudinaler Richtung zwischen den Ohren zu setzen. Anschließend erfolgte die Öffnung des knöchernen Schädels durch manuelles Bohren eines kleinen Loches mit Hilfe eines Skalpels 1,5 mm lateral und 1 mm rostral des Bregmas. Jeder Maus wurden, nach Einspannen in einen Stereotaxierahmen durch Fixierung der Schneidezähne und

Ohren, unter Verwendung einer in einem Spritzenhalter befestigten 10 µl Hamilton®-Spritze, 5 µl der Bakterien-Agarose-Mischung in die weiße Substanz der rechten frontalen Hemisphäre in 3 mm Tiefe injiziert (Abbildung 3). Um ein druckbedingtes Heraustreten der Bakterien-Kügelchen zu verhindern, wurde die Kanüle ca. 5 Minuten in der angegebenen Position fixiert und erst dann vorsichtig entfernt. Die Wunde wurde daraufhin mit einem Stich zugenäht. Zur Schmerzstillung und Flüssigkeitssubstitution wurde jeder Maus postoperativ 1 ml einer Kochsalz-Tramal-Lösung appliziert.

Zur Kontrolle der Infektionsdosis wurde eine Probe der jeweils verwendeten *Staphylococcus aureus*-beladenen Agarose-Kügelchen nach erfolgter Injektion wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, angezchtet, ausgezählt und berechnet.



Abbildung 3: Stereotaktische Applikation der Bakterien-Agarose-Kügelchen.

3.3.4 Klinische Überwachung der Krankheitsaktivität

Für die Erhebung der klinischen Daten wurden die Versuchstiere vor der Operation sowie an den Tagen 1 und 3 nach der Operation und ab Tag 7 einmal wöchentlich gewogen und klinisch begutachtet. Zur objektiven Beurteilung der Krankheitsaktivität wurden Punktwerte entsprechend der unten aufgeführten Kriterien verwendet (Tabelle 16) (34,40).

Punktwert	Klinisches Kriterium	
0	Keine Ausfälle	Keine Symptome
1	Gangunsicherheit, aber beweglich (z.B. normales Fluchtverhalten beim Umsetzen)	normale Atmung, Gewichtsverlust <10%, kein struppiges Fell
2	Hemiparese, mäßig eingeschränkte Mobilität	normale Atmung, Gewichtsverlust <10%, leicht struppiges Fell
3	Hemiparese, mittelgradig eingeschränkte Mobilität	Gering erschwerte Atmung, Gewichtsverlust >10%, struppiges Fell
4	Hemiparese, deutlich eingeschränkte Mobilität, Atemnot, Gewichtsverlust >20 %,	Sofortiger Abbruch
5	Tod oder moribund	Sofortiger Abbruch

Tabelle 16: Klinische Krankheitsaktivität zur Evaluation des klinisch-neurologischen Befundes.

3.3.5 Sektion der Mäuse und Gehirnentnahme

Die Sektion der Versuchstiere erfolgte je nach Versuchsaufbau am 3., 14. oder 28. postoperativen Tag. Dafür wurden die Mäuse zunächst mit einer letalen Dosis des Narkosemittels narkotisiert und in Rückenlage auf einer Styroporunterlage an allen vier Extremitäten fixiert. Der Desinfektion der Bauchdecke mit 70%igem Ethanol folgte die Eröffnung des Abdomen durch einen V-förmigen Schnitt bis zu den Axillae unter Durchtrennung des Diaphragmas sowie der Rippen mit Hilfe von Schere und anatomischer Pinzette. Der Brustkorb wurde nach oben geklappt und das noch pulsierende Herz freigelegt. Unter Verwendung einer 21 G Butterflykanüle, die in den apikalen Pol des linken Ventrikels gestochen wurde und nach Inzision des rechten Vorhofes, wurde die Maus anschließend mit isotoner Kochsalzlösung so lange perfundiert, bis es zu einer ausreichenden Entfärbung von Leber und Nieren kam und kein Blut mehr aus dem rechten Vorhof austrat. Um das Gehirn entnehmen zu können, wurde die Maus von der Unterlage gelöst und der Kopf kaudal des knöchernen Schädels abgesetzt. Die Haut wurde nach rostral gestülpt und der Schädelknochen vom Foramen magnum aus vorsichtig mit Hilfe einer anatomischen Pinzette abpräpariert. Nach Durchtrennung der Hirnnerven konnte das komplette Gehirn entnommen werden.

3.3.5.1 Konservierung für histologische Untersuchungen

Für die histopathologischen Untersuchungen wurden die frisch entnommenen Gehirne in Tissue Tek auf einem Korkplättchen eingebettet, in Isopentan auf Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

3.3.5.2 Weiterverarbeitung für die Durchflusszytometrie

Die Gehirne wurden nach der Entnahme einzeln durch ein steriles 70 µm Zellsieb gepresst und in HBSS/3% FCS suspendiert.

3.3.6 Ausplattieren der Zellsuspension für die Bestimmung der KBE

Zur Untersuchung der intrazerebralen Bakterienkinetik im Verlauf der Hirnabszessentwicklung wurden die Zellsuspensionen der infizierten Mausgehirne beider Genotypen einzeln in einer Verdünnungsreihe auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Pro Verdünnung wurden jeweils 50 µl ausplattiert, bei 37°C im Brutschrank inkubiert, nach 24 Stunden die KBE gezählt und auf die Gesamtmenge der Zellsuspension hochgerechnet.

3.4 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können einzelne Zellpopulationen in einer Probe gemessen und anschließend separiert werden. Dies geschieht zum einen durch die Messung der Größe und Granularität jeder Zelle, zum anderen durch die spezifische Bindung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper an charakteristische Oberflächen- bzw. intrazelluläre Antigene einer Zellart. Beim Passieren eines Laserstrahls kommt es dabei im Durchflusszytometer zur Anregung der Fluorochrome und zur nachfolgenden Emission von Fluoreszenzlicht einer spezifischen Wellenlänge. Diese wird vom Gerät gemessen und lässt Rückschlüsse auf die Art und Anzahl der in der Probe vorhandenen Zellen zu.

So können beispielsweise die Makrophagen/Mikroglia- und T-Zell-Populationen in einer Probe quantitativ bestimmt und wiederum in einzelne Subpopulationen sortiert werden.

Die folgende Tabelle zeigt die untersuchten Zellen mit ihren charakteristischen Rezeptoren sowie deren für unsere Fragestellung interessantes Zytokin- bzw. Transkriptionsfaktor-Expressionsmuster.

Zellpopulation	Expression der Oberflächenrezeptoren	intrazelluläres Expressionsmuster
T _H 1 Zellen	CD4	IFN-γ
aktivierte Mikroglia/Makrophagen	CD11b ⁺ CD45 ^{high} , IL-4Rα	-

Tabelle 17: Expressionsmuster der im Durchflusszytometer analysierten Antigene.

Alle Arbeitsschritte im Rahmen der Zellpräparation und -färbung für die Durchflusszytometrie wurden auf Eis durchgeführt.

3.4.1 Zellseparation mit Hilfe eines Percoll-Gradienten

Bevor die für den Versuchsaufbau relevanten Zellen durch Antikörper markiert werden konnten, musste zunächst die Leukozytenpopulation mittels eines Dichte-Gradienten von den übrigen zerebralen Zellen getrennt werden. Dies erfolgte nach einem von Ford *et al.* 1995 beschriebenen Protokoll (144). Durch Zentrifugation sammeln sich dabei die Leukozyten entsprechend ihrer spezifischen Dichte zwischen zwei Dichten des Gradientenmediums an. Mehrmaliges Waschen führt zudem zu einer erhöhten Reinheit der gewünschten Zellpopulation.

Die Percolllösung wurde unter Zugabe von 1.5 M NaCl im Verhältnis 1:10 angesetzt und die einzelnen Dichten durch anschließendes verdünnen mit HBSS/3% FCS hergestellt. Die, wie in Abschnitt 3.3.5.2 beschrieben, aufbereitete Zellsuspension wurde für 8 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 2,8 ml der Dichte 1.098 resuspendiert, anschließend mit 1,4 ml der Dichte 1.122 unterschichtet und dann mit jeweils 2,5 ml der Dichten 1.072, 1.05 und 1.03 überschichtet. Den Abschluss bildeten 2,5 ml HBSS/3% FCS (Abbildung 4). Der entstandene Percoll-Gradient wurde für 30 Minuten bei 2700 rpm und 4°C mit geringster Beschleunigung sowie Auslauf ohne Bremse zentrifugiert. Die sich zwischen den einzelnen Percoll-dichten gebildeten Interphasen wurden separat entnommen; die obersten Schichten 1 und 2, bestehend aus Myelin und Zelldebris wurden dabei verworfen, Schicht 3, 4 und 5 (zerebrale Leukozyten) getrennt abgenommen, in HBSS/3% FCS gewaschen und wieder vereint. Zur Berechnung der Gesamtleukozytenzahl jeder Gehirnprobe wurden 10 µl der gereinigten Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop die vitalen Zellen in vier Quadranten gezählt. Es folgte die Färbung und durchflusszytometrische Messung der Zellen.

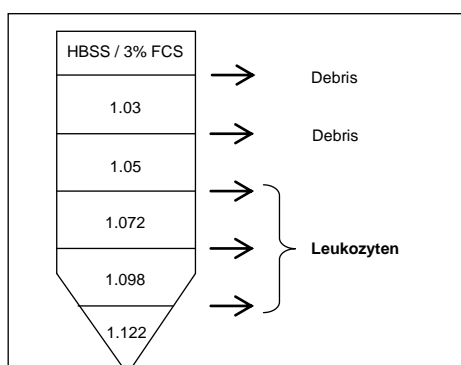


Abbildung 4: Aufbau des Percoll-Gradienten.

3.4.2 Zellfärbungen

Zusätzlich zu der Färbung von Oberflächen-Antigenen und von intrazellulären Antigenen der Leukozyten infizierter Mäuse wurden Isotyp-Kontrollen und ungefärbte Kontrollen mitgeführt.

3.4.2.1 Kultivierung und Stimulation der T-Zellen

Die Zellen wurden zunächst mit 1 ml RPMI (Hinzugabe von Penicillin/Streptomycin 1:100, 5% FCS) in Kultur genommen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Stimulation der T-Zellen mit jeweils 1 µg/ml anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper und anschließend die Akkumulation der Zytokine mittels Zugabe von Monensin-haltigem GolgiStop. Durch die Blockierung des intrazellulären Proteintransports sammeln sich die Zytokine und Transkriptionsfaktoren dabei im Golgi-Apparat an, wodurch sich die Detektierbarkeit der Zellen im Durchflusszytometer erhöht. Nach Inkubation für 4 bis 6 Stunden bei 37°C wurden die Zellen nochmals zentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen und die Zellen wieder in HBSS/3% FCS aufgenommen.

3.4.2.2 Färbung von Oberflächen-Antigenen

Zu Beginn der Färbeprozedur wurden die Leukozyten für 8 Minuten bei 4°C und 1200 rpm in PBS und 1% FCS gewaschen. Der selbe Waschvorgang erfolgte nach jedem im Weiteren beschriebenen Inkubationsschritt mit der Ausnahme, dass für die Intrazellulärfärbungen als Waschpuffer Perm/Wash-Puffer verwendet wurde anstelle von PBS/1% FCS. Die Inkubation der Zellen fand ab Zugabe Fluorochrom-markierter Antikörper unter Lichtausschluss statt.

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen durch Fc-Rezeptoren wurden die Zellen zuerst mit anti-Fc CD16/CD32 Antikörper (20 µg/ml) für 10 Minuten und anschließend mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (siehe Tabelle 8 in Material 2.5) für 20 Minuten inkubiert. Biotin-gekoppelte Antikörper wurden abschließend mit Streptavidin-APC für 15 Minuten inkubiert. Es folgte das Fixieren der Zellen durch Zugabe von PFA 5%/PBS/1% FCS und Inkubation für 15 Minuten.

Die gefärbten Zellen wurden zuletzt in PBS/1% FCS/Azid 1:500 aufgenommen und bis zur Messung im Durchflusszytometer unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert.

3.4.2.3 Färbung intrazellulärer Antigene

Zur Fixierung der zuvor geknüpften Antikörper-Oberflächenantigen-Bindungen und zur gleichzeitigen Permeabilisierung wurden die Zellen für 20 Minuten mit Cytofix/Cytoperm inkubiert. Durch den anschließend verwendeten Perm/Wash-Puffer als Verdünnungsmittel für die Antikörper sowie als Waschpuffer für die Zellen wurde die reversible saponinvermittelte Zellpermeabilisation während der gesamten Färbung fortgesetzt. Die weitere Färbung erfolgte analog der in Abschnitt 3.4.2.2 für die Oberflächenantigene beschriebenen Prozedur.

3.4.3 Kompensationsbeads

BDTM CompBeads dienen der Kompensation der gemessenen Fluoreszenzen im Durchflusszytometer. Es handelt sich dabei um Polystyrol-Mikropartikel, die einerseits als positive Kompensationsbeads an die Kappa-leichte Kette der Fluorochromgekoppelten Antikörper binden, andererseits als negative Kompensationsbeads mit FCS gekoppelt keinerlei Bindungsaktivität aufweisen. Dadurch kann die spektrale Überlappung der Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe (positive Beads), sowie die unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz (negative Beads) eingeschätzt werden. Die Färbeprozedur erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers (BD Biosciences).

3.4.4 Messung mit dem Durchflusszytometer

Die Analyse erfolgte in einem FACS Canto II Durchflusszytometer mit Hilfe der Software CELLQuestPro (BD Biosciences) sowie anschließender Darstellung in FlowJo (Tristar, Ashland, USA). Für die Geräteeinstellung wurden einfach gefärbte Kompensationsbeads mit allen gebrauchten Fluorochromen verwendet. In einer Dotplot-Darstellung wurden die erfassten Zellen zunächst nach ihrer Größe (Forward Scatter) und Granularität (Sideward Scatter) aufgetragen und so die Leukozyten (Abbildung 5 A) von restlichen Bestandteilen wie Zelltrümmern getrennt. Anschließend wurden die Leukozyten entsprechend ihres Antigen-Expressionsmusters, wie in Tabelle 17 dargestellt, quantifiziert. Die mitgeführten ungefärbten Kontrollen und Isotyp-Kontrollen dienten dabei der Abgrenzung von unspezifischer und spezifischer Fluoreszenzfärbung (Abbildung 5 B-D).

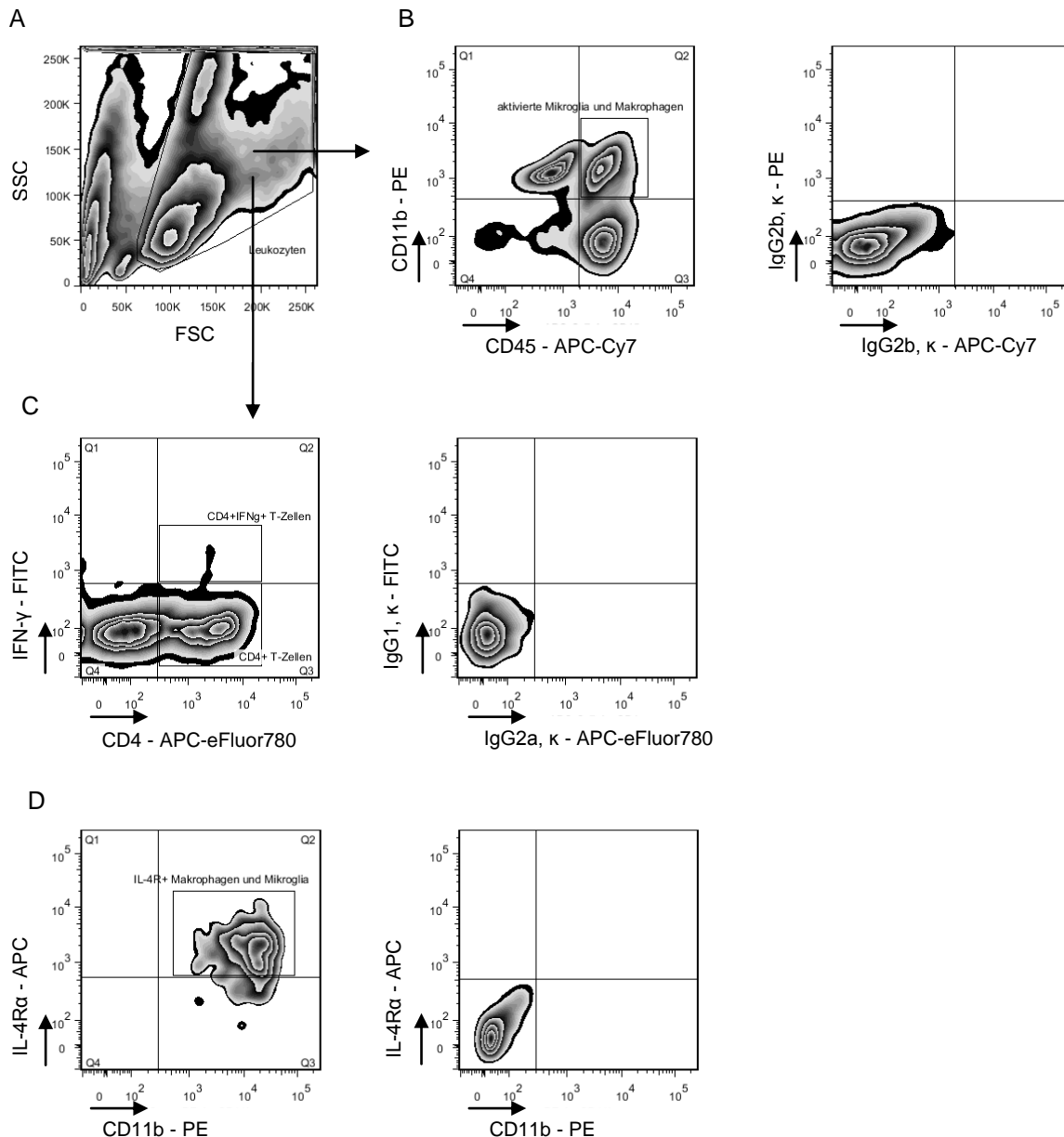


Abbildung 5: „Gating Strategie“ für die Durchflusszytometrie nach Isolation der Zellen mittels Percoll-Gradient.

Repräsentative „zebra plot“-Darstellung einer WT-Maus an Tag 14 und die dazugehörigen Isotypen. Abgebildet sind die Leukozytenpopulation (A), die aktivierte Mikroglia/Makrophagen-Population mit Isotypen (B), die CD4⁺ T-Zellen mit Isotypen (C) sowie die IL-4Rα-positive Makrophagen- und Mikroglia-Population mit entsprechender ungefärbter Kontrolle (D).

3.5 Histopathologie

3.5.1 Herstellung der Gefrierschnitte, allgemeine Vor- und Nachbehandlung

Die, wie in Kapitel 3.3.5.1 beschrieben, jeweils auf einem Korkplättchen in Tissue Tek eingebetteten Gehirne wurden im Kryostat in 7 µm dünne horizontale Scheiben geschnitten und diese auf einem Objektträger platziert. Nach einer Trocknungszeit von 24 Stunden bei 4°C wurden die Schnitte für 10 Minuten in Aceton fixiert, in dünne Alufolie eingewickelt und bei -80°C gelagert.

Vor jeder histologischen Färbung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für ca. 20 Minuten an Raumtemperatur adaptiert und dann 10 Minuten in Aceton und 7 Minuten in Chloroform fixiert. Im Anschluss an die H&E-, Gram- und immunhistochemischen Färbungen erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (20 Sekunden in 70%, je 1 Minute in 80%, 96% und 100% Alkohol), das Klären mittels Xylol sowie das Eindeckeln mit Hilfe eines Einschlussmediums (ROTI-HISTOKITT II). Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden direkt wässrig eingedeckt (VECTASHIELD Mounting Medium mit DAPI).

3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde zur Übersicht angefertigt, bevor genauere immunhistochemische Färbungen durchgeführt wurden. Sie diente vor allem der Beurteilung von Lage und Größe des Abszesses. Hämatoxylin färbt dabei Zellkerne blau, während Eosin Zytoplasma, Kollagen und andere Bestandteile der Extrazellulärmatrix rosa färbt.

Die Färbung des Gewebeschnitts erfolgte anfangs für 3 Minuten in gereiftem Hämalaun, gefolgt vom Spülen des Objektträgers in Leitungswasser für 2 bis 5 Minuten.

Im zweiten Schritt wurde das Präparat für 30 Sekunden in Eosin gefärbt, erneut gefolgt vom Spülen des Objektträgers in Leitungswasser für 15 Sekunden. Abschließend erfolgte die Entwässerung in Alkohol und das Eindeckeln wie in 3.5.1 beschrieben.

3.5.3 Gram-Färbung

Die Gram-Färbung dient der Unterscheidung von Bakterien mit einer dicken, mehrschichtigen Mureinhülle (grampositive Bakterien) von Bakterien mit einer nur einschichtigen Mureinhülle (gramnegative Bakterien). Während der Färbung bildet das Kristallviolett (Gentianaviolett) mit der jodhaltigen Lugols Lösung einen dunkelvioletten Farbstoff-Iod-Komplex, der durch Alkohol aus einer mehrschichtigen Mureinhülle nicht ausgewaschen werden kann. Mit Hilfe der Gram-Färbung können außerdem Aussagen über die Morphologie der Bakterien getroffen werden. Wir nutzten die Färbung zur Detektion von *S. aureus* in den Gehirnschnitten infizierter Mäuse.

Durch das 3-minütige Färben mit Grams Kristallviolett kam es zur Anfärbung der Bakterien. Nach einem Spülschritt in Leitungswasser erfolgte die Behandlung des Gewebes für 3 Minuten mit Lugols Lösung, wodurch sich ein wasserunlöslicher Farbkomplex bildete. Nach erneutem Spülen in Leitungswasser wurde das Präparat mit

Aceton entfärbt, wobei sich nur gramnegative Bakterien entfärben lassen. Es folgte das Spülen mit Aqua dest. und die Kernfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung für 2 Minuten sowie nochmaliges Spülen mit Leitungswasser. Abschließend erfolgte die Entwässerung in Alkohol und das Eindeckeln wie in 3.5.1 beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit stellten sich die Staphylokokken mittels der Gram-Färbung als grampositive, rundliche Bakterien dunkelviolett dar.

3.5.4 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Färbung dient der selektiven Darstellung von u.a. Zellen, Zellbestandteilen oder Geweben sowie deren räumlicher Verteilung innerhalb des Gewebes. Dabei wird ein Antigen mittels eines Enzym- oder Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers detektiert. Im Falle eines Enzym-markierten Antikörpers wird die Farbentstehung durch eine Enzym-Substrat-Reaktion ausgelöst. Die Mehrfach-Immunfluoreszenztechnik ermöglicht es mittels Fluorochrom-markierter Antikörper die Kolo-kalisation mehrerer Antigen-Strukturen direkt nachzuweisen.

Nach 30-minütigem Blockieren mit PBS/5% BSA und 10% speziesangepasstem Normalserum zum Verhindern unspezifischer Bindungen, wurde der Gewebeschnitt für 60 Minuten mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 6 in Material 2.5) und anschließend für 40 Minuten mit dem speziespezifischen sekundären Antikörper (Meerrettichperoxidase-gekoppelt) (siehe Tabelle 7 in Material 2.5) inkubiert. Es folgte die Entwicklung durch die Enzym-Substrat-Reaktion mittels DAB wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben unter Lichtausschluss für 1 bis 10 Minuten. Der Anfärbung der Zellkerne diente die zusätzliche Behandlung mit gereiftem Hämalaun für 5 Sekunden und anschließendes Spülen mit warmem Leitungswasser. Abschließend erfolgte die Entwässerung in Alkohol und das Eindeckeln wie in 3.5.1 beschrieben.

Alle Färbungen erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die Immunfluoreszenzfärbungen fanden ab der Zugabe eines Fluorochrom-markierten Antikörpers unter Lichtausschluss statt. Nach jeder Inkubation erfolgte ein Waschschrift für 10 Minuten in PBS, sowie nach der Entwicklung ein Abstoppen der DAB-Reaktion in destilliertem Wasser.

Negativ-Kontrollen, ohne Applikation des Erstantikörpers, bestätigten die Spezifität der Reaktion. Die entstandenen Färbungen wurden mithilfe eines Olympus BX50 Mikroskopes und der cell^D Software (Olympus, Tokio, Japan) analysiert und fotografiert.

3.5.4.1 Immunfluoreszenz-Färbungen

Zunächst erfolgte ein 30-minütiges Blockieren der analog der für die Immunhistochemie vorbehandelten Gehirnschnitte mit PBS/5% BSA und 10% spezieangepasstem Normalserum. Die primären Antikörper (siehe Tabelle 6 in Material 2.5) wurden anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert, die Schnitte gewaschen und jeweils mit einem sekundären Antikörper (siehe Tabelle 7 in Material 2.5), welcher mit einem der Fluorochrome DyLight 649 (in allen Abbildungen rot dargestellt) oder Cy3 (in allen Abbildungen grün dargestellt) gekoppelt war, für 1 Stunde inkubiert. Für Doppelimmunfluoreszenzen wurde die oben beschriebene Prozedur wiederholt, bevor die Schnitte wässrig mit VECTASHIELD Mounting Medium, welches DAPI zur Anfärbung der Zellkerne enthielt, eingedeckelt wurden. Die Schnitte wurden anschließend versiegelt und mit Hilfe des Zeiss Observer Z1 Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und der Software Axio Vision 4 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert und fotografiert. Negativ-Kontrollen, ohne Applikation der Erstantikörper, bestätigten erneut die Spezifität der Reaktion.

3.6 Quantitative *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung und gleichzeitigen Quantifizierung von cDNA, basierend auf dem Prinzip der konventionellen PCR. Die Quantifizierung erfolgt dabei durch Messung des Fluoreszenz-Signals der Reporter-Sonde in der exponentiellen Amplifikationsphase jedes PCR-Zyklus.

3.6.1 RNA-Isolation

Zur Analyse der Genexpression der verschiedenen Rezeptoren, Zytokine, Chemokine und Transkriptionsfaktoren erfolgte zunächst die Extraktion der RNA aus dem Hirngewebe an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Pro Gehirn wurden 30 bis 60 7 µm dicke Schnitte verwendet, die im Bereich der für die Histologie abgenommenen Schnitte lagen, also auf Höhe des jeweiligen Hirnabszesses. Die RNA-Extraktion erfolgte nach der Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode wie in der Anleitung der Reagenz TriFast beschrieben. Dabei wurde das Hirngewebe zunächst in 1000 µl Trizol homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das in der Reagenz enthaltene Guanidinisothiocyanat lysiert die Zellen und inaktiviert gleichzeitig RNasen während das Phenol DNA und Proteine löst. Durch die anschließende Inkubation mit 200 µl Chloroform sowie die Zentrifugation (13000 rpm,

4°C, 10 Minuten) kommt es zur Phasentrennung wobei sich die RNA in der oberen wässrigen Phase anreichert. Nach Überführen des wässrigen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 0,5 µl RNase-freiem Glykogen als Fällungsmittel sowie von 500 µl Isopropanol. Das nach 10-minütiger Inkubation und Zentrifugation entstandene gelartige RNA-Pellet wurde vom Überstand befreit, mit 75%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nochmals vom Überstand getrennt. Es folgte die Trocknung des Pellets für ca. 20 Minuten und als letzter Schritt die Resuspension der RNA in 60 µl Nuklease-freiem Wasser durch Inkubation bei 55°C bis 60°C für 10 Minuten.

Der Reinheitsgrad ($A_{260/280}$ -Quotienten von 1.6-2.1) sowie die Konzentration der RNA wurden anschließend photometrisch mit Hilfe des Infinite M200 Microplate Reader und der korrespondierenden Software i-control (Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt.

3.6.2 cDNA-Synthese

Bevor die PCR durchgeführt werden konnte, musste die isolierte RNA zunächst mittels Reverser Transkription zur komplementären DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Die Vorbehandlung der RNA erfolgte mit Hilfe des DNase free Kit zur Entfernung noch vorhandener DNA und DNasen aus der Probe. Hierzu wurde ein DNase Verdauungsreagenz (DNase-Puffer und rDNase) hinzugefügt und mit den Proben für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe eines DNase Inaktivierungsreagenz mit dem die Proben für 2 Minuten bei Raumtemperatur behandelt und abschließend bei 13000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert wurden.

Die anschließende Reverse Transkription der RNA wurde nach der Anleitung des High-Capacity cDNA Archive Kit durchgeführt. Für die Umschreibung von 2 µg RNA-Probe wurden zu 50 µl der vorbehandelten RNA 50 µl eines doppelt konzentrierten Mastermixes bestehend aus je 10 µl 10x RT Puffer und 10x RT Random Primer, 4 µl 25x dNTP Mix, 5 µl Reverse Transkriptase sowie 21 µl Nuklease-freiem Wasser hinzugegeben.

Im PCR-Cycler erfolgte die cDNA-Synthese unter folgenden Bedingungen:

Temperatur	Zeit	Vorgang
25°C	10 min	Hybridisierung der Primer
37°C	2 h	Reverse Transkription
85°C	5 min	Inaktivierung des Enzyms
4°C		Bereithaltung zur Analyse

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen für die cDNA-Synthese.

3.6.3 qPCR

Die anschließende qPCR wurde mit 20 ng cDNA unter Zugabe des TaqMan FastStart Universal PCR Master Mix, eines TaqMan Gene Expression Assay (siehe Tabelle 10 in Material 2.6) sowie Nuklease-freiem Wasser in einem 7900HT Fast Real-Time PCR System unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen	Vorgang
95°C	20 s		Initiale Denaturierung
95°C	1 s	45	Denaturierung
60°C	20 s	45	Primerhybridisierung und Elongation

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen für die qPCR.

3.6.4 Analysemethode und Auswertung

Für alle eingesetzten TaqMan Sonden wurde mit jeder DNA-Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Für die Berechnung des Expressionsmusters der jeweiligen Zielantigene benutzen wir die relative Quantifizierung mittels der komparativen $\Delta\Delta C_T$ -Methode (145). Der C_T -Wert (Schwellenwert-Zyklus; englisch: cycle of threshold) entspricht dabei der Zyklenanzahl, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals die in den ersten Zyklen (ca. 3 bis 15) gemessene Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Geht man von einer hundertprozentig effizienten PCR aus, so verdoppelt sich mit jedem Zyklus das DNA-Produkt und damit auch das Fluoreszenzsignal. Je mehr DNA also zu Beginn der Reaktion vorhanden war, desto geringer ist die Anzahl an Zyklen, die erforderlich ist, um den Schwellenwert-Zyklus zu erreichen, d.h. desto niedriger ist der C_T -Wert. Die relative Quantifizierung beinhaltet den Bezug der C_T -Werte der Zielantigene von infizierten Tieren zu denen einer endogenen Kontrolle, einem sogenannten „Housekeeping-Gen“, das ubiquitär und immer gleichmäßig exprimiert wird (ΔC_T ; siehe Abbildung 6, Schritt 1), sowie zu der Expression der Zielantigene in nicht infizierten Kontrolltieren (Kalibrator) ($\Delta\Delta C_T$; siehe Abbildung 6, Schritt 2). Der relative Expressionsunterschied (RQ-Wert) der Probe-DNA zwischen infizierten Tieren und dem Kalibrator, normalisiert zu einem Housekeeping-Gen, ergibt sich anschließend aus der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Diese Berechnungen wurden mit Hilfe der Software SDS 2.4. sowie Relative Quantification (RQ) Manager 1.2.1 durchgeführt. In unserem Versuch verwendeten wir als Housekeeping-Gen das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (*Hprt*).

Für die Auswertung stellten wir die berechneten RQ-Werte anschließend logarithmisch in einem Diagramm dar, sodass die relative Expression eines Zielantigens in der Infektionsgruppe im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren abgelesen werden kann.

<p>Schritt 1: Bezug zur endogenen Kontrolle $Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}} = \Delta Ct_{\text{Probe}}$</p> <p>Schritt 2: Normalisierung bezüglich der Kontrollprobe $\Delta Ct_{\text{Probe}} - Ct_{\text{naive Kontrolle}} = \Delta\Delta Ct$</p> <p>Schritt 3: Relative Genexpression (RQ) $2^{-\Delta\Delta Ct}$</p>

Abbildung 6: Die „delta-delta-Ct“ ($\Delta\Delta Ct$) Methode.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Als statistisch signifikant galten p-Werte $<0,05$. Die dargestellten Diagramme zeigen den jeweiligen Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von einzelnen Mausgehirnen.

Die statistische Analyse des Gewichtsverlaufes sowie der klinischen Krankheitsaktivität erfolgte mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test. Der Mantel-Cox Test wurde für die statistische Auswertung der prozentualen Überlebensrate genutzt. Die statistische Berechnung der intrazerebralen Bakterienzahl (KBE) und der Leukozytenzahlen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Die statistische Signifikanz der durchflusszytometrischen Messungen sowie der relativen Genexpression, gemessen mittels qPCR, wurde ebenfalls mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Die histologischen Abbildungen wurden in 40-, 200- bzw. 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Die eingefügten Maßstabsbalken repräsentieren 50 μm bzw. 100 μm .

3.8 Versuchsaufbau

Es wurden Wildtyp- und Knockout-Mäuse unter denselben Bedingungen intrazerebral mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Um eine Reaktion aufgrund der Operation an sich auszuschließen, wurden ergänzend zu nicht infizierten Mäusen (naiv) auch sogenannte Mock-Kontrollen von WT-Mäusen in den Versuch eingeschlossen, die der selben operativen Prozedur unterzogen wurden, ohne jedoch Bakterien zu injizieren. Die klinische Überwachung der operierten Tiere erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 14, 21 und 28 nach der Infektion (p.i.) anhand der Krankheitsaktivität (siehe 3.3.4) sowie des Gewichtsverlaufes.

Um die Immunantwort, insbesondere die T-Zell- und Mikroglia/Makrophagenaktivierung, in den verschiedenen Phasen der frühen Hirnabszessentstehung und der Kapselbildung

im späteren Verlauf charakterisieren zu können, wählten wir die Untersuchungszeitpunkte Tag 3 p.i., repräsentativ für das akute Stadium, sowie Tag 14 p.i. und Tag 28 p.i. zur Analyse des Überganges der Entzündungsreaktion hin zur chronischen Phase und der damit einhergehenden Abkapselung des Hirnabszesses (Abbildung 7).

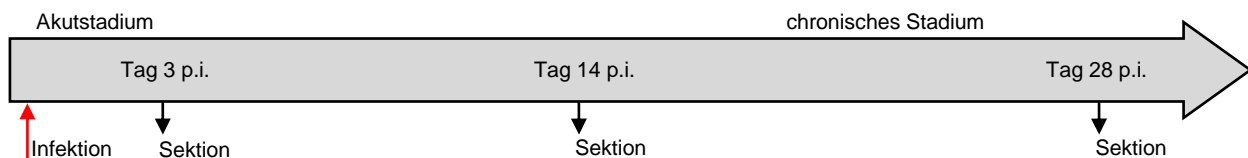


Abbildung 7: Untersuchungszeitpunkte nach intrazerebraler Injektion von *S. aureus*.

In unabhängigen Experimenten erfolgten jeweils an einem der genannten Zeitpunkte die Untersuchung der WT-Mäuse und die weitere Aufarbeitung des Hirngewebes in zwei Gruppen. Die Quantifizierung der intrazerebralen Bakterienanzahl und deren Kinetik wurde durch das partielle Ausplattieren von Zellsuspensionen der einzelnen Mausgehirne auf Agarplatten bestimmt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten außerdem für jede Zellsuspension quantitative Analysen der zerebralen Leukozyten durchgeführt werden. Die andere Gruppe wurde für immunhistochemische Untersuchungen verwendet, die der Bestimmung von topographischen Beziehungen zwischen bakteriellen Erregern und infiltrierenden Entzündungszellen, sowie deren Immunphänotypisierung diente. Gehirngewebshomogenate dieser Gruppe wurden zudem hinsichtlich ihrer Zytokin- und Chemokinexpression auf mRNA-Ebene im Verlauf der Abszessentwicklung mittels qPCR untersucht.

Da die Mock-Kontrolltiere praktisch asymptomatisch blieben und schon an Tag 3 p.i. im Mittel ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht hatten, verzichteten wir aus ethischen Gründen auf eine weitere Analyse über diesen Versuchszeitpunkt hinaus.

Zur Untersuchung des Einflusses des IL-4R α auf die Makrophagenpolarisierung führten wir zudem Experimente mit IL-4R α Knockout-Mäusen durch. In unabhängigen Experimenten wurden dazu IL-4R α Knockout-Mäuse parallel zu Wildtyp-Mäusen infiziert und nach 28 Tagen deren Gehirne immunhistochemisch und mittels qPCR, ausschließlich an diesem späten Zeitpunkt, nach Abschluss der Kapselbildung, untersucht.

Bei der Auswertung aller Experimente wurden nur Tiere einbezogen, die im Laufe der Entzündungsreaktion einen Hirnabszess entwickelt hatten. In diesen Fällen, nach der intrazerebralen Infektion mit *Staphylococcus aureus*, konnte eine erfolgreiche Abtötung

der Bakterien mit anschließender vollständiger Ausheilung im Sinne einer *Restitutio ad integrum* bzw. Entstehung einer Defektnarbe nicht erreicht werden. Das Immunsystem reagierte mit einer Abkapselung der Erreger, um eine weitere Ausbreitung und damit Schädigung des umliegenden Gehirnparenchyms zu verhindern.

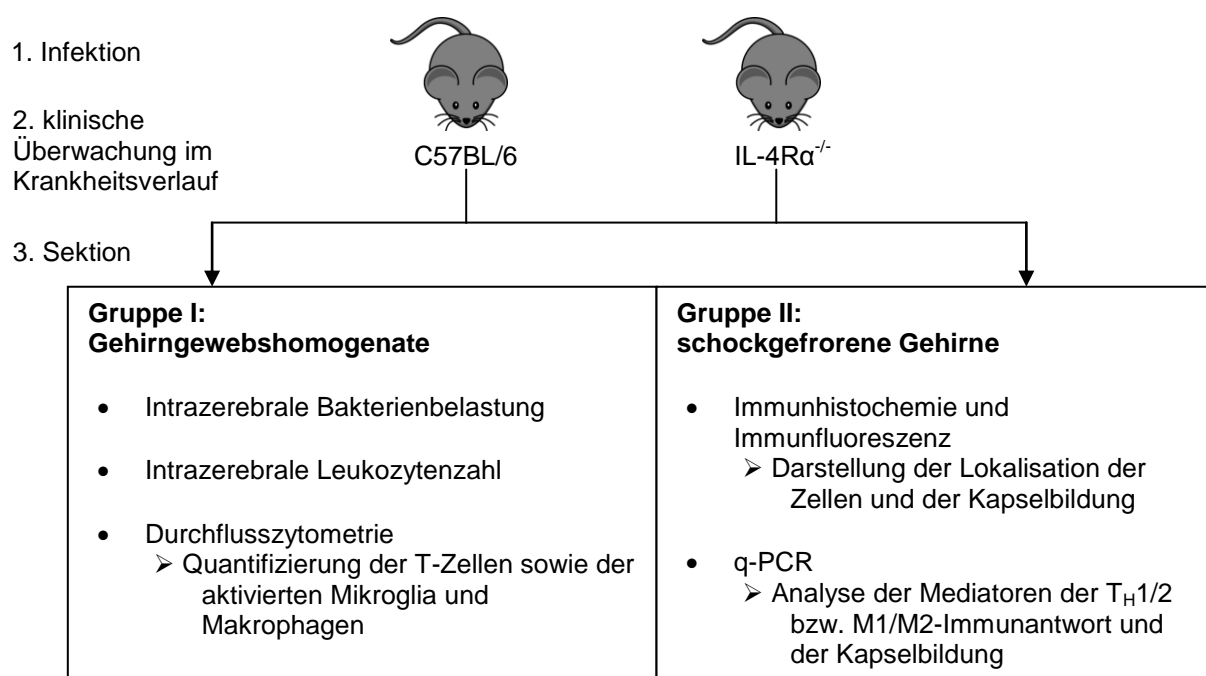


Abbildung 8: Versuchsaufbau

4 ERGEBNISSE

4.1 Klinischer Verlauf der Hirnabszessentwicklung

Nach intrazerebraler Injektion von *S. aureus* zeigten alle Mäuse einen charakteristischen klinischen Verlauf vom Akutstadium bis zur chronischen Phase.

Dabei kam es in den ersten Tagen nach der Infektion zu einer deutlichen Gewichtsabnahme um durchschnittlich 14 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht. Zirka um den 7. postoperativen Tag stagnierte der Gewichtsverlust, und die Mäuse begannen stetig an Gewicht zuzunehmen, bis zur Normalisierung auf das Ausgangsniveau zwischen Tag 21 und 28 p.i. (Abbildung 9 A, Tabelle 20). Analog dazu verhielt sich die Krankheitsaktivität. Klinisch am stärksten beeinträchtigt waren die Mäuse in den ersten Tagen nach der Operation mit einem Anstieg der Krankheitsaktivität von 0 auf einen Mittelwert von 3,1. Dies zeigte sich in einer reduzierten Aufnahme von Flüssigkeit und Futter, einem struppigen Fell und neurologischen Defiziten wie einer deutlich reduzierten Motorik mit z.T. linksseitiger Hemiparese. Im Verlauf besserte sich diese Symptomatik (Abbildung 9 B, Tabelle 20). Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere der Mock-Kontrollgruppe, denen keine Bakterien-Agarose-Kügelchen intrazerebral injiziert wurden, nur eine Gewichtsabnahme von maximal 3 % sowie eine diskrete klinische Symptomatik (maximaler Mittelwert der Krankheitsaktivität betrug 1,0) mit Wiedererreichen des Ausgangsniveaus bereits an Tag 3 nach der Operation (Abbildung 10 A-C). Dieser Verlauf der Krankheitsaktivität gleicht den Daten, die bereits früher in anderen Experimenten der Arbeitsgruppe erhoben wurden (34,36,39).

Wenn es zu Todesfällen kam, dann verstarben die meisten infizierten Tiere innerhalb der ersten postoperativen Woche (Abbildung 9 C). Sobald sich eine klinische Verbesserung der Symptomatik mit Gewichtszunahme einstellte, überlebten die Mäuse die Infektion.

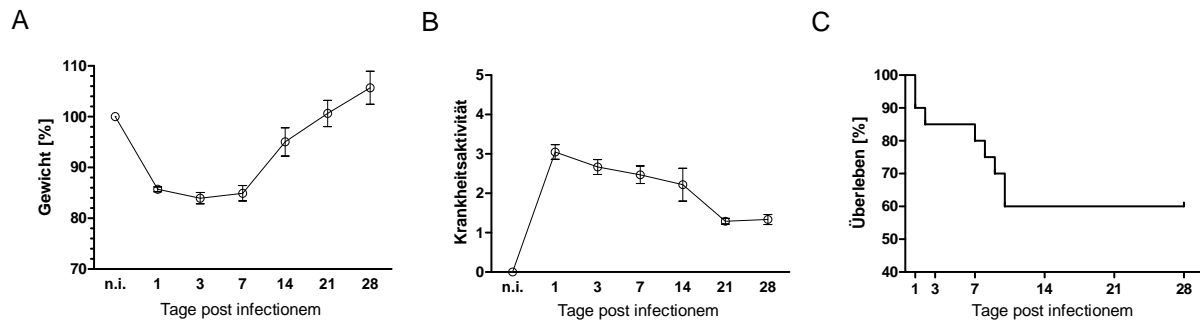


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung eines typischen klinischen Verlaufs nach der Infektion bei WT-Mäusen. Prozentuales Gewicht (A), klinische Krankheitsaktivität (B) und prozentuales Überleben (C) von WT-Mäusen nach i.c. Injektion von *S. aureus*. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit dem SEM von anfänglich 20 Tieren. Die Abbildung zeigt den charakteristischen Verlauf eines Experimentes von Tag 1 bis Tag 28 p.i..

Tage post infectionem	Krankheitsaktivität \pm SEM	Gewicht [%] \pm SEM
1	3,1 \pm 0,2	85,7 \pm 0,5
3	2,7 \pm 0,2	84,0 \pm 1,1
7	2,5 \pm 0,2	84,9 \pm 1,5
14	2,2 \pm 0,4	95,0 \pm 2,8
21	1,3 \pm 0,1	100,6 \pm 2,6
28	1,3 \pm 0,1	105,7 \pm 3,2

Tabelle 20: Kinetik der klinischen Krankheitsaktivität sowie des Gewichts bei infizierten WT-Mäusen (n=12-20)

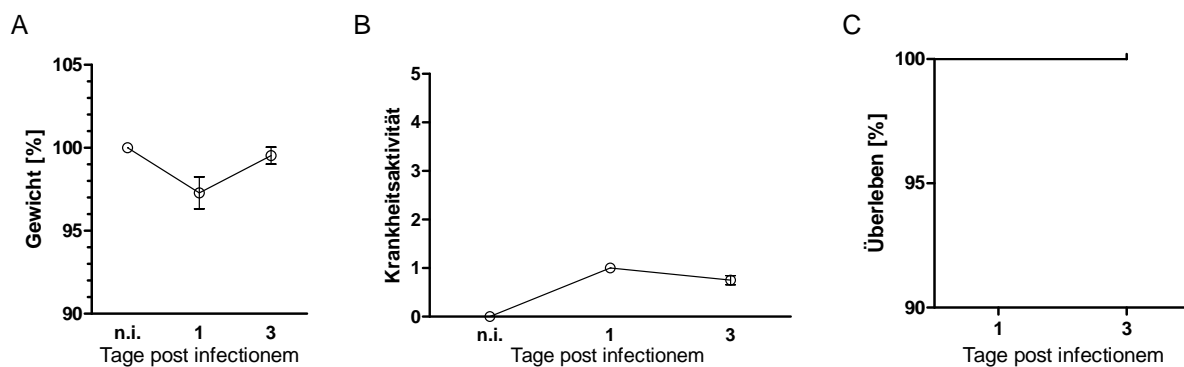


Abbildung 10: Klinischer Verlauf bei Mock-Kontrolltieren. Prozentuales Gewicht (A), klinische Krankheitsaktivität (B) und prozentuales Überleben (C) bei Mock-Kontrolltieren bis Tag 3 nach der Operation. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit dem SEM von 8 Tieren.

4.2. Quantitative Bestimmung zerebraler Bakterien und Leukozyten

Die intrazerebrale Bakterienbelastung, ermittelt durch Auszählen der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *S. aureus* pro Gehirn, spiegelt den Verlauf der klinischen Krankheitsaktivität wider. So wurden die höchsten Erregerzahlen an Tag 3 p.i. mit einem Mittelwert von $7,1 \times 10^7$ gefunden. An den folgenden Untersuchungszeitpunkten, Tag 14 und 28 p.i., nahm die Bakterienzahl signifikant auf Mittelwerte von $2,8 \times 10^6$ bzw. $3,9 \times 10^6$ ab (Abbildung 11 A). Der bakterielle Befall konnte auch mittels histopathologischer Untersuchungen bestätigt werden: In der Gram-Färbung zeigten sich in der Spätphase der Infektion deutlich weniger grampositive Staphylokokken im nekrotischen Zentrum des Abszesses als am 3. Tag der Entzündungsreaktion (Abbildung 12 A-C). Dass in der chronischen Phase der Abszessentwicklung trotz eines deutlichen Rückganges der klinischen Symptomatik eine zwar signifikant reduzierte,

dennoch relevante Erregermenge gefunden wurde, deutet auf eine klinisch wirksame Abkapselung des Entzündungsprozesses im Verlauf hin.

Die Gesamtzahl der zerebralen Leukozyten, ermittelt mittels Percoll-Gradient, lag erwartungsgemäß signifikant höher bei den infizierten Mäusen im Vergleich zu nicht infizierten Tieren (n.i.) (Abbildung 11 B) und Mock-Kontrolltieren (Daten nicht gezeigt). Es kam zu einem Anstieg der Leukozyten-Zellzahlen von $1,1 \times 10^6$ vor der Infektion auf durchschnittlich $3,2 \times 10^6$ bis Tag 14 p.i. mit konsekutivem Rückgang bis Tag 28 p.i. (Abbildung 11 B).

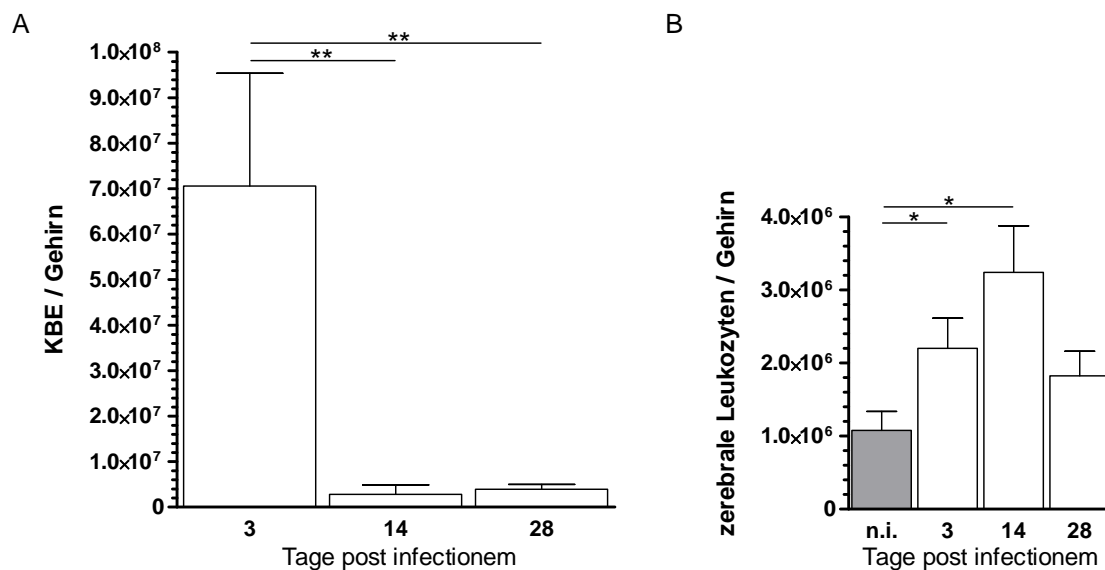


Abbildung 11: Kinetik der intrazerebralen Bakterien- und Leukozytenzahlen bei WT-Mäusen. Dargestellt sind die Bakterienzahl als KBE pro Gehirn (A) sowie die Leukozytenzahl pro Gehirn (B) von nicht infizierten WT-Mäusen (n.i.) und nach i.c. Injektion von *S. aureus*. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 5 bis 15 Tieren pro Zeitpunkt. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Mann-Whitney *U*-test. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$.

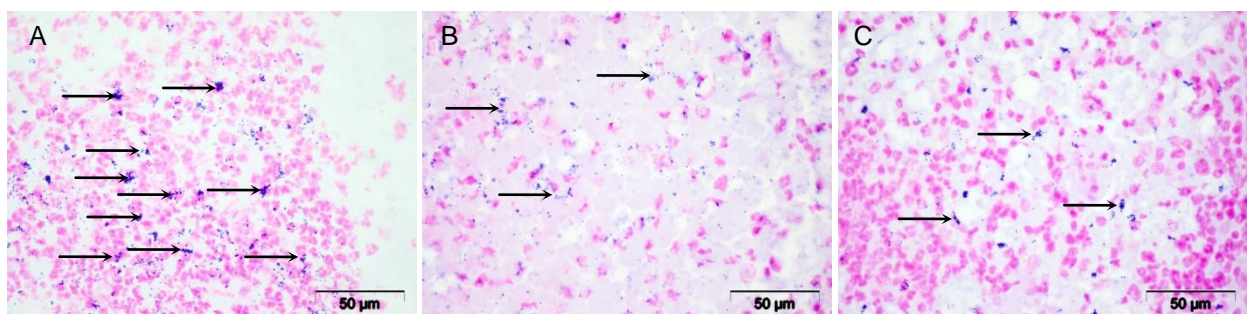


Abbildung 12: Stadienabhängige zerebrale Bakterienbesiedlung bei infizierten WT-Mäusen. Dargestellt ist das Abszesszentrum mittels Gram-Färbung an den Tagen 3 (A), 14 (B) und 28 p.i. (C). Zu erkennen ist eine Abnahme von grampositiven Staphylokokken (Pfeile) im Zentrum des Abszesses im Verlauf der Erkrankung.

4.3 Zellulärer Aufbau, Zytokin- und Chemokinprofil in der Frühphase und Spätphase der Hirnabszessentwicklung

Ein Ziel der Arbeit war es, die der Hirnabszessentwicklung zugrunde liegende Immunantwort in den verschiedenen Phasen detailliert zu charakterisieren, insbesondere mit Fokus auf die beteiligten Zellpopulationen und deren Zytokin- und Chemokinausschüttung.

4.3.1 Dominierende Zellpopulationen und Mediatoren der Frühphase

Nach der intrazerebralen Infektion mit *S. aureus* konnten wir über die makroskopische Darstellung (Abbildung 13 A-C) hinaus die charakteristischen morphologischen Veränderungen, die im Verlauf der Hirnabszessentwicklung (bei Menschen und im murinen Modell) bereits beschrieben wurden, mittels histopathologischer Untersuchungen ebenfalls gut reproduzierbar nachweisen.

So zeigte sich in der H&E-Färbung nach Eindringen der Bakterien initial eine lokale Entzündung mit nachfolgender einschmelzender Nekrose des Gehirnparenchyms (Abbildung 16 A-C). Die massive Einwanderung von Entzündungszellen wie Granulozyten und Makrophagen sowie die Aktivierung von Mikrogliazellen konnte mit Hilfe der CD11b- (Abbildung 16 D-F) und F4/80-Färbungen (Abbildung 16 G-I) histologisch, sowie mittels durchflusszytometrischer Messungen anhand des Oberflächenmarkerprofils $CD11b^+CD45^{high}$ (aktivierte Mikroglia und Makrophagen) nachgewiesen werden (Abbildung 14 und 15). Hier fanden wir an Tag 3 p.i. einen signifikanten Anstieg der $CD11b^+CD45^{high}$ -exprimierenden Leukozytenpopulation, die sich histologisch in direkter und weiterer Umgebung des nekrotischen Zentrums des Abszesses nachweisen ließ (die kräftige Anfärbung des Abszesszentrums ist unspezifisch und zeigt unregelmässig begrenzt, flächig nekrotisches Gewebe). Im Verlauf kam es zwar zu einer deutlichen Reduktion der $CD11b^+CD45^{high}$ -Zellen, dennoch zeigte sich noch bis Tag 14 p.i. eine signifikant größere Zahl der Leukozytenpopulation im Vergleich zu den Mock-Kontrollen (Abbildung 14).

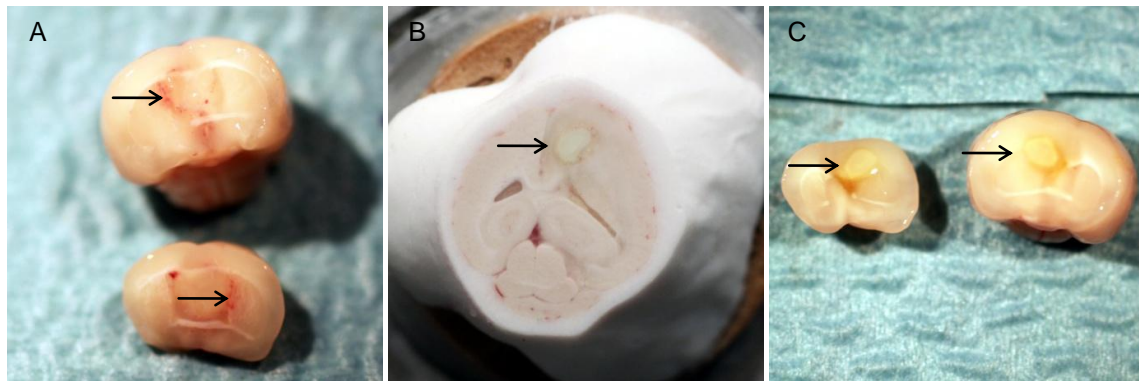


Abbildung 13: Entstehung des *S. aureus*-induzierten Hirnabszesses bei WT-Mäusen. Makroskopische Darstellung des Hirnabszesses (Pfeile) an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten Tag 3 (A), 14 (B) und 28 p.i. (C) in der rechten Gehirnhemisphäre mit charakteristischer Raumforderung, Mittellinienverlagerung und hier auch randständiger Demarkierung des zentral nekrotischen (gelben) Prozesses.

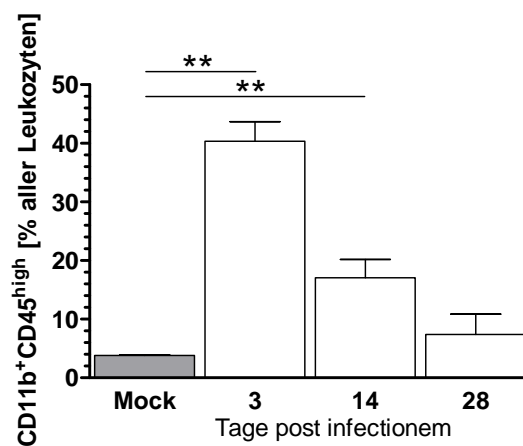


Abbildung 14: Kinetik der aktivierten Mikroglia- und Makrophagenpopulation im Verlauf der Infektion I. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der CD11b⁺CD45^{high}-exprimierenden Leukozyten bei der WT-Maus an den Tagen 3, 14 und 28 p.i. im Vergleich zu Mock-Kontrolltieren, gemessen per Durchflusszytometrie. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 3 (Mock) bis 7 Tieren pro Zeitpunkt. Die statistische Berechnung erfolgte mittels Mann-Whitney U-test. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$.

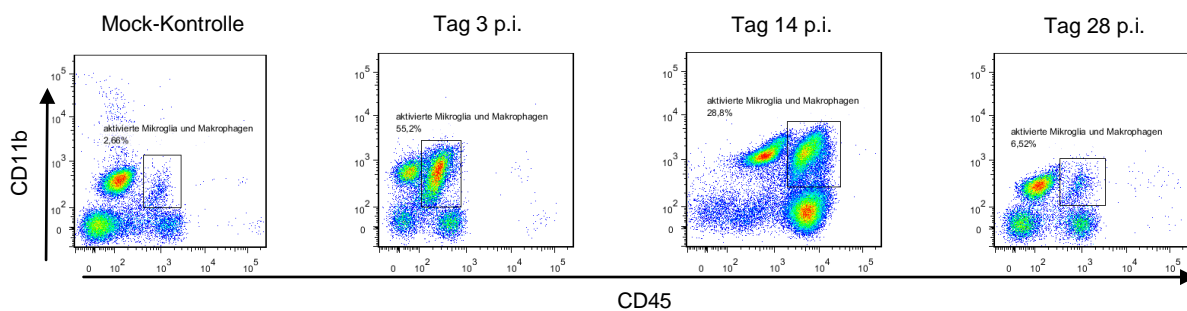


Abbildung 15: Kinetik der aktivierten Mikroglia- und Makrophagenpopulation im Verlauf der Infektion II. Exemplarische Darstellung mittels „Pseudocolor Plot“ jeweils eines durchflusszytometrisch untersuchten Mausgehirns an Tag 3, 14 und 28 p.i. sowie eines Mock-Kontrolltieres.

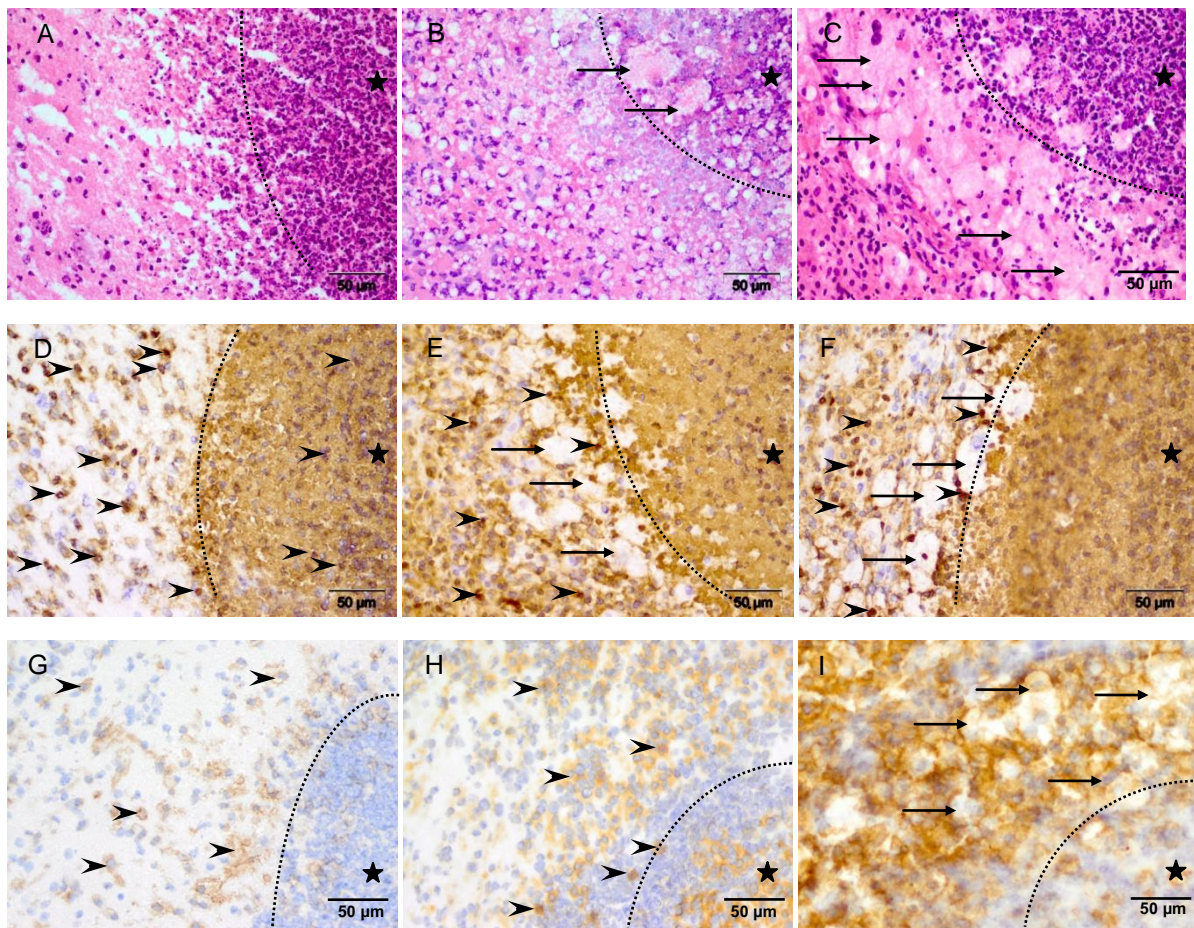


Abbildung 16: Immunhistochemische Charakteristika der einzelnen Phasen des *S. aureus*-induzierten Hirnabszesses bei WT-Mäusen. Dargestellt sind jeweils die drei Untersuchungszeitpunkte Tag 3, 14 und 28 p.i. in der H&E- (A, B, C), der CD11b- (D, E, F) und F4/80-Färbung (G, H, I). Sterne markieren jeweils das Abszesszentrum, Pfeile zeigen kleinvolumige CD11b⁺-Zellen bzw. F4/80⁺-Makrophagen bzw. aktivierte Mikroglia (kurze Pfeile) sowie großvolumige CD11b⁺-Zellen bzw. F4/80⁺-Makrophagen (lange Pfeile) in ihrer typischen stadienabhängigen Lokalisation.

Die den CD4-Rezeptor tragenden T_H-Zellen sind essentiell für die konsekutive Makrophagenaktivierung, indem sie je nach Zytokinprofil u.a. eine T_H1- oder T_H2-Antwort induzieren. Diese wiederum entscheidet über die nachfolgende sog. „Polarisation“ oder den Aktivierungsstatus der Makrophagen, z.B. in einen eher „klassisch aktivierten“/M1, oder eher „alternativ aktivierten“/M2 Phänotyp (60,71,73,74). Bereits früh im Laufe der fokalen Entzündungsreaktion ließen sich einzelne T-Lymphozyten nachweisen, wenngleich eine deutliche Einwanderung von CD4⁺-Lymphozyten erst ab Tag 14 p.i. und auf einem gleichbleibend hohen Level bis zum Spätstadium an Tag 28 p.i. detektiert werden konnte (Abbildung 18 A). Bezüglich der Verteilung ließen sich CD4⁺-Zellen vor allem in unmittelbarer Umgebung des sich bildenden Abszesses nahe der umgrenzenden Kollagenkapsel anfärben (Abbildung 17 A-C).

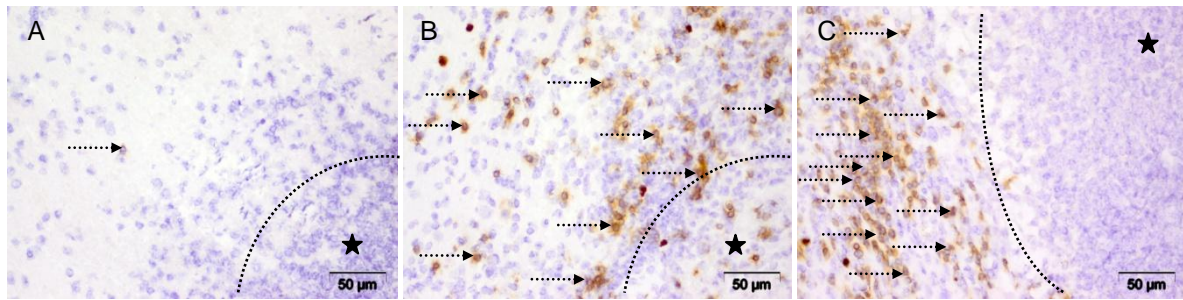


Abbildung 17: Auftreten und Verteilung von CD4-positiven T_H -Zellen. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Hirnabszesses bei WT-Mäusen an den Tagen 3 (A), 14 (B) und 28 p.i. (C) in der CD4-Färbung. Sterne markieren das Abszesszentrum und Pfeile deuten auf immigrierte $CD4^+$ - T_H -Zellen.

Eine effektive frühe Bakterienabwehr ist abhängig von einer funktionierenden T_H1 -Antwort. Als Schlüsselmediatoren wurden in diesem Zusammenhang u.a. die Zytokine IL-12, TNF- α und IFN- γ beschrieben, die nachfolgend Makrophagen zur Expression von iNOS stimulieren, wodurch wiederum bakterizide NO-Verbindungen synthetisiert werden (41,77,80).

Trotz initial spärlicher Invasion von CD4-exprimierenden T_H -Zellen zeigten diese eine deutliche Produktion von IFN- γ insbesondere in der Frühphase, an Tag 3 p.i., was die wichtige Rolle proinflammatorischer Zytokine zu Beginn der Infektion bestätigt. Diese T_H1 -Zellen, eine IFN- γ -produzierende Subpopulation der T-Lymphozyten, scheinen demzufolge erwartungsgemäß in der Akutphase der Entzündungsreaktion zu dominieren (Abbildung 18 A und B).

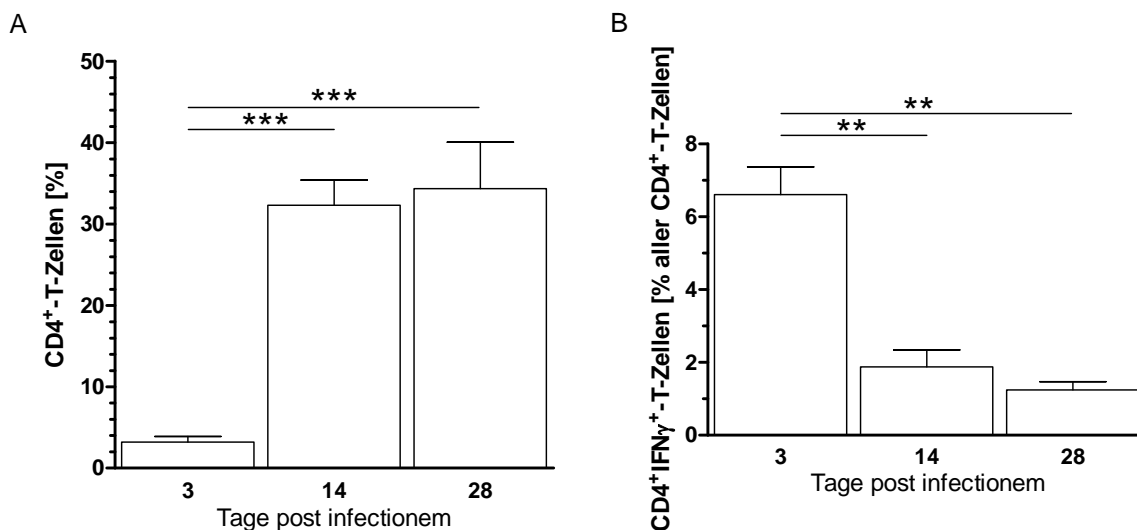


Abbildung 18: Quantitative Analyse CD4-positiver Lymphozyten und deren Sekretionsmuster. Darstellung des zeitlichen Auftretens der $CD4^+$ - T_H -Zellen (A) und des prozentualen Anteils IFN- γ -produzierender $CD4^+$ - T_H -Zellen (B) im Verlauf der Hirnabszessentstehung bei infizierten WT-Mäusen, gemessen per Durchflusszytometrie. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 9 Tieren pro Zeitpunkt. Die statistische Berechnung erfolgte mittels Mann-Whitney U -test. **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.005$.

Um festzustellen, welche Immunantwort zu welchem Zeitpunkt der Hirnabszessentwicklung überwiegt, bestimmten wir außerdem die Expression der oben

genannten T_H1 -assoziierten proinflammatorischen Mediatoren auf Genebene mittels qPCR in Gewebshomogenaten ganzer Maushirne. Hierbei zeigte sich eine gleichbleibend hohe Genexpression von *Il12a* sowie eine in der Akutphase betonte Hochregulation von *Tnf* (Abbildung 19 A). Trotz oben gezeigter maximaler Produktion des proinflammatorischen IFN- γ durch $CD4^+$ - T_H -Zellen an Tag 3 p.i. detektierten wir auf mRNA-Ebene eine tendenzielle Zunahme von *Irfng* im Verlauf (Abbildung 19 A). Im Vergleich zu naiven Mäusen konnte bei Mock-Kontrolltieren eine allenfalls geringe Induktion der Expression proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden (Abbildung 19 B).

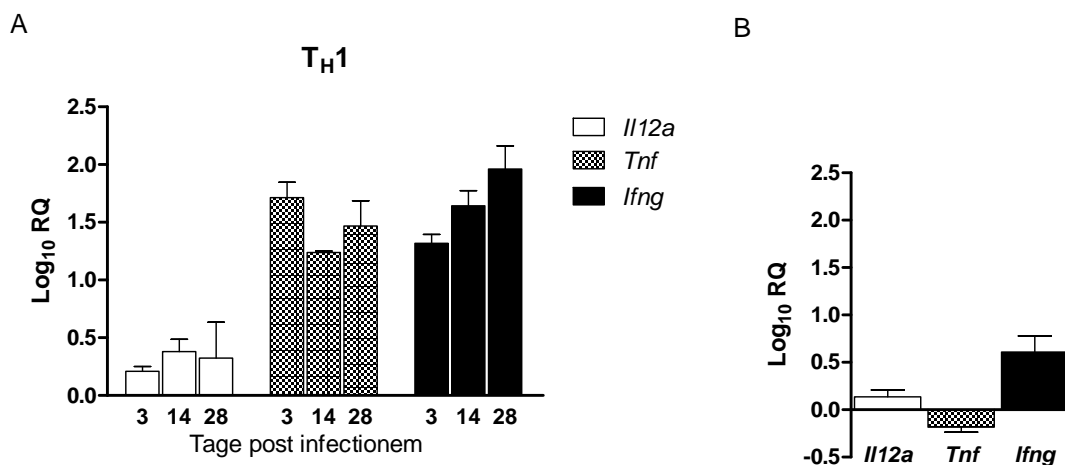


Abbildung 19: Kinetik proinflammatorischer Mediatoren. Quantifizierung der Expression von *Il12a*, *Tnf* und *Irfng* bei infizierten WT-Mäusen (A) an den Tagen 3, 14 und 28 p.i. sowie bei Mock-Kontrolltieren (B), gemessen mittels qPCR. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 2 bis 6 Tieren pro Zeitpunkt als logarithmische Darstellung der relativen Genexpression ($\Delta\Delta C_t$ -Methode).

Unter der spezifischen Fragestellung des Auftretens, der Verteilung sowie der Polarisation von Makrophagen im Rahmen der Hirnabszessentwicklung untersuchten wir verschiedene durch Makrophagen exprimierte Zytokine und Chemokine sowie Oberflächenmarker, exemplarisch für die Akut- und Spätphase der Erkrankung.

Als Marker der klassischen Aktivierung von Makrophagen (M1) dienten Antikörper gegen die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Es zeigten sich an Tag 3 nach erfolgter Bakterien-Injektion kleine, kompakt wirkende, iNOS-produzierende Zellen, die partiell F4/80-positiv waren und die das nekrotische Zentrum unmittelbar säumten, aber auch z.T. im nekrotischen Zentrum aufzufinden waren (Abbildung 20 B-G, siehe auch Pfeile in Abbildung 16 D-I). Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung illustriert darüber hinaus, dass iNOS oft auch unabhängig von F4/80⁺-Makrophagen, z.B. von Granulozyten, exprimiert wird, wie frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten (Abbildung 20 E-G) (39). Übereinstimmend mit den histologischen Ergebnissen fanden wir die

höchste Expression von *Nos2* (iNOS) als proinflammatorischer, bakterizider Mediator, zu Beginn der Infektion mit deutlicher Abnahme der Genexpression im Verlauf (Abbildung 20 A).

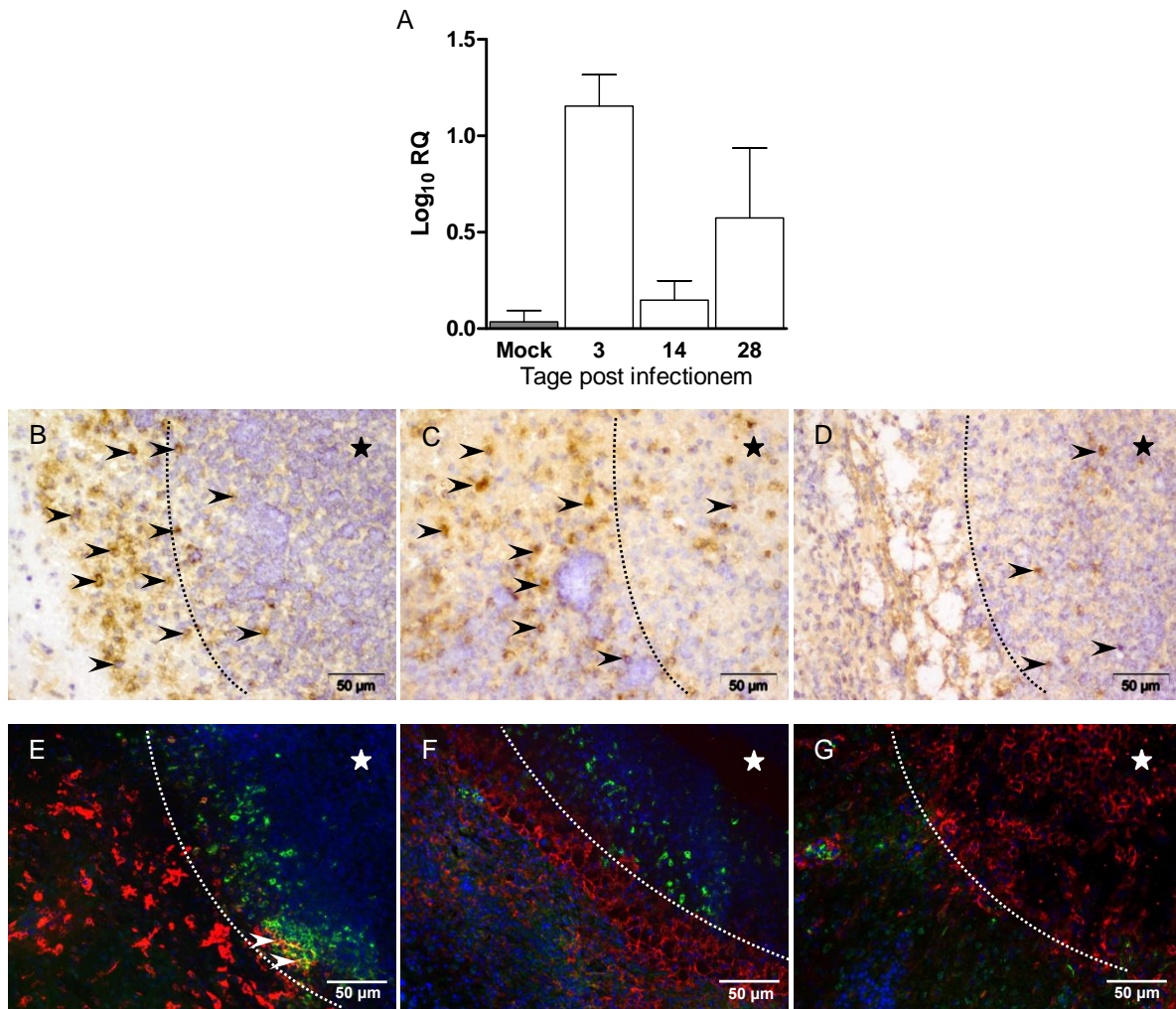


Abbildung 20: Untersuchung der iNOS im Verlauf der Infektion. Kinetik der *Nos2*-Genexpression (A) bei infizierten WT-Mäusen im Vergleich zu Mock-Kontrolltieren, gemessen mittels qPCR. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 2 bis 7 Tieren pro Zeitpunkt als logarithmische Darstellung der relativen Genexpression ($\Delta\Delta Ct$ -Methode). B-D, Auftreten und Verteilung von iNOS-exprimierenden Zellen (kurze Pfeile) an den Tagen 3 (B), 14 (C) und 28 p.i. (D) sowie Doppelimmunfluoreszenzdarstellung von F4/80-(DyLight 649, rot) und iNOS-(Cy3, grün) koexprimierenden Makrophagen (Überlagerung gelb, Pfeile), jeweils mit DAPI, zur Darstellung der Zellkerne (blau), an den Tagen 3 (E), 14 (F) und 28 p.i. (G) bei der WT-Maus. Sterne markieren das Abszesszentrum.

Zusammenfassend konnten wir in der Frühphase der Hirnabszessentwicklung, ab Tag 3 nach der intrazerebralen Infektion mit *S. aureus*, eine signifikante Zunahme einwandernder Leukozyten und aktivierter Mikrogliazellen nachweisen. Es kam zu einer Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, die der T_H1-Antwort zugeordnet werden konnten, mit nachfolgender entsprechender Aktivierung von Makrophagen/Mikroglia. Diese sich in unmittelbarer Umgebung des Abszesses und vereinzelt im nekrotischen Zentrum ansiedelnden F4/80-positiven Makrophagen koexprimierten iNOS und scheinen daher eine Rolle für die Bakterieneliminierung zu spielen. Erst im weiteren

Verlauf, um Tag 14 p.i., konnte eine signifikante Steigerung der CD4⁺-Lymphozyten beobachtet werden, die ihrerseits durch Produktion von IFN- γ die T_H1/M1-Antwort stimulieren.

4.3.2 Molekulare Mechanismen der Spätphase der Abszessbildung, speziell der Kapselbildung

Der weitere Verlauf der Hirnabszessentstehung hin zur chronischen Phase war charakterisiert durch den Rückgang der zentralen Entzündungsaktivität und der Ausbildung einer prominenten bindegewebigen Kapsel zur Verhinderung einer weiteren Erregerausbreitung in das angrenzende ZNS und damit zum Schutz des umliegenden gesunden Gehirnparenchyms (Abbildung 21 A-F). Übereinstimmend damit konnten Bakterienkolonien ausschließlich innerhalb der Kollagenkapsel detektiert werden (Abbildung 22 A und B).

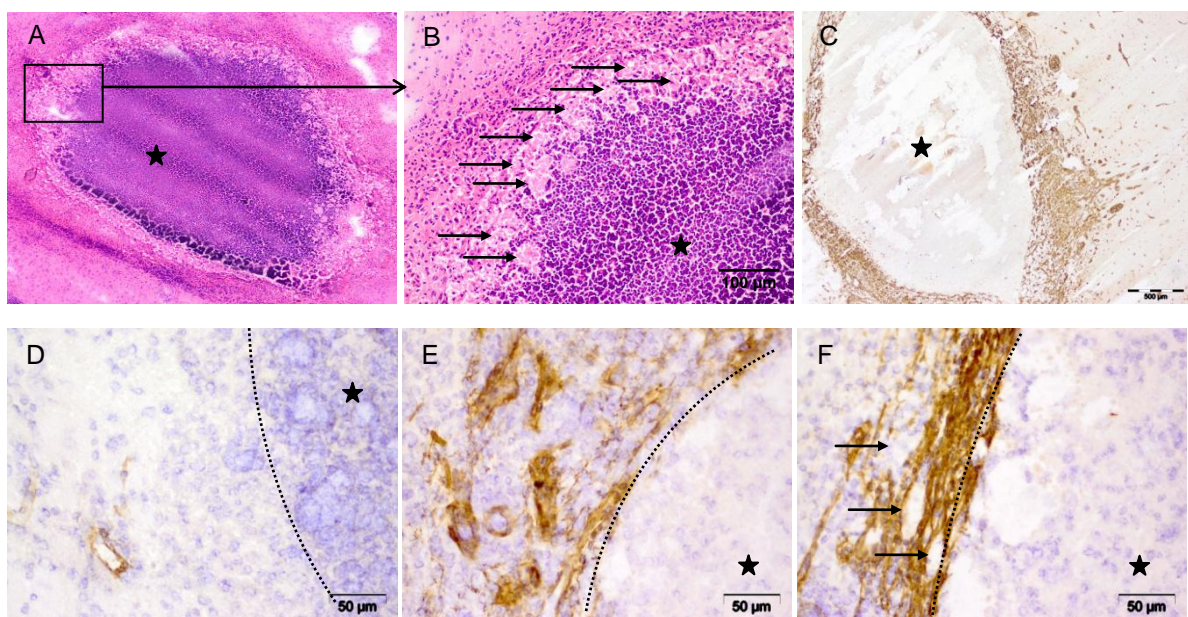


Abbildung 21: Histopathologische Charakteristik des Hirnabszesses im chronischen Kapselstadium. A, Übersicht der charakteristischen Morphologie des Hirnabszesses sowie Nahaufnahme eines Ausschnittes (B) in der H&E-Färbung an Tag 28 p.i. bei der WT-Maus. C, Darstellung der Kollagenkapsel durch Anfärbung von Kollagen VI an Tag 28 p.i. bei der WT-Maus sowie Abbildung des Verlaufes der Kollagen VI-Ablagerung an den Tagen 3 (D), 14 (E) und 28 p.i. (F) bei der WT-Maus. Die Sterne markieren das Abszesszentrum, die Pfeile zeigen großvolumige, das Abszesszentrum umgrenzende und in die Kollagenkapsel eingelagerte Zellen.

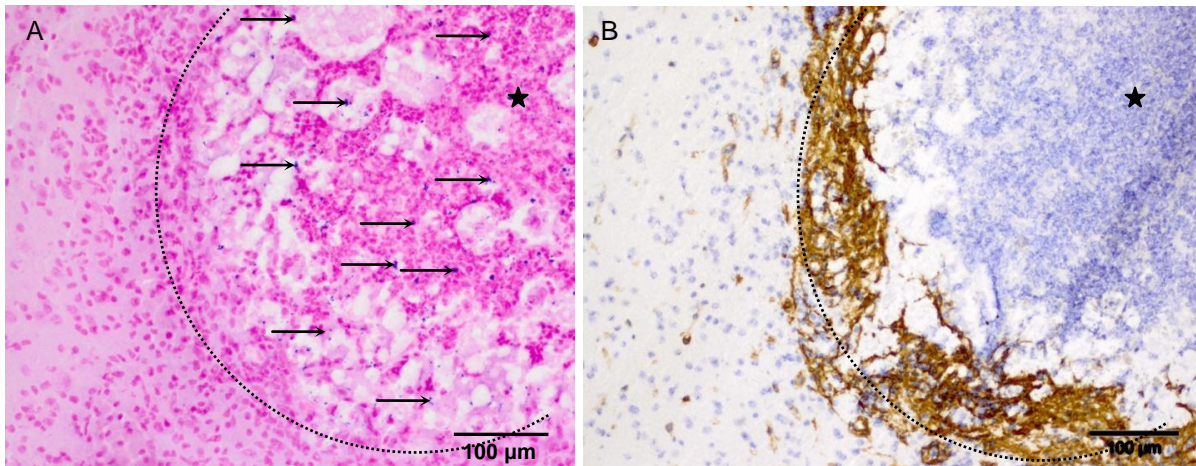


Abbildung 22: Darstellung der bakteriellen Besiedlung im Bereich des Hirnabszesses. Vergleichende Lokalisation grampositiver Staphylokokkenkolonien (Pfeile) im Abszesszentrum (Stern) (A) mit der abgrenzenden Kollagenkapsel (B) bei einer infizierten Maus an Tag 28 p.i.

Als zentrale Komponente einer T_H2 -Antwort wurde der IL-4R α beschrieben, dessen Liganden IL-4 und IL-13 die entscheidenden Mediatoren darstellen (57,92,99).

Per Durchflusszytometrie bestimmten wir die Anzahl CD11b⁺CD45⁺-Makrophagen und Mikrogliazellen, die den IL-4R α exprimierten. Im Verhältnis zu nicht infizierten, naiven Mäusen konnten wir einen eindeutigen Anstieg der IL-4R α -positiven CD11b⁺CD45⁺-Zellen im chronischen Stadium, an Tag 28 p.i. detektieren (Abbildung 23 A).

Erwartungsgemäß zeigte sich eine deutliche Hochregulation der Genexpression der T_H2 -assoziierten Zytokine *Il4* und *Il13* im Verlauf der Hirnabszessentwicklung mit maximalen Werten an Tag 28 p.i. (Abbildung 23 B).

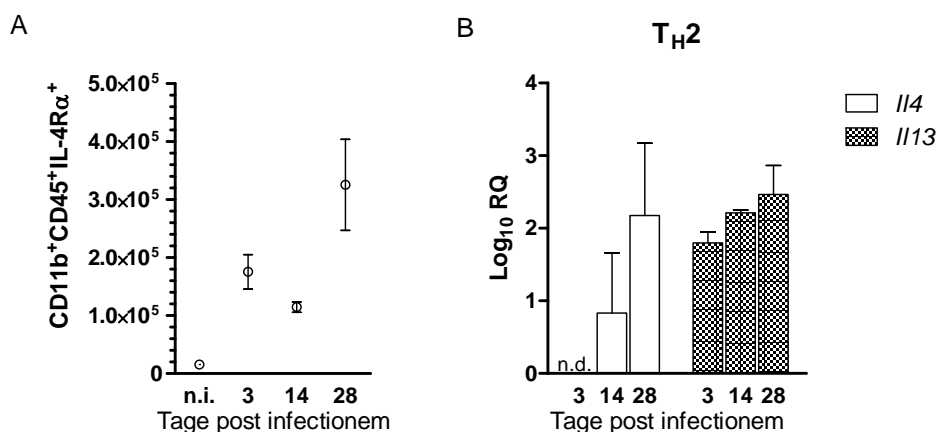


Abbildung 23: Quantifizierung der Expression von IL-4R α durch Makrophagen und Mikrogliazellen. A, Durchflusszytometrische Bestimmung der CD11b⁺CD45⁺IL-4R α ⁺-Zellen, verglichen mit naiven WT-Mäusen, im Verlauf der Hirnabszessentwicklung bei infizierten WT-Mäusen an den Tagen 3, 14 und 28 p.i.. B, Kinetik der T_H2 -assoziierten Mediatoren bei infizierten WT-Mäusen, gemessen mittels qPCR. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 2 bis 6 Tieren pro Zeitpunkt als logarithmische Darstellung der relativen Genexpression ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) (n.d. = not detected).

Etwa zeitgleich zur Einwanderung der CD4⁺- T_H -Zellen um Tag 14 p.i. konnten wir histologisch F4/80⁺-Makrophagen nachweisen, die CD206 koexprimierten und einen charakteristischen Randwall um das Abszesszentrum bildeten. Morphologisch stellten

sich die CD206⁺-Makrophagen als großvolumige Zellen mit schaumigem Zytoplasma dar und waren entweder direkt in der Kollagenkapsel lokalisiert oder in unmittelbarer Umgebung zu detektieren (Abbildung 24 A-F, siehe auch Abbildung 16 B, C, E, F, I, Abbildung 21 B, F). Zudem legt die räumliche Assoziation von F4/80 und VEGF-A eine Beteiligung der Makrophagen an der Neovaskularisation nahe (Abbildung 24 G-I).

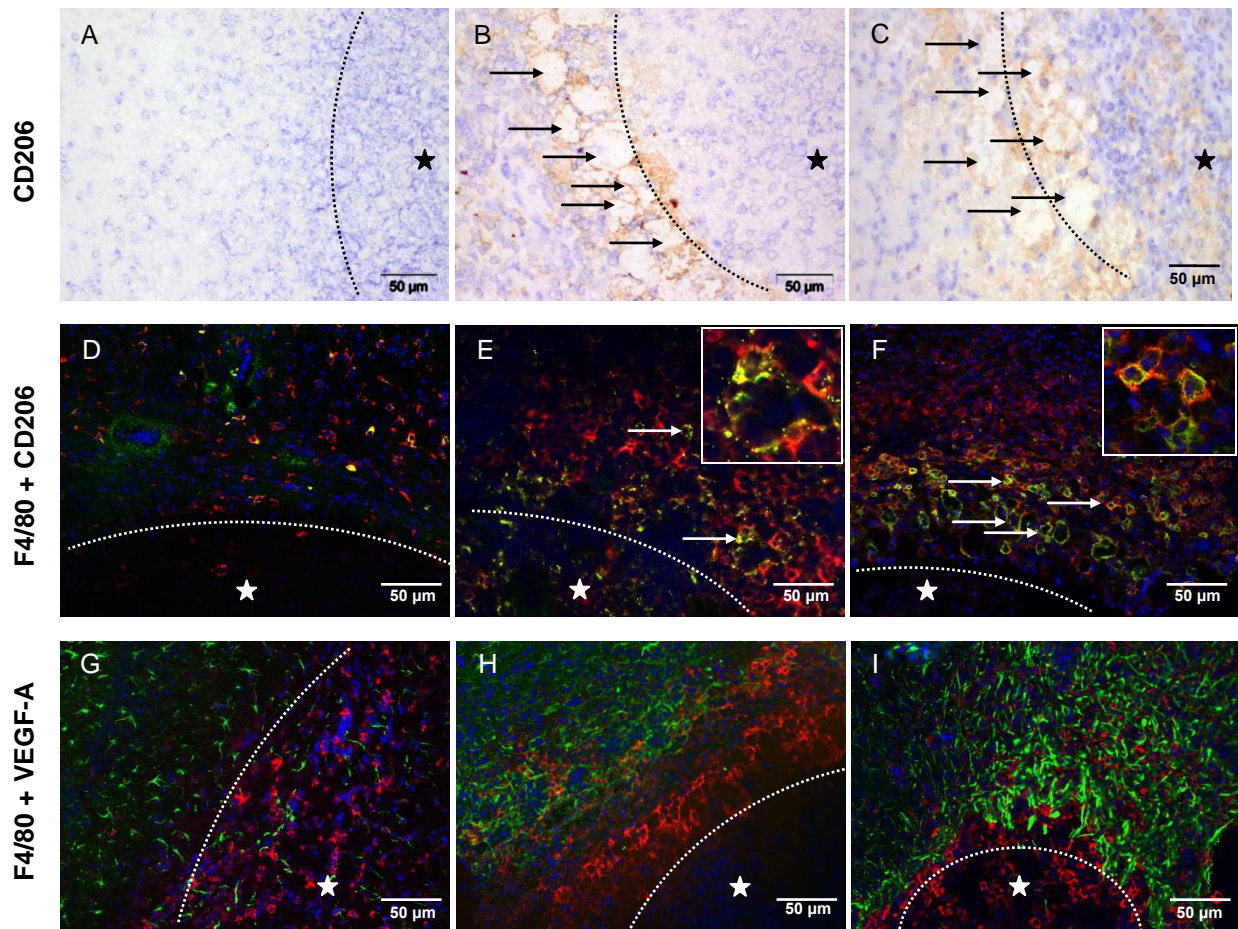


Abbildung 24: Einfluss der Makrophagen auf die Kapselbildung. Einwanderung Kapsel-assoziiierter CD206-exprimierender Makrophagen (Pfeile) bei infizierten WT-Mäusen an den Tagen 3 (A), 14 (B) und 28 (C) p.i.. Zudem Abbildung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung von F4/80 (DyLight 649, rot) mit CD206 (Cy3, grün) (Überlagerung gelb) sowie F4/80 (DyLight 649, rot) mit VEGF-A (Cy3, grün) jeweils mit DAPI, zur Darstellung der Zellkerne (blau), bei infizierten WT-Mäusen an den Tagen 3 (D,G), 14 (E,H) und 28 (F,I) p.i.. Die Sterne markieren das Abszesszentrum.

Bei der Bestimmung der im Zusammenhang mit der M2-Polarisation beschriebenen Marker *Mrc1* (CD206), *Clec10a* (CD301), *Chi3l3* (Ym1), *Arg1* und *Ccl17* konnte ebenfalls in der chronischen Phase der Hirnabszessentwicklung die quantitativ maximale Genexpression verzeichnet werden (Abbildung 25 A). Interessanterweise war auch an Tag 3 p.i. bereits eine kräftige Genexpression von *Chi3l3* und *Arg1* zu verzeichnen. Zudem kam es zu einer Hochregulation der profibrotischen Mediatoren IL-10 und TGF- β im Verlauf der Infektion (Abbildung 25 B).

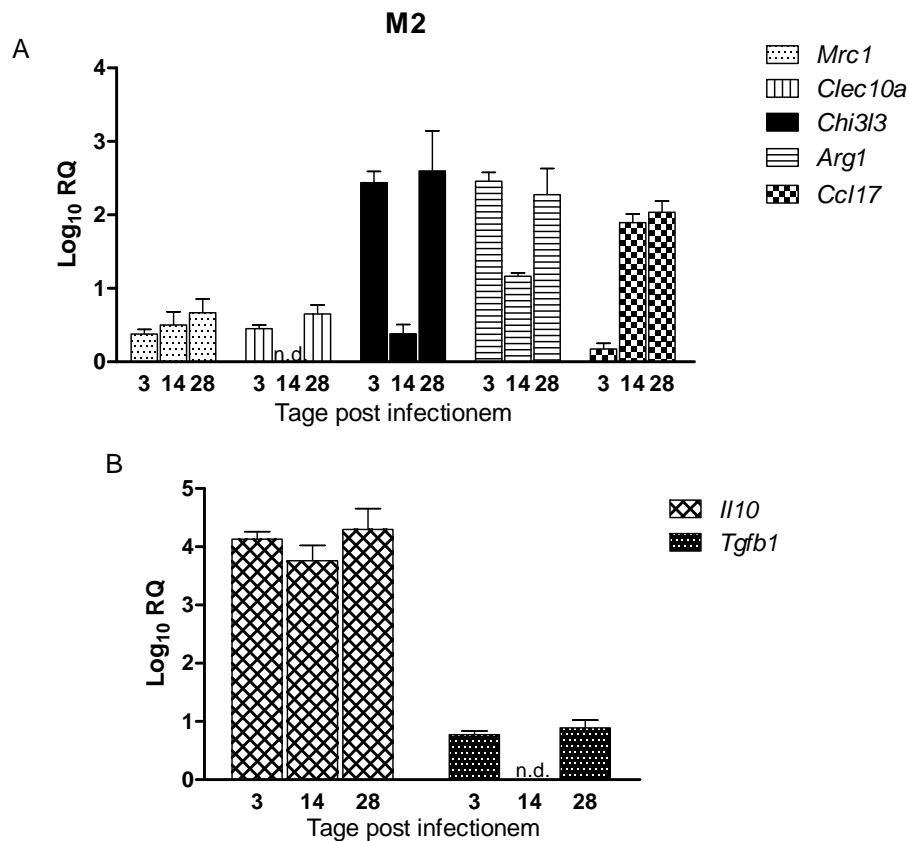


Abbildung 25: Kinetik der antiinflammatorischen M2- und Fibrose-assoziierten Mediatoren bei infizierten WT-Mäusen. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression ($\Delta\Delta Ct$ -Methode) von *Mrc1*, *Clec10a*, *Chi3l3*, *Arg1* und *Ccl17* (A) sowie von *Il10* und *Tgfb1* (B), gemessen mittels qPCR. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 2 bis 6 Tieren pro Zeitpunkt.

Zusammenfassend entwickelte sich trotz initialer Hochregulation der bakteriziden $T_H1/M1$ -Antwort als Folge der chronischen Entzündung mit unzureichender früher Erregerelimination regelmäßig ein bindegewebig abgekapselter Abszess mit charakteristischem histologischen Aufbau: Im Zentrum eine eitrig-nekrotische Nekrose mit Persistenz von einzelnen Bakterienkolonien, iNOS-exprimierenden Granulozyten und eher kleinvolumigen Makrophagen. Sich abgrenzend zum gesunden Gehirnparenchym kam eine deutliche neovaskularisierte (VEGF-A-positive) Kollagenkapsel zur Darstellung mit einem eingelagerten Ring großvolumiger, CD206-positiver Makrophagen. In unmittelbarer Umgebung dazu und weiter in die Peripherie reichend fanden wir $CD4^+$ -Lymphozyten (Abbildung 26).

Passend zu diesen Populationen zeigte sich auch ein charakteristischer Verlauf der Zytokinexpression, die für die entsprechende Aktivierung verschiedener Effektorzellen (z.B. Makrophagen) zuständig ist.

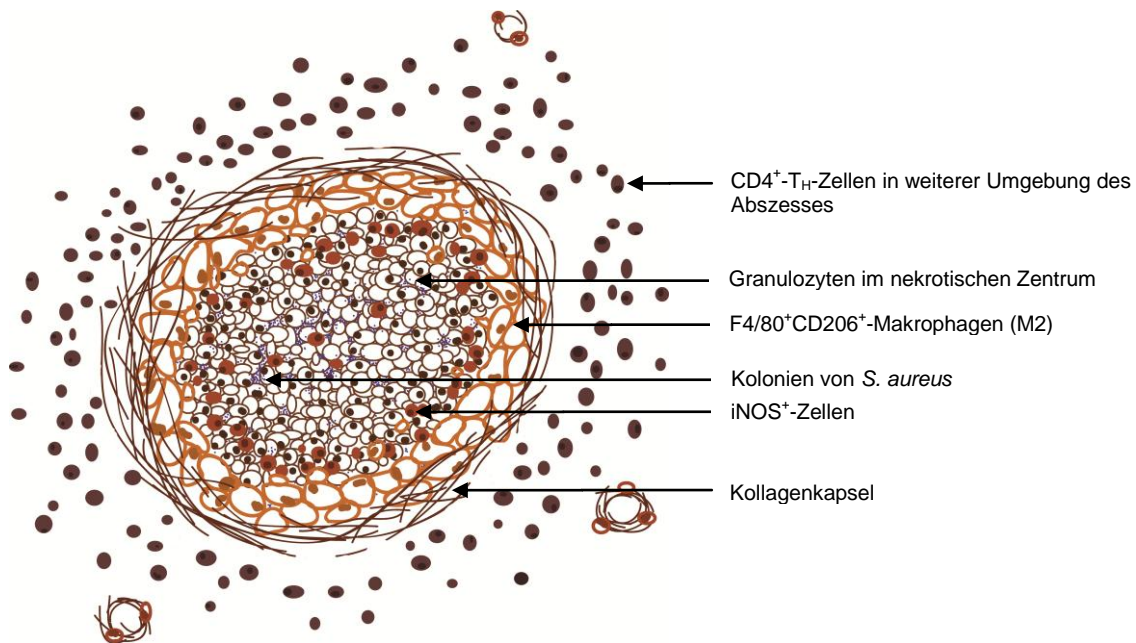


Abbildung 26: Schema des charakteristischen, histologischen Aufbaus eines murinen Hirnabszesses 28 Tage nach der intrazerebralen Infektion mit *S. aureus*.

4.4 Charakteristik der Hirnabszessentwicklung bei IL-4R α ^{-/-}-Mäusen

Aus den oben genannten Experimenten wird deutlich, dass die T_H2/M2-Antwort im fortgeschrittenen Stadium der Hirnabszessentwicklung von großer Bedeutung ist, und dass M2-Makrophagen an der Kapselbildung über womöglich direkte Beeinflussung der Fibroblastenaktivität beteiligt sind. Daher stellte sich die Frage, ob man alternativ aktivierte Makrophagen (M2), die über IL-4 und IL-13 aktiviert werden, durch Knockout des gemeinsamen Rezeptors (IL-4R α) in ihrer Funktion für die Spätphase des Abszesses beeinflussen kann. Oder anders formuliert, ob diese Makrophagen eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung einer bindegewebigen Kapsel sind.

Um also den Einfluss des IL-4R α auf den klinischen Verlauf, die T_H2-Antwort, die Makrophagenaktivierung und Kapselbildung untersuchen und beurteilen zu können, infizierten wir IL-4R α -defiziente Mäuse (auf demselben B16 genetischen Hintergrund) identisch wie die oben beschriebenen Wildtyp-Mäuse in einem konsekutiv durchgeführten Experiment unter exakt denselben Bedingungen.

4.4.1 Klinischer Verlauf bei IL-4R α -Defizienz

Analog zu den WT-Mäusen registrierten wir bei den Knockout-Mäusen einen starken Gewichtsverlust in den ersten Tagen nach der Infektion mit einem Maximum am dritten postoperativen Tag (18%); anschließend eine sukzessive Gewichtszunahme bis auf das Ausgangsniveau an Tag 28 p.i. (Abbildung 27 A, Tabelle 21). Auch das Ausmaß der

klinischen Beeinträchtigung der IL-4R α ^{-/-}-Mäuse zeigte einen ähnlichen Verlauf wie derjenige bei WT-Tieren, mit einer maximalen durchschnittlichen Krankheitsaktivität von 2,7 an Tag 1 p.i. sowie vergleichbarer neurologischer Symptomatik und langsamer Erholung im Verlauf. Lediglich an Tag 7 p.i. konnten wir eine signifikant geringere Symptomatik bei den Knockout-Mäusen detektieren (Abbildung 27 B, Tabelle 21). Insgesamt kam es in Abwesenheit des IL-4R α zu keinen deutlichen Unterschieden bezüglich des Gewichtsverlaufs, der klinischen Symptomatik und der Überlebensrate (Abbildung 27 A-C). Dabei war allerdings eine (überwiegend nicht signifikante) Tendenz zu einem mildereren klinischen Verlauf und einer besseren Überlebensrate bei den IL-4R α ^{-/-}-Mäusen zu erkennen. Letztendlich zeigte sich uns aber kein spezifischer klinischer Phänotyp.

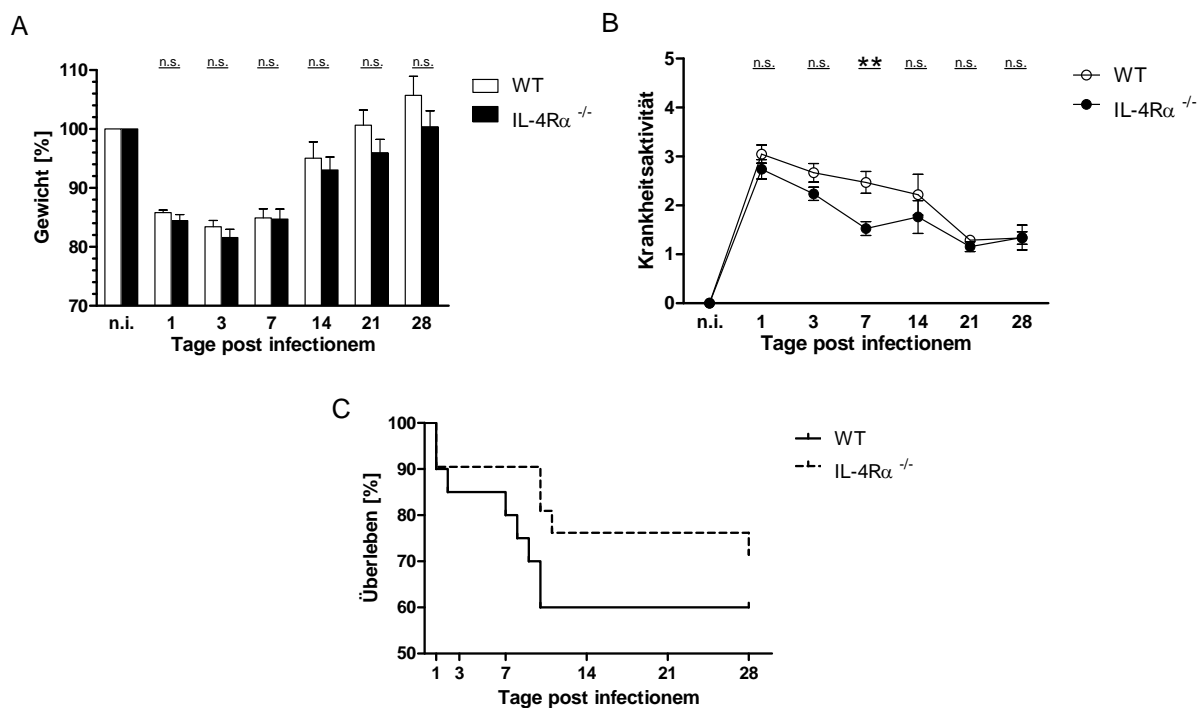


Abbildung 27: Klinischer Verlauf nach Infektion bei IL-4R α ^{-/-}-Mäusen. Prozentuales Gewicht (A), klinische Krankheitsaktivität (B) und prozentuale Überlebensrate (C) von WT- und IL-4R α ^{-/-}-Mäusen nach i.c. Injektion von *S. aureus*. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von anfänglich 20 Tieren. Die Abbildungen zeigen den charakteristischen Verlauf eines Experimentes von Tag 1 bis Tag 28 p.i. Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Wilcoxon Matched Pairs Test für den Gewichtsverlauf und die Krankheitsaktivität bzw. mit dem Mantel-Cox Test für die prozentuale Überlebensrate. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, n.s.= nicht signifikant.

Tage post infectionem	Krankheitsaktivität \pm SEM	Gewicht [%] \pm SEM
1	2,7 \pm 0,2	84,5 \pm 1,0
3	2,2 \pm 0,1	81,9 \pm 1,3
7	1,5 \pm 0,1	85,1 \pm 1,6
14	1,8 \pm 0,3	93,1 \pm 2,2
21	1,2 \pm 0,1	96,0 \pm 2,2
28	1,3 \pm 0,3	100,4 \pm 2,7

Tabelle 21: Kinetik der klinischen Krankheitsaktivität sowie des Gewichts bei infizierten IL-4R α ^{-/-}-Mäusen (n=15-20).

4.4.2 Einfluss der IL-4R α -Defizienz auf die Spätphase der Infektion

Der IL-4R α , als der gemeinsame Rezeptor für die Zytokine IL-4 und IL-13, ist essentiell für die funktionierende T_H2-Antwort sowie die konsekutive alternative Aktivierung von Makrophagen. Auch im Kontext mit Fibrose und Wundheilung wurde der IL-4R α bereits beschrieben (124,129,130). Daher verfolgten wir die Hypothese, dass es bei IL-4R α -defizienten Mäusen im T_H2-dominierten Spätstadium der Erkrankung zu einer spezifischen Veränderung der Immunreaktion, insbesondere bezüglich der Polarisierung und Funktion der Makrophagen und konsekutiv der Abszessmorphologie kommt. Wir konzentrierten uns daher auf die chronische Phase der Hirnabszessentstehung, exemplarisch dafür Tag 28 p.i..

4.4.2.1 Quantitative Bestimmung zerebraler Bakterien und Leukozyten

Entsprechend des klinischen Verlaufs, der bei den IL-4R α ^{-/-}-Mäusen milder war (jedoch hier nicht signifikant unterschiedlich), erbrachte die Quantifizierung des intrazerebralen Bakterienbefalls signifikant niedrigere Werte bei den Knockout-Mäusen. Die Leukozytenzahlen wiesen im Mittel keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und IL-4R α ^{-/-}-Mäusen auf, wenngleich auch hier ein Trend zu weniger Leukozyten bei IL-4R α -Defizienz zu erkennen war (Abbildung 28 A und B). Histologisch zeigten sich in Verteilung und Menge etwa vergleichbare Bilder grampositiver Staphylokokken im nekrotischen Zentrum an Tag 28 p.i. (Abbildung 29 A und B).

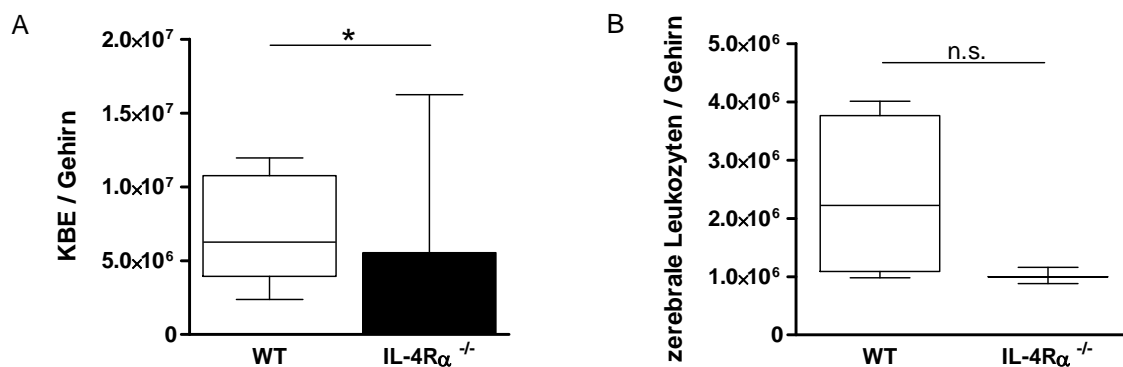


Abbildung 28: Vergleichende Kinetik der intrazerebralen Bakterien- und Leukozytenzahlen. Dargestellt sind die Bakterienzahl als KBE pro Gehirn (A) sowie die Leukozytenzahl pro Gehirn (B) bei WT- und IL-4R α ^{-/-}-Mäusen an Tag 28 nach i.c. Injektion von *S. aureus*. Jeder Boxplot repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 6 bis 8 Tieren pro Zeitpunkt. Die statistische Berechnung erfolgte mittels Mann-Whitney *U*-test. *= $p < 0.05$.

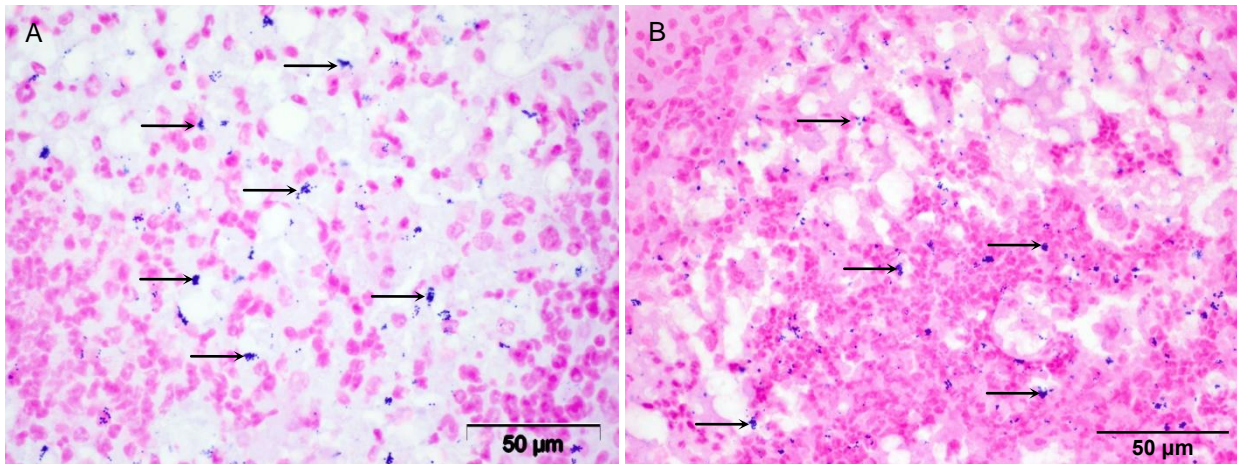


Abbildung 29: Gram-Färbung eines infizierten Gehirns einer WT- (A) bzw. einer IL-4R α ^{-/-}-Maus (B) an Tag 28 p.i. Die Pfeile zeigen Kolonien grampositiver Staphylokokken im Zentrum des Abszesses.

4.4.2.2 Abszessmorphologie und spezifische Mechanismen der Kapselbildung bei IL-4R α -Defizienz

Basierend auf der Beobachtung eindeutig nachgewiesener Rollen von IL-4R α -abhängigen Zytokinen und Chemokinen für die Kapselbildung zeigten sich interessante lichtmikroskopisch detektierbare Unterschiede der Abszessmorphologie in beiden untersuchten Genotypen.

Grundsätzlich konnte der charakteristische Aufbau des Abszesses insbesondere mit Kapselbildung auch regelmäßig bei allen IL-4R α ^{-/-}-Mäusen gefunden werden. Im chronischen Stadium, an Tag 28 nach der intrazerebralen Infektion mit *S. aureus*, zeigte sich ein deutlich durch eine fibröse Kapsel demarkierter Abszess mit einem nekrotischen Zentrum (Abbildung 30 und 33). Die Verteilung von CD11b⁺- bzw. F4/80⁺-Leukozyten glich dem Befund bei den WT-Mäusen ebenso wie die Anfärbung von iNOS⁺-Zellen (Abbildung 31 und 32). Insbesondere das Vorhandensein von CD206-exprimierenden alternativ aktivierten Makrophagen (M2), die assoziierte Kollagenkapsel sowie die Neovaskularisation (dargestellt mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung von CD31 und VEGF-A) stellten sich nicht wesentlich anders als in der WT-Maus dar (Abbildung 32 - 35). Man erkennt jedoch in der Färbung für F4/80 und für CD206, dass die schaumzelligen Makrophagen bei IL-4R α -defizienten Tieren deutlich großvolumiger als bei WT-Mäusen sind (Abbildung 31, 32 und 34). Zudem ließen sich die CD4⁺-T_H2-Zellen in weit geringerer Anzahl anfärben als bei den WT-Mäusen (Abbildung 31).

Die Tatsache, dass F4/80⁺-Makrophagen, trotz IL-4R α -Defizienz, CD206 exprimieren, verdeutlicht, dass die Ausbildung von Markern alternativer Aktivierung nicht ausschließlich über IL-4R α vermittelt wird, oder dass CD206 kein Marker ist, der

ausschließlich alternative Aktivierung anzeigt. In der Doppelimmunfluoreszenz kommen ebenfalls die großvolumigen Makrophagen und ihre Doppelfärbung mit CD206 zur Darstellung (Abbildung 34). Die Doppelfärbung von CD31 (Endothelien) und VEGF-A illustriert eine enge Assoziation (jedoch keine eindeutige Kolo-kalisation) in der unmittelbaren Nähe des Abszesszentrums bei WT- und IL-4R α -defizienten Tieren. Bei Letzteren fällt auf, dass die Fibroblasten der Kapsel deutlich schwächer VEGF-A exprimieren und eher kleinen Zellen mit diffuser und schwacher Färbereaktion entsprechen, während WT-Mäuse große rundlich elongierte VEGF-A-positive Fibroblasten in der breiten Abszesskapsel aufweisen (Abbildung 35). In der Doppelfärbung für F4/80 und VEGF-A zeigt sich wiederum, dass diese Zellen nicht Makrophagen entsprechen (sondern, dass es sich tatsächlich um Fibroblasten handelt). Außerdem wird auch hier deutlich, dass sich bei den WT-Mäusen die klein- bis mittelgroßen Makrophagen unter den Fibroblasten in der Kapsel befinden und sie sich miteinander „vermischen“, so dass sie zum zellulären Aufbau der Kapsel beitragen. Bei KO-Mäusen sind die Makrophagen wiederum größer, aber die Fibroblasten sind umgekehrt viel kleiner. Die Kapsel bei IL-4R α -defizienten Mäusen wird aus diesen kleinen, eng beieinander liegenden Zellen (Fibroblasten) gebildet, während die großvolumigen Makrophagen an der Innenseite der Kapsel verbleiben und nicht zum zellulären Aufbau der Kapsel beitragen (Abbildung 34).

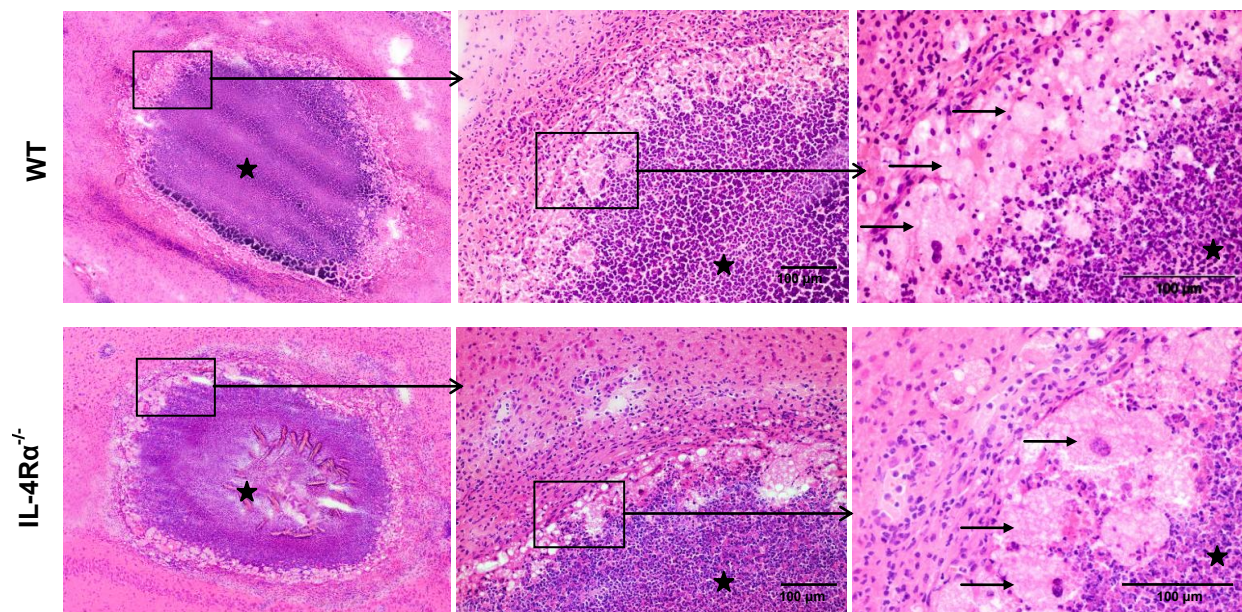


Abbildung 30: Vergleich der generellen Abszessmorphologie bei einer WT- bzw. einer IL-4R α ^{-/-}-Maus I. Dargestellt ist der Hirnabszess in der H&E-Färbung an Tag 28 p.i. in 40-facher Vergrößerung sowie exemplarische Ausschnitte in 200-facher und 400-facher Vergrößerung. Bei beiden Genotypen zeigt sich in der chronischen Phase ein klar abgegrenzter Abszess mit Einwanderung großvolumiger Makrophagen (Pfeile), in einer ringartigen Verteilung um das Abszesszentrum (Stern).

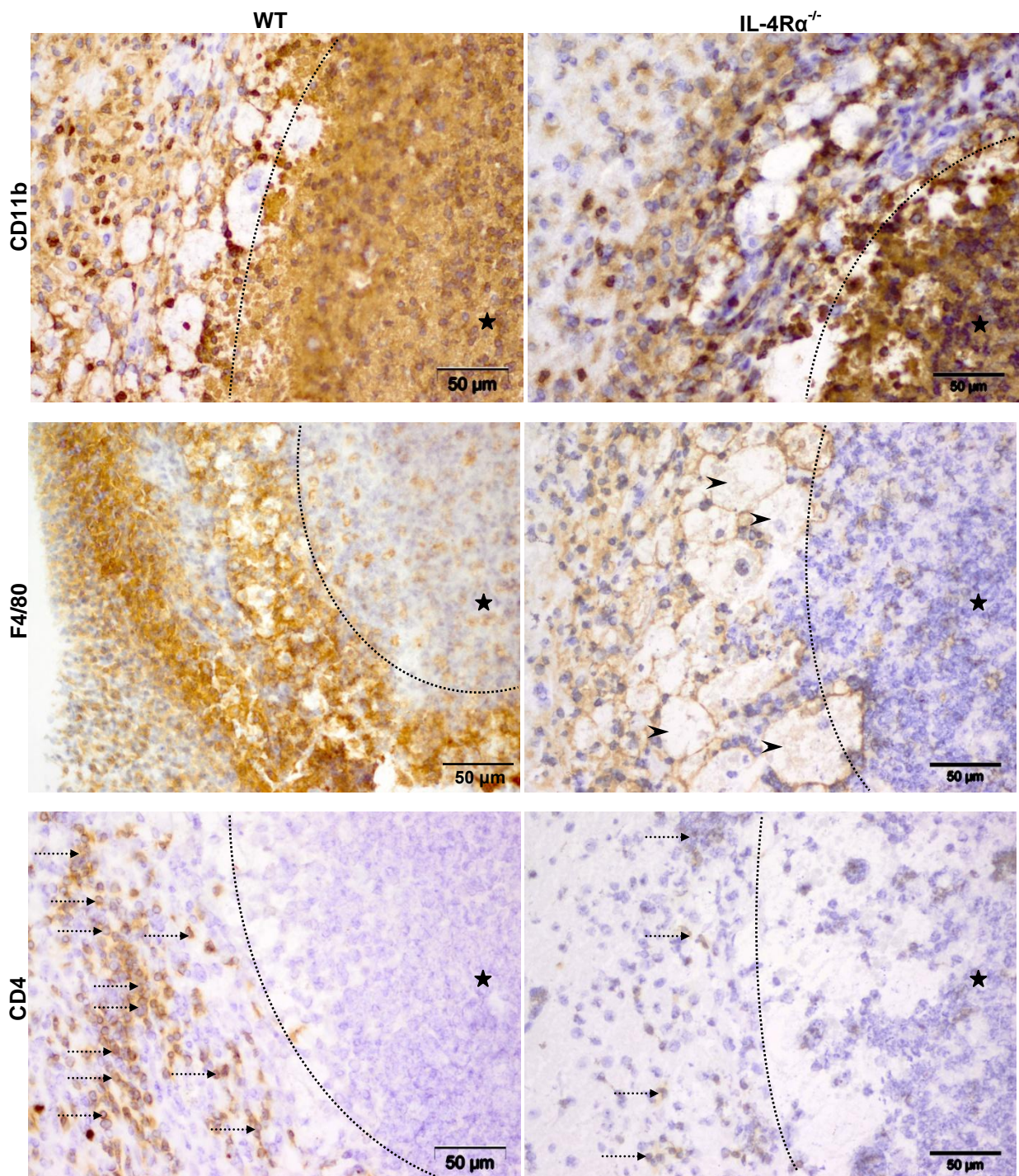


Abbildung 31: Vergleich der generellen Abszessmorphologie bei einer WT- und einer IL-4R α ^{-/-}-Maus II. Zu erkennen ist die Morphologie, Häufigkeit und Lokalisation von CD11b- bzw. F4/80-exprimierenden Zellen in beiden Genotypen. Auffällig sind die deutlich großvolumigeren Makrophagen (kurze Pfeile) sowie ein reduziertes Auftreten CD4⁺-T-Zellen (lange Pfeile) bei der IL-4R α ^{-/-}-Maus im Vergleich zur WT-Maus. Alle Färbungen wurden an Tag 28 p.i. durchgeführt. Die Sterne markieren das Abszesszentrum.

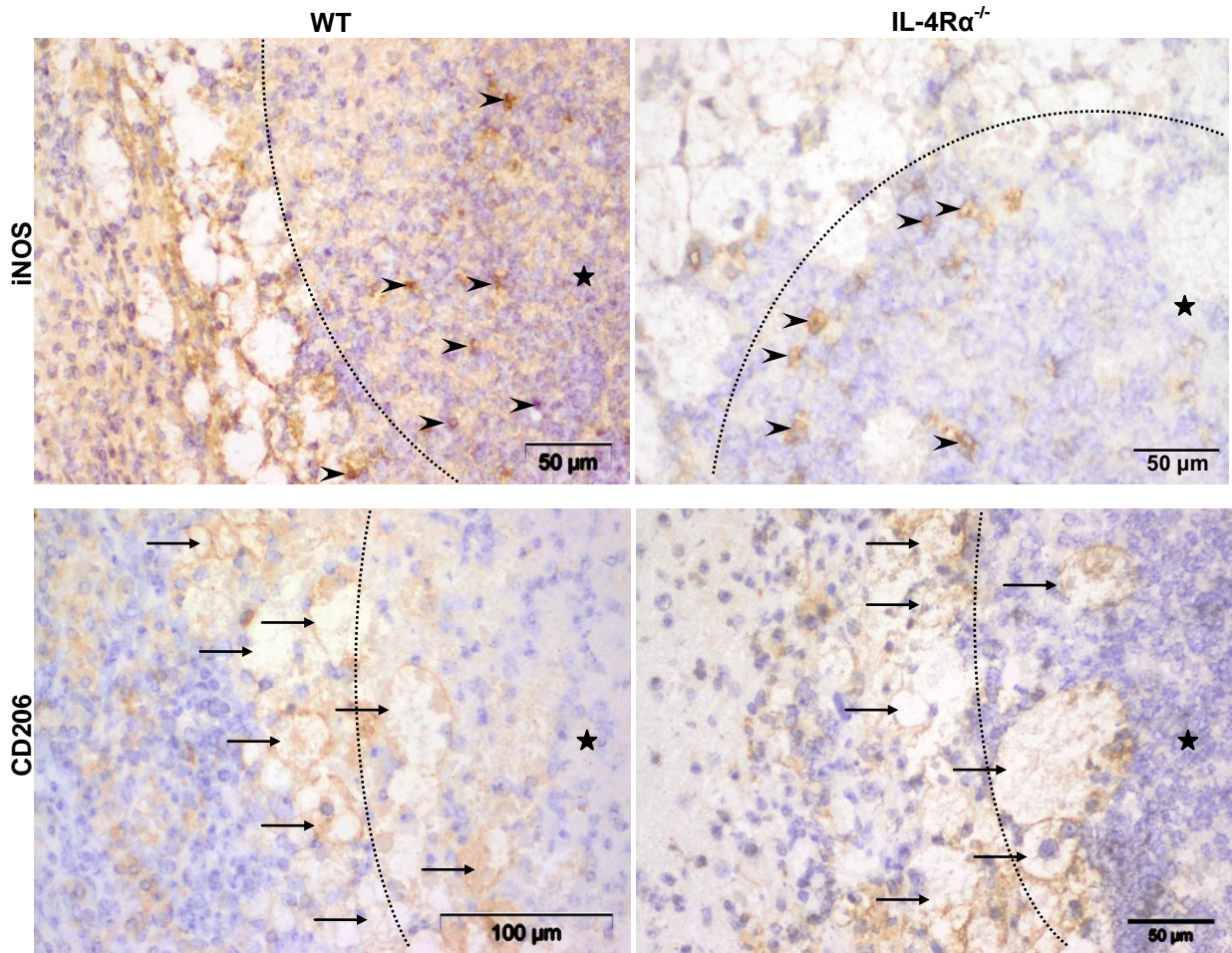


Abbildung 32: Vergleich der generellen Abszessmorphologie bei einer WT- und einer IL-4Rα^{-/-}-Maus III. Zu erkennen ist die Morphologie, Häufigkeit und Lokalisation von iNOS- (kurze Pfeile) und CD206-positiven (lange Pfeile) Zellen in beiden Genotypen. Alle Färbungen wurden an Tag 28 p.i. durchgeführt. Die Sterne markieren das Abszesszentrum.

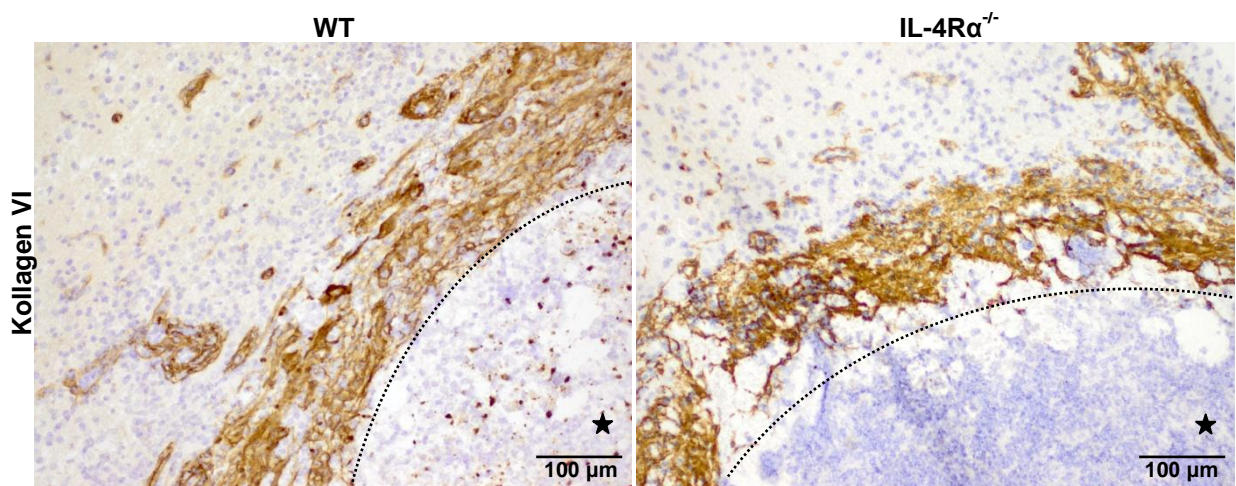


Abbildung 33: Vergleich der generellen Abszessmorphologie bei einer WT- und einer IL-4Rα^{-/-}-Maus IV. Zu erkennen ist die Architektur der Kollagenkapsel an Tag 28 p.i. in beiden Genotypen. Die Sterne markieren das Abszesszentrum.

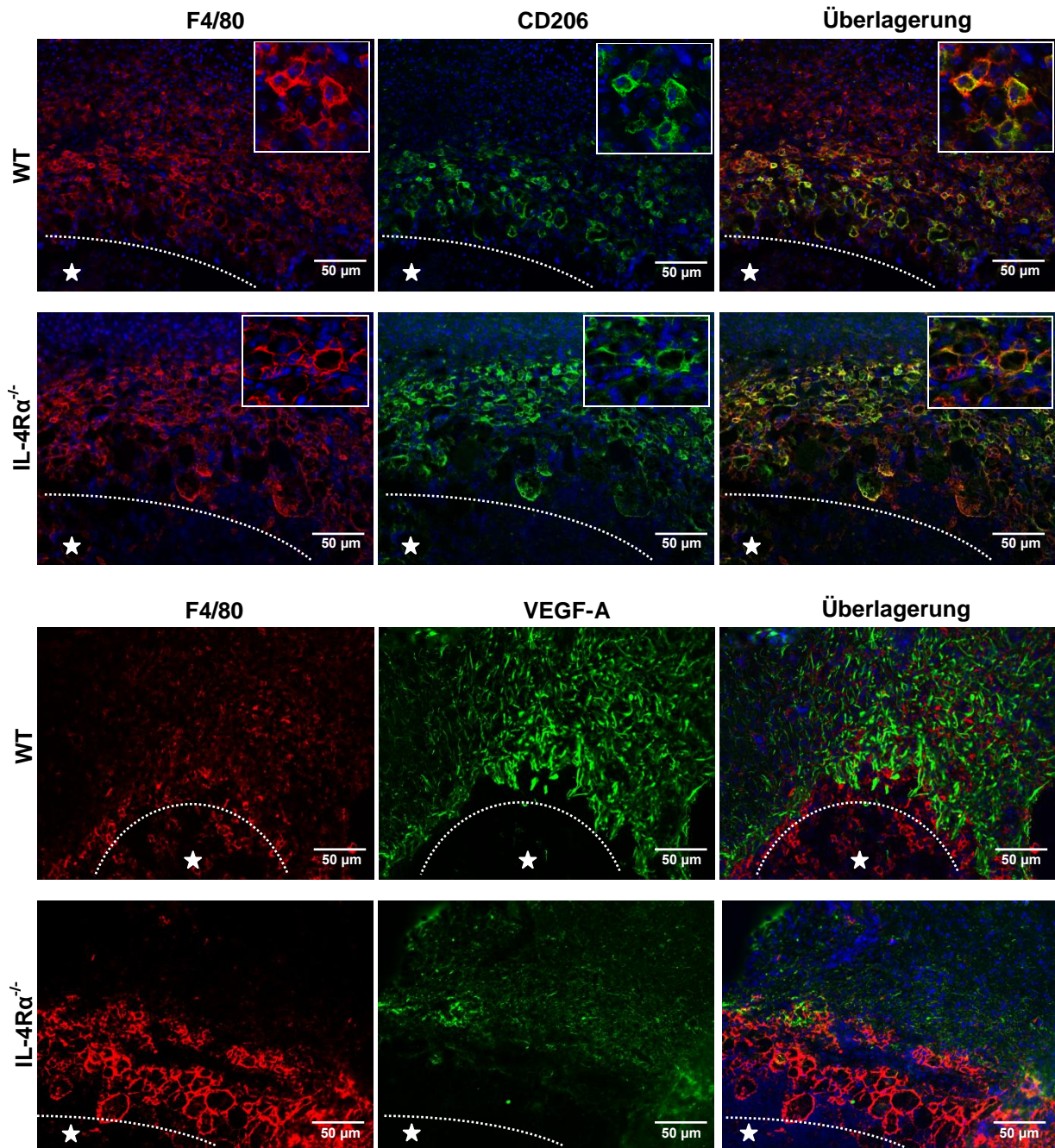


Abbildung 34: Vergleich der generellen Abszessmorphologie bei einer WT- und einer IL-4Rα^{-/-}-Maus V. Die Abbildung zeigt die Doppelimmunfluoreszenzfärbung von F4/80 (DyLight 649, rot) und CD206 (Cy3, grün) bzw. VEGF-A (Cy3, grün) und DAPI, zur Darstellung der Zellkerne (blau), an Tag 28. p.i. in beiden Genotypen. Die Sterne markieren das Abszesszentrum.

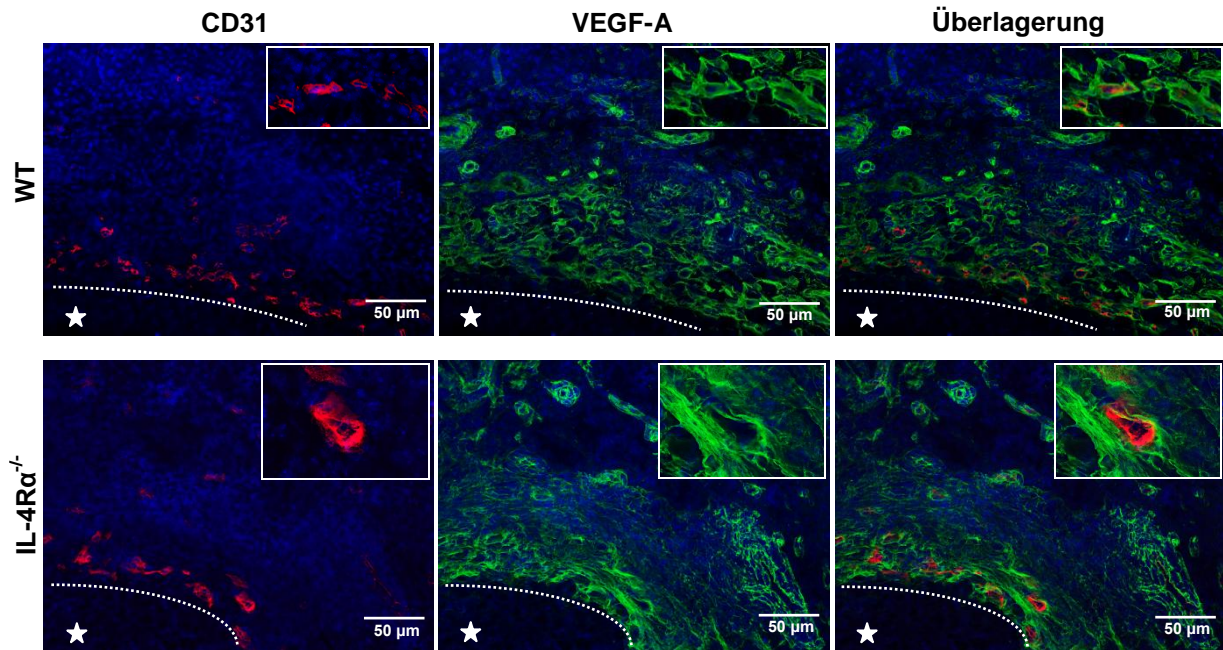


Abbildung 35: Vergleich der generellen Abszessmorphologie bei einer WT- und einer IL-4Rα^{-/-}-Maus VI. Die Abbildung zeigt die Doppelimmunfluoreszenzfärbung von CD31 (DyLight 649, rot) und VEGF-A (Cy3, grün) und DAPI, zur Darstellung der Zellkerne (blau), an Tag 28. p.i. in beiden Genotypen. Die Sterne markieren das Abszesszentrum.

Zusammengefasst kann man festhalten, dass bei IL-4Rα-Defizienz die Morphologie und die Lokalisation/Position von Makrophagen und Fibroblasten alteriert wird, wenngleich grundsätzlich eine Kapselbildung im Spätstadium möglich ist. Rein morphologisch und aufgrund des hier gezeigten Färbeverhaltens kann daher vermutet werden, dass sich Makrophagen und Fibroblasten bei IL-4Rα-Defizienz gegensätzlich verhalten: Makrophagen werden großvolumig, verbleiben lokal am Nekroserand und nehmen nicht am eigentlichen Aufbau der fibrösen Kapsel teil, während Fibroblasten kleinvolumig sind. Außerdem lassen sich Makrophagen mit CD206 markieren, sodass die Signalkaskade über IL-4Rα keine notwendige Voraussetzung für die Expression dieses makrophagozytären Aktivierungsmarkers ist.

4.4.2.3 Makrophagenpolarisation bei IL-4Rα-Defizienz

Im nächsten Schritt haben wir die Zytokinprofile und damit den Aktivierungszustand der Makrophagen im Kontext der IL-4Rα-Defizienz untersucht. Erwartungsgemäß konnte bei IL-4Rα^{-/-}-Mäusen keine Expression von *Il4ra* nachgewiesen werden (Abbildung 36).

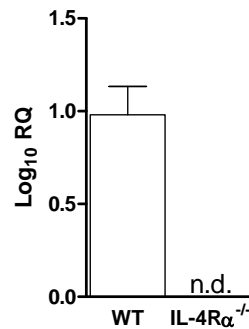


Abbildung 36: Vergleichende Expression des IL-4-Rezeptors. Logarithmische Darstellung der relativen Genexpression ($\Delta\Delta Ct$ -Methode) von *Il4ra* an Tag 28 p.i. bei WT- bzw. IL-4R α -defizienten Mäusen, gemessen mittels qPCR. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 5 Tieren.

Wie durch die vorherigen Experimente bestätigt, dominiert die T_H2/M2-Antwort die chronische Phase der Hirnabszessentwicklung bei der WT-Maus und führt zur entscheidenden Zytokin- und Chemokinbildung für die überlebenswichtige Abkapselung des Abszesses.

Bei der vergleichenden Untersuchung der Zytokin- und Chemokinexpression bei WT- sowie IL-4R α ^{-/-}-Mäusen 28 Tage nach der Infektion konnten wir eine verminderte Genexpression der IL-4R α -Liganden *Il13* und *Il4* sowie des weiteren T_H2-Zytokins *Il5* feststellen, wobei die Herabregulation von *Il13* und *Il5* statistisch signifikant war (Abbildung 37 A). Übereinstimmend mit dem histologischen Befund zeigte sich also für die genannten relevanten Zytokine eine reduzierte Antwort der CD4-positiven T_H2-Zellen. Der Knockout des IL-4-Rezeptors hatte demgegenüber keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Expression des assoziierten Transkriptionsfaktors *Stat6* (Abbildung 37 B). Bezüglich der untersuchten M2- und Fibrose-assoziierten Mediatoren fanden wir ein heterogenes Bild: Während *Tgfb1*, *Il10* und *Ccl17* auf einem signifikant reduzierten Level exprimiert wurden, konnten wir keinen signifikanten Unterschied bei der Expression von *Mrc1* (CD206), *Clec10a* (CD301), *Chi3l3* (Ym1) und *Arg1* in den beiden verschiedenen Genotypen nachweisen, obwohl durchaus eine Tendenz zu einer geringeren Expression bei den IL-4R α -defizienten Mäusen bei allen genannten Markern gegeben war (Abbildung 37 C).

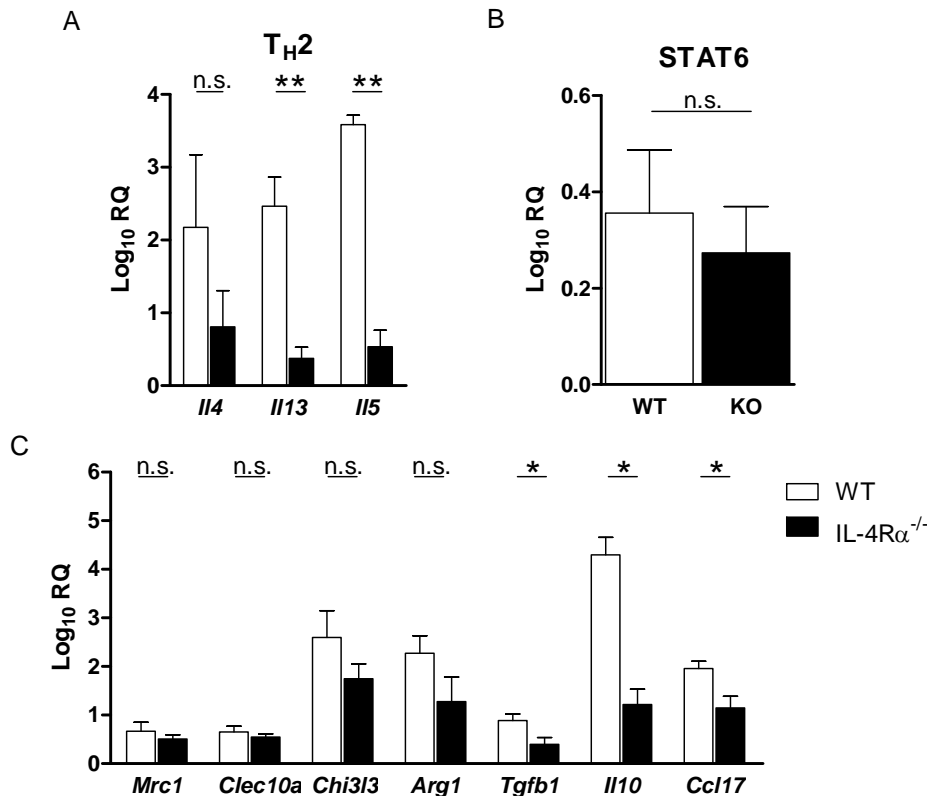


Abbildung 37: Einfluss der IL-4R-Defizienz auf die Immunantwort in der Spätphase der Infektion. Abgebildet ist die logarithmische Darstellung der relativen Genexpression der TH₂- (A) und M2- bzw. fibroseassoziierten Mediatoren (C) sowie von *Stat6* (B) an Tag 28 p.i. bei WT- bzw. IL-4R α -defizienten Mäusen, gemessen mittels qPCR ($\Delta\Delta C_t$ -Methode). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 5 Tieren. Die statistische Berechnung erfolgte mittels Mann-Whitney *U*-test. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$.

4.4.3 Potentielle IL-4R α -unabhängige Immunregulationsmechanismen

Der Fakt, dass es trotz Abwesenheit des IL-4R α und signifikanter Herabregulation von TH₂- und fibroseassoziierten Zytokinen und Chemokinen zu einer Kapselbildung (wenngleich mit differentem architektonischen Aufbau) kam, könnte durch Aktivierung von kompensatorischen Signalwegen erklärt werden. Diese könnten beispielsweise ihrerseits durch Bildung von Arginase und/oder CD206 zur Aktivierung von M2-Makrophagen und zur Bildung der Kollagenkapsel beitragen.

In einem zweiten Schritt analysierten wir daher die aktuell bekannten weiteren Aktivierungsmechanismen, die in diesem Kontext eine Rolle spielen könnten. Hierbei handelte es sich im Einzelnen um den hochaffinen IL-13-Rezeptor IL-13R α 2, der im Gegensatz zum Typ II IL-4-Rezeptor (wird gebildet aus der IL-13R α 1-Untereinheit und IL-4R α ; siehe Einleitung) nur IL-13 und nicht IL-4 bindet, den IL-10R-, den IL-17A/IL-17R α - sowie den TLR/MyD88-Signalweg.

Für *Il17a* zeigte sich eine signifikant reduzierte Genexpression bei $IL-4R\alpha^{-/-}$ -Mäusen. Bei der Genexpression von *Il13ra2*, *Il10r*, *Il17ra*, *Tlr2* und *Myd88* stellten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und $IL-4R\alpha^{-/-}$ -Mäusen fest (Abbildung 38).

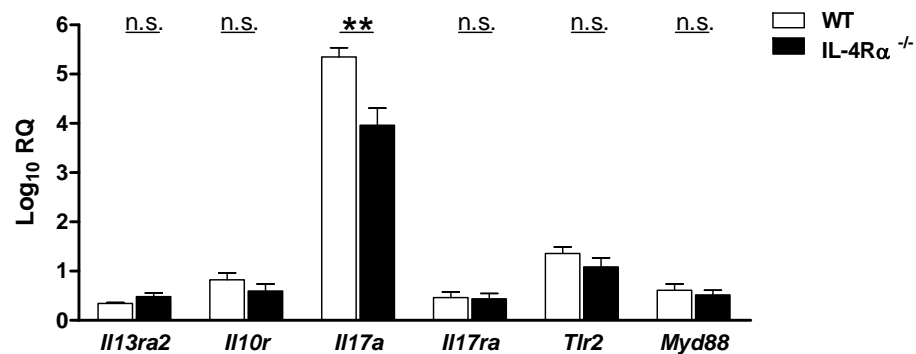


Abbildung 38: Regulation potentieller alternativer Signalwege bei $IL-4R\alpha$ -Defizienz. Abgebildet ist die logarithmische Darstellung der relativen Genexpression von *Il13ra2*, *Il10r*, *Il17a*, *Il17ra*, *Tlr2* und *Myd88* an Tag 28 p.i. bei WT- bzw. $IL-4R\alpha$ -defizienten Mäusen, gemessen mittels qPCR ($\Delta\Delta Ct$ -Methode). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert mit SEM von 5 Tieren. Die statistische Berechnung erfolgte mittels Mann-Whitney *U*-test. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$.

5 DISKUSSION

Neben der Untersuchung der Erkrankung des Hirnabszesses als zerebrale Infektion an sich eignet sich das Modell des murinen *S. aureus*-induzierten Hirnabszesses besonders gut um die Immunantwort im Verlauf einer Entzündungsreaktion des zentralen Nervensystems mit Akutphase und chronischer Phase exakt zu charakterisieren. Insbesondere die Interaktion verschiedener beteiligter Zellpopulationen im Rahmen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr sowie die zugrunde liegenden Signaltransduktionswege und Mediatoren konnten durch Einsatz verschiedener experimenteller Methoden genauer beleuchtet werden.

Bisher durchgeführte Studien am Modell des bakteriell induzierten zerebralen Hirnabszesses konzentrierten sich vornehmlich auf die proinflammatorischen Mechanismen der frühen Krankheitsphase mit Fokus auf Granulozyten und T-Zellen (31-39). Demgegenüber ist noch recht wenig über die genauen Vorgänge, die zur Entstehung der Abszesskapsel und ihres architektonischen Aufbaus im späteren Verlauf der Erkrankung führen, bekannt. In einer Vorarbeit aus unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass bestimmte Makrophagen mit einem speziellen funktionellen Spektrum (sog. M2-Makrophagen) an der Kapselbildung beteiligt waren (s.u.). In dem Zusammenhang untersuchten wir erstmals die Rolle des T_H2 /M2-assoziierten IL-4-Rezeptors, d.h. die Auswirkung dessen funktionellen Knockouts, auf diesen überlebenswichtigen Prozess.

Grundsätzlich konnten wir zwar eine initiale effektive Erregerbekämpfung mit einer konsekutiven nahezu vollständigen klinischen Genesung der infizierten Mäuse, die Hirnabszesse ausgebildet hatten, feststellen. Dennoch konnten bis ins Spätstadium noch messbare Mengen von *S. aureus* nachgewiesen werden. Als Reaktion auf die persistierend inkomplette und somit nicht „sterile“ Elimination des Erregers initiierte das Immunsystem eine „alternative“ Antwort in Form der fibrösen Abkapselung der chronischen fokalen Entzündung.

Der Fokus unserer Studie lag zunächst darauf, den molekularen Phänotyp der Makrophagen in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt und den ursächlichen Aktivierungsmechanismen durch beteiligte Zellpopulationen, Zytokine und Chemokine

zu verstehen und genau zu charakterisieren. Darüber hinaus geben unsere Ergebnisse einen Einblick in die Mechanismen der kontrollierten fibrösen Kapselbildung im ZNS.

Zunächst zeigte sich eine frühe Hochregulation proinflammatorischer T_H1 -assoziierter Mediatoren durch eingewanderte Leukozyten und Lymphozyten sowie eine darauffolgende Aktivierung z.B. iNOS-exprimierender und damit bakterizider sogenannter „M1“-Makrophagen in der Akutphase als Reaktion auf die bakterielle Infektion. Insofern konnten frühere, in der eigenen Arbeitsgruppe erhobene Daten bestätigt und erweitert werden. In dem sich anschließenden Übergang zur chronischen Phase kam es grundsätzlich zu einem „Switch“ der Immunantwort hin zu einer $T_H2/M2$ -Polarisation mit Induktion antiinflammatorischer, profibrotischer Faktoren durch spezielle T_H -Zellen und Makrophagen. In der Folge bildete sich eine dichte Kollagenkapsel mit eingebetteten sogenannten „alternativ aktivierten Makrophagen“ (M2) in Abgrenzung zum gesunden Gehirnparenchym.

In einem zweiten Schritt ging es darum neue Erkenntnisse über den genauen Vorgang der Abkapselung des akuten Entzündungsprozesses zu gewinnen. Explizit wurde der Einfluss des IL-4-Rezeptors auf die chronische Phase der Hirnabszessentwicklung untersucht und dort insbesondere auf die Polarisation der Makrophagen und die Entstehung einer fibrösen Kapsel fokussiert. Hier deutete sich, in größerem Maße als erwartet, eine IL-4R α -unabhängige Aktivierung alternativer Makrophagen bzw. Hochregulation M2-assoziierter Mediatoren mit funktionierender Kapselbildung an, wenngleich sich histologische Unterschiede in Form einer architektonisch anders aufgebauten Kapsel, insbesondere bezüglich Makrophagen und Fibroblasten, zeigten.

5.1 Makrophagenpolarisation im Verlauf der Hirnabszessentwicklung

Viel diskutiert, und von hoher Aktualität, ist das Konzept der unterschiedlichen Makrophagenaktivierung und deren distinkter Einfluss auf die Immunregulation. Dieser wurde bereits in zahlreichen Modellen und in der humanen Situation bei verschiedenen Krankheiten untersucht (74,84,86,92,99,122,124) (siehe auch Einleitung) und ist nach heutigem Kenntnisstand als ein mehrdimensionales Phänomen zu interpretieren. Kurz gesagt, Makrophagen sind vielschichtig prägnant und erfüllen ganz distinkte, hoch spezialisierte Aufgaben entsprechend den lokalen und systemischen Erfordernissen.

Bezug nehmend auf unser bakterielles Infektionsmodell lautete die erste Hypothese dieser Arbeit daher:

Im Verlauf der Hirnabszessentwicklung sind verschiedene Makrophagen-Subpopulationen aktiv, die ein definiertes Markerprofil aufweisen und spezifische Funktionen besitzen.

Wir konnten zeigen, dass es in der Akutphase, nach bakterieller Infektion durch *S. aureus*, zu einer Hochregulation proinflammatorischer Mediatoren kam. Als dominierende Zellpopulation kristallisierten sich neben Granulozyten (28,31,34,35,40) Makrophagen und Mikroglia heraus. Trotz erst verzögerter Einwanderung CD4-positiver Lymphozyten produzierten diese vorrangig IFN- γ , welches als eines der Schlüsselzytokine der T_H1-Antwort gilt und als entscheidend für eine nachfolgende klassische Aktivierung von Makrophagen beschrieben wurde (19,23,41,77). Dass der M1-Phänotyp der Makrophagen die Frühphase der zerebralen Entzündungsreaktion nach Infektion mit *S. aureus* dominiert, konnten wir auch durch die deutliche Induktion von iNOS, gemessen mittels qPCR sowie erkennbar in der immunhistologischen Färbung, insbesondere durch Kolo-kalisation des Makrophagenmarkers F4/80 mit iNOS, nachweisen. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit Fokus auf der Frühphase der Hirnabszessentstehung unterstützen die vorliegenden Ergebnisse und zeigen eine maximale Expression von proinflammatorischen T_H1/M1-assoziierten Mediatoren wie IL-12, IFN- γ , TNF- α und iNOS bereits 24h nach der erfolgten Infektion, ein Zeitpunkt, den wir in unserer Studie mit Schwerpunkt auf der chronischen Abszessphase nicht untersuchten (34,35,38,40). Aufgrund der durch das Enzym iNOS vermittelten Produktion von NO und nachfolgend reaktiver Sauerstoffspezies scheinen die via IL-12, IFN- γ und TNF- α induzierten M1-Makrophagen in unserem Modell wie erwartet hauptsächlich bakterizide Aufgaben zu übernehmen. Dies lässt auch deren vorrangige Lokalisation im Abszesszentrum in direkter Nähe zu den Bakterien vermuten. Damit übereinstimmend wurde der T_H1/M1-Regulationsweg über IL-12/IFN- γ /NO als entscheidender Mechanismus für die Abwehr intrazellulärer Erreger wie Listerien und Mykobakterien, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* oder *Trypanosoma cruzi* sowie im Rahmen viraler Infektionen beschrieben (51,100).

Im weiteren Verlauf der Hirnabszessentwicklung detektierten wir einen Anstieg der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 sowie erwartungsgemäß eine konsekutive Hochregulation der

Marker alternativer Aktivierung wie CD206, CD301, Ym1 und CCL17 auf mRNA-Ebene. Dies scheint eine regulatorische Reaktion des Immunsystems auf die anfängliche T_H1-Antwort zu sein, wie sie schon häufig, vor allem im Rahmen chronischer Entzündungen und z.B. bei pulmonaler Fibrose bestätigt wurde (51,116,129).

Trotz anfangs erst verzögert detektierbarer Mengen von IL-4 reicht diese aus, um, gemeinsam mit IL-13, eine T_H2-Antwort zu induzieren (124). Auch dass IL-13, wie von uns in der Akutphase gemessen, in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden ist als IL-4, wurde bereits in der Literatur in einem anderen Kontext beschrieben (129).

Mittels immunhistochemischer Färbung konnten ab Tag 14 p.i. großvolumige CD206⁺-Makrophagen nachgewiesen werden, die einen dichten Ring um das Abszesszentrum bildeten. Auch dies bestätigt frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (39).

Obwohl wir histologisch anhand ihrer spezifischen Morphologie, ihrer Lokalisation und ihres Expressionsmusters eindeutig iNOS-positive M1-Makrophagen bzw. CD206-positive M2-Makrophagen unterscheiden konnten und ein Stadien- und Zeitpunkt-abhängiges tendenzielles Überwiegen der T_H1/M1- bzw. T_H2/M2-Immunantwort nachweisbar war, fanden wir auf mRNA-Ebene sich deutlich überlappende Expressionen der verschiedenen Marker klassischer bzw. alternativer Aktivierung an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. So detektierten wir durchaus hohe Level der T_H1-Mediatoren bis in die Spätphase der Abszessentwicklung sowie eine schon frühe Induktion diverser M2-assoziiertes Marker wie Arginase-1, Ym1, IL-10 und TGF- β . Im gleichen Krankheitsmodell wiesen auch Aldrich und Kielian histologisch eine Koexpression von iNOS und Arginase-1 in Makrophagen nach (143). Dieses Ergebnis stützt die schon mehrfach beschriebene Annahme, dass sich Makrophagen nicht, wie oft deklariert, zu jeder Zeit genau einem spezifischen Phänotyp zuordnen lassen, sondern vielmehr eine phänotypische Plastizität aufweisen, die es ihnen ermöglicht auf unterschiedliche Stimuli zu reagieren, auch nachdem sie bereits einen Aktivierungszustand eingenommen haben (146,84).

Untersuchungen im Zusammenhang mit sogenannten Wundheilungsmakrophagen, die ursprünglich den alternativ aktivierten Makrophagen gleichgesetzt wurden (84), bestätigten einen komplexen Phänotyp der Makrophagen mit paralleler Expression von Merkmalen klassischer und alternativer Aktivierung (137,147). Damit übereinstimmend beschrieben El Kasmi und Kollegen eine Arginase-Produktion durch M1-Makrophagen als frühzeitige Reaktion auf das intrazelluläre Pathogen *Mycobacterium bovis* (101).

Auch im Kontext der pulmonalen Kryptokokkose konnte gezeigt werden, dass es bei simultaner Stimulation der Makrophagen mit IFN- γ und IL-4 *in vitro* zur Ausbildung von polyfunktionalen Makrophagen mit simultaner Expression von Arginase-1 und iNOS kommt (148).

Darüber hinaus bleibt die eindeutige funktionelle Zuordnung der Zytokine IL-10 und TGF- β unklar. Diesen wurden je nach Infektionsmodell und produzierendem Zelltyp T_H2/M2-assoziierte profibrotische und antifibrotische, immunregulatorische Eigenschaften zugewiesen (129,84,128). In unserer Studie zeigten sich beide Zytokine von Beginn an stark reguliert mit maximaler Expression an Tag 28 p.i..

Abgesehen von der allgemeinen Herausforderung, die Makrophagen aufgrund ihrer wahrscheinlichen funktionellen Plastizität klar einzuordnen, wird aktuell zudem das generelle Konzept der Makrophagen-Nomenklatur kontrovers diskutiert. So werden die Begriffe M1/M2 (a,b,c), klassische bzw. alternative Aktivierung oder Wundheilungs- versus immunregulatorische Makrophagen z.T. synonym, z.T. aber auch konträr verwendet (74,84,86,147,149,150). In einem kürzlich publizierten Konsensuspaper weisen die Autoren darauf hin, dass trotz diskutierter nomenklatorischer Kontroversen die funktionelle Diversität von Makrophagen durchaus weiter im Zentrum wissenschaftlicher Bemühungen sein sollte (149). Wünschenswert wäre es eine einheitliche Nomenklatur zu finden, um eine eindeutige Zuordnung der untersuchten Makrophagenpopulation in funktionelle Phänotypen zu ermöglichen und damit eine studienübergreifende Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Zusammenfassend zeigten sich in unserem Modell *in vivo*, anders als ursprünglich vermutet, also ebenfalls Makrophagen mit einem eher gemischten funktionellen Phänotyp, d.h. diese exprimieren offenbar M1- und M2-Charakteristika parallel bzw. unterliegen einer funktionellen Plastizität in Abhängigkeit des lokalen Zytokin- und Chemokinmilieus. Außerdem haben wir illustriert, dass M1- und M2-Makrophagen durchaus an einem und demselben Zeitpunkt, aber in unterschiedlichen Lokalisationen (im Abszesszentrum eher „M1“ und in der Abszesskapsel eher „M2“) existieren.

In diesem Zusammenhang muss allerdings festgehalten werden, dass eine eindeutige Zuordnung aller einzelnen Mediatoren zum produzierenden Zelltyp nicht gelang, da bei unseren durchflusszytometrischen Messungen nicht genügend Zellen gewonnen werden konnten, um das Zytokin- und Chemokin-Expressionsmuster der einzelnen

Zellpopulationen mittels Zellsortierung differenziert zu analysieren. Eine unmissverständliche Einordnung der gefundenen Mediatoren in eine spezifische Makrophagenpopulation gelang daher nicht. Entsprechende zusätzliche Experimente könnten diesbezüglich in Zukunft genauere Erkenntnisse liefern, genauso wie der Knockout von Markern alternativer Aktivierung isoliert auf Makrophagen (wie z.B. bei den von Brombacher und seiner Arbeitsgruppe verwendeten $\text{LysM}^{\text{cre}}\text{II4ra}^{-\text{flox}}$ -Mäusen) (109,123,151,152) oder der Einsatz von beispielsweise STAT6- oder Arginase-1-defizienten Mäusen.

5.2 Der Einfluss der $T_H2/M2$ -Antwort auf den Krankheitsverlauf und die Kapselbildung

Nach Betrachtung der Makrophagenpopulationen und ihres Mediatorenprofils stellten wir uns die Frage, welche Rolle die M2-Makrophagen für den Krankheitsverlauf im Rahmen der Hirnabszessentwicklung spielen. Dazu stellten wir die Hypothese auf, dass *die Differenzierung zu M2-Makrophagen im Spätstadium der Abszessentwicklung an der Bildung einer fibrösen Kapsel beteiligt ist, die für das Überleben der infizierten Maus entscheidend ist.*

Kommt es nach einem Gewebsschaden nicht zu einer erfolgreichen Wundheilung mit Wiederherstellung der ursprünglichen Organfunktion, sondern zu einer chronischen Entzündungsreaktion, leitet das Immunsystem zusammen mit den jeweiligen Zellen des Parenchyms betroffener Organe einen „alternativen“ Heilungsprozess mit Einsprossen von Fibroblasten und Extrazellulärmatrix ins Parenchym ein. Dieser Vorgang entspricht in unserem Modell der Bildung einer fibrösen Kapsel, deren Existenz mittels z.B. EvG Färbung (hier nicht dargestellt) oder immunhistochemischer Anfärbung von Kollagen IV und VI nachgewiesen werden kann. Als wesentlicher Vermittler einer Fibrose wurde bisher die T_H2 -Immunantwort beschrieben und deren Auswirkung mit nachfolgender alternativer Aktivierung von Makrophagen vor allem in chronischen Erkrankungen, insbesondere im Rahmen von Wurm- und Pilzkrankungen sowie Allergien und Asthma untersucht, jedoch weniger im Rahmen lokaler bakterieller Infektionen (124,126,128,153,154).

Da es in unserem Modell zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion im Verlauf kam, vermuteten wir einen Wechsel der frühen T_H1 -Immunantwort hin zu einem antiinflammatorischen T_H2 -assoziierten Wundmilieu. Damit übereinstimmend zeigte sich

sowohl in den vorliegenden als auch früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe eine Hochregulation T_H2 -assoziierter Zytokine und Chemokine parallel zu einem Anstieg von Markern der alternativen Aktivierung von Makrophagen in der chronischen Phase der Hirnabszessentwicklung (39). Der Nachweis der Makrophagenpolarisation hin zu einem sogenannten alternativen Phänotyp gelang mittels Bestimmung der Genexpression relevanter Marker der alternativen Aktivierung sowie histologischen Untersuchungen.

Um einen Zusammenhang zwischen der T_H2 /M2-Antwort und der fibrösen Kapselbildung herzustellen, untersuchten wir Mechanismen, die mutmaßlich durch M2-Makrophagen initiiert werden. Die untersuchten Zytokine, darunter insbesondere IL-13, IL-10, TGF- β sowie das Chemokin CCL17, deren maximale Expression wir an Tag 28 nach der Infektion verzeichneten, wurden bereits als wesentliche Induktoren nicht nur der Makrophagenaktivierung, sondern auch einer Fibroseentstehung in diversen Kontexten beschrieben (126,155).

IL-13, welches im gesamten Krankheitsverlauf eine ausgeprägtere Expression im Vergleich zu IL-4 zeigte, scheint dabei das in unserem Modell dominante, die T_H2 -Antwort beeinflussende Zytokin zu sein. Bei der murinen Schistosomiasis wurde IL-13 ebenfalls als Hauptvermittler der hepatischen Fibrosierung beschrieben (133,156). Darüber hinaus induziert IL-13 über die Stimulation von TGF- β die Fibroseentstehung (129,135,157).

Bezüglich des M2-assozierten Enzyms Arginase-1, das zur Produktion von Prolin, dem Hauptsubstrat der Kollagensynthese führt (129), detektierten wir in den infizierten Mäusen eine deutliche Hochregulation. Da Kollagen den wesentlichen Bestandteil der Abszesskapsel darstellt, unterstützt dies den Einfluss dieses charakteristischen Markers alternativer Makrophagen auf die Kapselbildung (87). Auch die bereits berichtete Fähigkeit der Makrophagen die Wachstumsfaktoren VEGF und TGF- β zu produzieren und dadurch die Wundheilung durch Induktion von Angiogenese und Differenzierung von Myofibroblasten zu beeinflussen, wird durch die gezeigte charakteristische Färbereaktion von F4/80 und VEGF-A sowie die Hochregulation von TGF- β in unserem Experiment unterstützt (39,158-160).

Trotz grundsätzlich ansteigender Tendenz aller T_H2 /M2-assozierten Mediatoren im Verlauf der Hirnabszessentwicklung fiel eine unerwartet frühe Induktion dieser Moleküle auf. Dieses Ergebnis unterstreicht, neben der schon erwähnten möglichen überlappenden Expression in verschiedenen Makrophagenpopulationen, die Bedeutung

einer rechtzeitigen Einleitung von Reparaturprozessen durch alternativ aktivierte Makrophagen, übereinstimmend mit den Erkenntnissen von Lucas *et al.* 2010 (160). Mittels eines Mausmodells, das es den Autoren erlaubte Makrophagen zeitpunktspezifisch während der verschiedenen Phasen der Reparatur einer Hautwunde zu depletieren, konnten sie zeigen, dass schon in den ersten Tagen nach der Verletzung M2-Makrophagen die Bildung eines gut vaskularisierten Granulationsgewebes mit Fibroblasteneinwanderung induzieren, welches für die Wundheilung wichtig ist (138).

Im Verlauf der Infektion konnten wir eine Induktion der IL-4R α -Expression auf Makrophagen und Mikroglia im ZNS nachweisen. Dies werteten wir als weiteres Indiz für den entscheidenden Einfluss der IL-4R α -vermittelten Signaltransduktion auf die im chronischen Stadium erfolgende fibröse Abkapselung der Erreger im Gehirn.

In unserem Modell einer chronischen zerebralen Bakterieninfektion kristallisierte sich demnach ein vorteilhafter Effekt der Makrophagenpolarisation hin zu einem antiinflammatorischen M2-Subtyp heraus, indem es nach erfolgloser primärer vollständiger Erregerelimination zu einer schützenden Begrenzung der Entzündungsreaktion kam. Die noch an Tag 28 nach der Infektion nachweisbaren Kolonien von *S. aureus* ließen sich ausschließlich im nekrotischen Zentrum des Abszesses lokalisieren, d.h. innerhalb der fibrösen Kapsel, was für eine erfolgreiche Eingrenzung der Erreger spricht. Der Prozess der Abkapselung geschah parallel zu der Umstellung von proinflammatorischen Zytokinen und Makrophagen vom M1-Typ in der akuten Phase hin zur Hochregulation antientzündlicher, profibrotischer Mediatoren und M2-Makrophagen in der Spätphase der Hirnabszessentwicklung. Der positive Effekt der Abkapselung der Erreger wurde auch in Experimenten unserer Arbeitsgruppe mit IL-12p35^{-/-}-Mäusen bestätigt, bei denen es durch eine frühere Induktion einer T_H2/M2-Antwort und eine prominentere Kapselbildung zu einem besseren Überleben und einer geringeren Krankheitsaktivität der infizierten Mäuse kam (40).

Auch in anderen chronischen Krankheitsmodellen, wie in der Einleitung bereits erläutert, konnte ein positiver Einfluss der T_H2/M2-Immunantwort auf den Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Dies gilt insbesondere für Infektionen durch Würmer wie u.a. *Schistosoma mansoni* oder *Nippostrongylus brasiliensis* im Rahmen derer eine funktionierende T_H2-Antwort essentiell für die Herabregulation einer potentiell

schädlichen proinflammatorischen Reaktion ist bzw. alternativ aktivierte Makrophagen direkt die Wurmausscheidung fördern (108,109,112,116).

Doch trotz des eigentlich günstigen Effektes IL-4R-abhängiger Induktion alternativer Makrophagen im Kontext der Schistosomiasis, führt eine anhaltende T_H2-Antwort zur Entwicklung einer Fibrose und dadurch gesteigerter Morbidität (116).

Wichtig ist daher die Abgrenzung einer T_H2/M2-induzierten vorteilhaften fibrösen Wundheilung, wie sie die Kollagenkapselbildung offensichtlich darstellt, von einer nachteiligen überschießenden Fibrosereaktion z.B. im Rahmen der Lungenfibrose, des Asthmas, chronischer parasitärer Infektionen oder einer Granulombildung (141). Insbesondere zeigt sich die Notwendigkeit der balancierten M1/M2-Antwort analog zu einer ausgewogenen T_H1/T_H2-Antwort, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern.

Insgesamt unterstützen die in den Experimenten mit Wildtyp-Mäusen gefundenen Ergebnisse also unsere Hypothese eines wesentlichen und günstigen Einflusses der T_H2/M2-Antwort auf die Wundheilung und Kapselbildung im Rahmen des *S. aureus*-induzierten Hirnabszesses.

5.3 Relevanz des IL-4R α für die Immunantwort und Kapselbildung

Als entscheidender Mechanismus der T_H2/M2-Antwort wurde die Signaltransduktion über den IL-4R α via IL-4 und IL-13 bei vielen humanen Erkrankungen und Modellen, inklusive des hier untersuchten, bereits ausführlich unter anderem durch unsere eigenen Arbeiten beschrieben.

Um im logisch darauf folgenden Schritt die tatsächliche Relevanz der M2-Makrophagen und des zugrunde liegenden Signalweges auf den Verlauf der Hirnabszessentwicklung *in vivo* genauer zu verstehen, betrachteten wir den klinischen Verlauf und die Immunreaktion bei Mäusen, die den IL-4R α nicht exprimieren können. Wir vermuteten, dass *die Differenzierung von M2-Makrophagen sowie die Bildung der fibrösen Kapsel im Spätstadium der Abszessentwicklung abhängig von der funktionellen Signaltransduktion, vermittelt durch T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 über deren gemeinsamen Rezeptor IL-4R α , ist und dass also bei Abwesenheit des IL-4R α keine oder nur eine alterierte Abszesskapsel entsteht.*

In unseren Untersuchungen mit IL-4R α -defizienten Mäusen fanden wir sowohl histologisch als auch auf Genexpressions-Ebene eine alterierte T_H2/M2-Antwort. Es kam zu einer signifikant verminderten Genexpression von T_H2- und fibroseassoziierten Mediatoren wie *Il13*, *Il5*, *Il10*, *Tgfb1* und *Ccl17* sowie zu einer Veränderung der Morphologie alternativ aktivierter Makrophagen und Fibroblasten sowie ihrer architektonischen Verteilung in der Abszesskapsel.

Klinisch konnten wir dagegen keinen eindeutigen Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knockout-Mäusen feststellen. Trotz alterierter T_H2-Antwort zeigten weder der Gewichtsverlauf noch die Überlebensrate eine signifikante Veränderung bei IL-4R α -Defizienz, wobei jedoch erstaunlicherweise eine Tendenz zu einem mildereren klinischen Verlauf und damit einer besseren Überlebensrate bei den Knockout-Mäusen zu erkennen war. Auch bei der Analyse der Krankheitsaktivität zeigte sich an Tag 7 nach der Infektion eine signifikant geringere Symptomatik bei IL-4R α ^{-/-}-Mäusen. Passend zu dem tendenziell besseren klinischen Outcome ergab die Quantifizierung des intrazerebralen Bakterienbefalls signifikant reduzierte Werte bei den Knockout-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen. Dieser Trend setzte sich auch bei der Untersuchung der intrazerebralen Leukozytenzahlen fort, wenngleich hier im Mittel kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen ermittelt werden konnte. Dies führen wir am ehesten auf eine zu geringe Anzahl an untersuchten Tieren zurück. Da aus ethischen Gründen nicht mehr Experimente durchgeführt wurden, muss eine abschließende Aussage zur Statistik an dieser Stelle offen bleiben.

Trotz Abwesenheit des IL-4R α scheint in unserem Modell überraschenderweise eine alternative Aktivierung von Makrophagen möglich. Dies zeigt sich insbesondere in der nicht signifikant verminderten Expression von CD206, Ym1, CD301, Arginase und IL-4 sowie histologisch durch die Kolo-kalisation von F4/80 mit CD206.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, untersuchten auch andere Arbeitsgruppen die funktionelle Relevanz des IL-4-Rezeptors für den Krankheitsverlauf, insbesondere im Rahmen von chronischen Wurm- und Protozoeninfektionen, im Kontext der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis sowie im Rahmen asthmatischer und allergischer Erkrankungen (88,100,102,104,109,112,123,161,162).

Einzelne Studien des Phänotyps und Einflusses von Makrophagen in Abwesenheit der funktionellen Signaltransduktion von IL-4 und IL-13 über ihren gemeinsamen Rezeptor haben vor allem in parasitären Krankheitsmodellen ebenfalls eine vom IL-4R α

unabhängige Polarisation einer T_H2-Antwort mit konsekutiver Expression von Markern alternativer Aktivierung wie CD206, Ym1 oder Arginase-1 gezeigt (104,152,147).

Daley und Kollegen untersuchten mittels subkutan implantierten PVA-Schwämmen im Mausmodell den Phänotyp und das Zytokin- und Chemokinmilieu sogenannter Wundmakrophagen (147). In diesem Modell, ähnlich dem des Hirnabszesses, folgt einer akuten Entzündungsreaktion die Ablagerung von Extrazellulärmatrix und eine Neovaskularisation mit anschließender fibröser Abkapselung des implantierten Schwammes. Entgegen der zuvor gängigen Ansicht, dass sogenannte Wundheilungsmakrophagen alternativ aktivierten Makrophagen entsprechen und daher IL-4R α -abhängig durch IL-4 und IL-13 stimuliert werden (84), fand sich hier eine IL-4R α -unabhängige Expression von u.a. CD206, Arginase-1 und Ym1, entsprechend unserer Ergebnisse. Darüber hinaus konnten in diesem Modell sogar weder IL-4, IL-13 noch STAT6 nachgewiesen werden, was gegen den zwingenden Einfluss dieser Marker auf die alternative Aktivierung spricht. Auch die für eine fibröse Narbenbildung essentielle Aktivierung von Arg⁺Ym1⁺F4/80⁺-Makrophagen nach einer laserinduzierten Hautwunde zeigte sich unabhängig von einer IL-4/STAT6- oder IL-10-abhängigen Signaltransduktion (163).

Beachtet werden muss dennoch, dass in diesen Studien die Immunantwort nach Setzen einer quasi sterilen Hautwunde analysiert wurde, was sicher nicht absolut vergleichbar ist mit dem komplexen Zusammenspiel der Entzündungszellen nach Infektion durch einen Erreger wie in unserem Modell. Gleiches gilt für die Feststellungen von Dupasquier und Kollegen, die eine Expression von CD206 und CD301 in dermalen Makrophagen von IL-4R α ^{-/-}-Mäusen fanden (98).

Bezüglich des Enzyms Arginase-1, welches in unseren Experimenten bei WT-Mäusen deutlich hochreguliert wurde und daher scheinbar eine wichtige Rolle für die Entstehung der überlebenswichtigen Kollagenkapsel spielt, konnten wir, wie schon erwähnt, keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression bei IL-4R α ^{-/-}-Mäusen feststellen. Zudem waren bei IL-4R α ^{-/-}-Mäusen auch histologisch abgekapselte Abszesse nachweisbar. Herbert *et al.* fanden in ihrem murinen Infektionsmodell mit *Schistosoma mansoni* ebenfalls eine IL-4R α -unabhängige Kollagenproduktion (109). Hier kam es trotz Knockout des IL-4R α selektiv auf Makrophagen mit konsekutiv gestörter alternativer Aktivierung zu einer unveränderten Kollagenproduktion in Granulomen. Die Autoren schlussfolgerten einen entscheidenden Einfluss IL-13-aktivierter Fibroblasten als Quelle der Prolin- und damit Kollagensynthese. Allerdings kam es bei unseren Knockout-

Mäusen, denen die IL-4-Rezeptoren auf allen Zellen fehlten, also auch auf Fibroblasten, dennoch zu einer suffizienten Kollagensynthese.

Diskrepanz zu der zuvor beschriebenen und weit verbreiteten Annahme, dass Arginase-1 entscheidender Vermittler der Kollagenproduktion ist, existieren einige Studien, die diesem Enzym einen eher inhibitorischen Effekt auf die Fibroseentstehung zuschreiben (164) bzw. es als nicht essentiell für die Wundheilung erachten (137).

Abgesehen von dem Umstand, dass es entgegen unseren Erwartungen bei IL-4R α -Defizienz in unserem Modell zu einer gewissen alternativen Aktivierung von Makrophagen mit entsprechendem, nachweisbarem Markerprofil kam, zeigte sich wie schon erwähnt eine relevante und signifikante Herabregulation einiger T_H2- und fibroseassoziierten Mediatoren. Entsprechend waren histologisch eindeutig weniger CD4-positive T_H-Zellen nachweisbar. Als vermutliche Folge der alterierten T_H2/M2-Antwort fanden wir mikroskopisch eine veränderte Morphologie und Lokalisation von Makrophagen und Fibroblasten. Rein morphologisch gesehen kann daher vermutet werden, dass sich Makrophagen und Fibroblasten bei IL-4R α -Defizienz gegensätzlich verhalten: Makrophagen werden großvolumig, verbleiben lokal am Nekroserand und nehmen nicht am Aufbau der Kapsel teil, während Fibroblasten kleinvolumig werden. Dies ist höchstwahrscheinlich das Ergebnis der verminderten Stimulation der Fibroblasten durch die fibroseassoziierten Mediatoren TGF- β , IL-10 sowie CCL17, wie wir hier zeigen konnten.

Ein interessanter Aspekt unserer Ergebnisse ist die ausgebliebene signifikant veränderte Regulation von IL-4 bei IL-4R α -Defizienz im Gegensatz zu IL-13 und IL-5. In einer Studie mit humanen Fibroblasten *in vitro* hatte IL-4 einen doppelt so großen Effekt auf die Kollagensynthese und damit Fibroseentstehung wie z.B. TGF- β (165). Somit könnte in unserem Modell IL-4 eine entscheidende Rolle für die Entstehung der Kollagenkapsel trotz verminderter Produktion profibrotischer Faktoren bei IL-4R α ^{-/-}-Mäusen spielen.

Alles in allem scheint der Vorgang der alternativen Aktivierung und Kapselbildung, erstaunlicherweise und entgegen unserer initialen Vermutung, in unserem Modell zumindest zum Teil unabhängig von der Existenz des IL-4R α abzulaufen. Ein weiteres überraschendes Ergebnis war der tendenziell mildere klinische Verlauf der Infektion bei

IL-4R α ^{-/-}-Mäusen mit geringerer Symptomatik, besserem Überleben und reduzierter intrazerebraler Bakterienbelastung trotz alterierter T_H2/M2-Immunantwort.

Zur Klärung der Ursache analysierten wir mehrere potentielle alternative Signaltransduktionswege, bei denen wir eine kompensatorische Hochregulation für möglich hielten.

5.4 Potentielle IL-4R α -unabhängige Aktivierungswege

Das bedeutende T_H2-Zytokin IL-13, das in unserem Modell bei den WT-Mäusen im Verlauf der Abszessentstehung signifikant induziert wurde, vermittelt seine Effekte über zwei Rezeptoren. Einerseits über die Bindung an den zuvor beschriebenen Typ II IL-4-Rezeptor mit den Untereinheiten IL-4R α und IL-13R α 1, der auch IL-4 bindet, andererseits über den hochaffinen IL-13R α 2, unabhängig von STAT6 (siehe Einleitung, Abbildung 1). Dieser wird durch Fibroblasten induziert und wurde bereits im Kontext mit der Fibroseentstehung beschrieben (124,128,157,166,167,168). Entsprechend unserer Ergebnisse erwähnte auch Wynn in seinem Review 2008 eine IL-4R-unabhängige Fibrosereaktion, als Ursache fand er u.a. eine IL-13-vermittelten Induktion von TGF- β über den IL-13R α 2-Rezeptor (126).

In unseren Untersuchungen zeigte sich allerdings keine veränderte Expression des IL-13R α 2 bei den IL-4R α ^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen an Tag 28 p.i. als möglicher kompensatorischer Mechanismus der Fibrosereaktion. Auch der Fakt, dass es trotz Herabregulation von IL-13 zu einer gleichartigen Kapselbildung bei den Knockout-Mäusen kam, spricht gegen einen ausschlaggebenden Einfluss des IL-13R α 2 in unserem Modell. Dieses Ergebnis bestätigten auch Daley und Kollegen, die im Wundmilieu kein IL-13 detektieren konnten und schlussfolgerten, dass der STAT6-unabhängige Signalweg über den IL-13R α 2 nicht entscheidend für eine Aktivierung von Wundheilungsmakrophagen, die sehr wohl Marker der alternativen Aktivierung wie CD206, Ym1 und Arginase-1 exprimieren, sein kann (147). Diese Autoren, so wie auch beispielsweise Chiamonte *et al.*, vermuteten sogar eine limitierende Wirkung des Rezeptors auf die IL-13-Expression (167). Alles in allem wird der Einfluss des IL-13R α 2 auf die Fibroseentstehung in der Literatur weiterhin sehr widersprüchlich beschrieben (126), sodass dessen endgültige Rolle aktuell noch ungeklärt ist.

Ein weiterer denkbarer alternativer Signalweg könnte über IL-10 bzw. über den IL-10-Rezeptor laufen, dessen Einfluss auf die Immunantwort, wie bereits erwähnt, ebenfalls immer noch konträr diskutiert wird. Es wurde beispielsweise eine der Induktion durch IL-4 ähnliche IL-10-abhängige Regulation des Mannoserezeptors (CD206) gefunden (169). In Experimenten mit Mäusen, denen der IL-4R α spezifisch auf Makrophagen fehlte, fanden Dewals und Kollegen eine IL-10-abhängige Expression von CD206 und Ym1 und damit eine relevante Beteiligung an der alternativen Aktivierung von Makrophagen (152)

In der vorliegenden Arbeit verzeichneten wir eine starke Hochregulation von IL-10 nach erfolgter bakterieller Infektion bei WT-Mäusen. Dies könnte, übereinstimmend mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (35), einen möglichen Mechanismus darstellen, um eine überschießende proinflammatorische Reaktion zu verhindern. Auch im Rahmen vieler anderer Infektionsmodelle wurde ein günstiger Effekt von IL-10 auf den Krankheitsverlauf entdeckt (170).

Bei unseren Untersuchungen mit IL-4R α -defizienten Mäusen zeigte sich eine Herabregulation der Genexpression von *Il10* sowie des assoziierten Wachstumsfaktors *Tgfb1* bzw. eine unveränderte Expression von *Il10r* und somit keine kompensatorische Induktion dieses Signalweges. Übereinstimmend damit detektierten Herbert *et al.* in ihrem chronischen Infektionsmodell mit dem Saugwurm *Schistosoma mansoni* weder eine kompensatorische Hochregulation der *Il10*-Genexpression bei Knockout des IL-4R α auf Makrophagen, noch eine Stimulation der Arginase-Aktivität in Makrophagen durch IL-10 (109). In der zuvor zitierten Studie von Daley *et al.* sezernierten Wundheilungsmakrophagen ebenfalls keinerlei IL-10, sodass dessen Einfluss auf die Immunregulation insgesamt fragwürdig bleibt (147).

Letztlich zeigt sich auch hier wieder die Schwierigkeit, die sich durch die Komplexität und Plazitätät der Makrophagenaktivierung ergibt. So beschrieben Mantovani und seine Arbeitsgruppe in einem Review von 2004 durch IL-10 aktivierte und selbst IL-10-produzierende Makrophagen als M2c-Makrophagen, welche wichtige Aufgaben im Rahmen des Gewebsumbaus und der Ablagerung von Extrazellulärmatrix übernehmen (82). Laut einem Review von Mosser und Edwards 2008 hingegen nehmen IL-10- und TGF- β -sezernierende sogenannte regulatorische Makrophagen (MR) nicht an diesen Prozessen teil und unterscheiden sich daher von via IL-4/IL-13 induzierten Wundheilungsmakrophagen (84). Diese MR sollen zudem regulatorische T-Zellen aktivieren und auch in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose, der EAE (engl.

experimental autoimmune encephalomyelitis) wurde diesen bei IL-4R α -Defizienz eine kompensatorische Rolle zugewiesen (123). In zukünftigen Projekten erscheint daher eine genauere Untersuchung der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-T_{reg}-Zellen im Rahmen des murinen *S. aureus*-induzierten Hirnabszesses lohnenswert.

Es gibt Hinweise darauf, dass IL-13 die Funktion von T_H17-Zellen und damit die Produktion von IL-17A vermindert (171). Da es bei unseren Experimenten mit IL-4R α -defizienten Mäusen zu einer signifikanten Herabregulation von IL-13 kam, vermuteten wir einen möglichen kompensatorischen Anstieg von IL-17A. Barron und Wynn beschrieben IL-17A darüber hinaus kürzlich als einen möglichen profibrotischen Mediator, der in Kombination mit einer T_H2-Antwort vermittelt über den IL-17R α eine Rolle bei der Entstehung von Fibrose spielt (128). Auch Chung *et al.* fanden in ihrem murinen Infektionsmodell mit dem Erreger *Bacteroides fragilis* eine IL-17-abhängige Bildung intraabdomineller Abszesse (172).

Überraschenderweise konnten wir nicht nur keine Zunahme von IL-17A bei unseren Knockout-Mäusen feststellen, sondern sogar eine signifikante Abnahme im Vergleich zu den WT-Mäusen. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte bei WT-Mäusen eine persistierende Hochregulation der Genexpression von *Il17a* zwar bis zur chronischen Phase der Infektion detektiert werden (39), allerdings zeigte sich bei IL-17A^{-/-}-Mäusen eine morphologisch unveränderte Kollagenkapsel, entsprechend der fehlenden Hochregulation von IL-17A bei IL-4R α -defizienten Mäusen in den vorliegenden Ergebnissen. Dies stellt zumindest in unserem Modell einen Einfluss der IL-17A- bzw. IL-17R α -vermittelten T_H17-Antwort auf die alternative Aktivierung von Makrophagen und auf die Kapselbildung in Frage.

Auch Bellini *et al.* wiesen einen eher konträren Effekt der T_H2-Zytokine IL-4/IL-13 und IL-17A bei Patienten mit Asthma nach (154). Hier induzierten IL-4 und IL-13 einen profibrotischen Phänotyp bei Fibrozyten während IL-17A keinen Einfluss auf die Kollagenproduktion und somit den fibrotischen Umbau im Rahmen des chronischen Asthmas hatte, entsprechend unserer Ergebnisse.

Mantovani und Kollegen beschrieben eine weitere Subpopulation von M2-Makrophagen, die über TLR-Liganden stimuliert wird und nannten sie M2b- oder auch Typ II-Makrophagen, in Abgrenzung zu alternativ aktivierten Makrophagen (M2a) bzw.

zuvor bereits erwähnten M2c-Makrophagen. Diesen wurden über die Sekretion von u.a. IL-10 immunsuppressive und regulatorische Aufgaben zugeschrieben (82)

Obwohl aktuell zumeist als Auslöser für eine M1- bzw. klassische Aktivierung von Makrophagen beschrieben (71,149), gab es immer mehr Hinweise darauf, dass TLR-vermittelte Signalkaskaden auch eine T_H2-Antwort und anschließende alternative Aktivierung von Makrophagen und sogar eine Fibrosereaktion initiieren können (141).

El Kasmi *et al.* fanden eine TLR2/MyD88-induzierte Induktion des M2-assoziierten Enzyms Arginase-1 nach Infektion mit *Mycobacterium bovis* (101). Dieser Vorgang zeigte sich STAT6-unabhängig. Allerdings handelte es sich bei der TLR2/Myd88-abhängigen Induktion von Arginase-1 auch um einen Mechanismus, der von einem intrazellulären Pathogen in klassisch aktivierten Makrophagen induziert wurde um deren kompetitive Produktion von NO zu vermindern und damit sein Überleben zu sichern. Diese Situation ist daher nicht direkt vergleichbar mit einer Infektion wie in unserem Modell.

In Versuchen mit dem Bakterium *Francisella tularensis* fanden Shirey *et al.* 2008, dass eine TLR2-abhängige Immunantwort zur einer Induktion von Markern alternativer Aktivierung führt (173). 2010 beschrieben sie zudem bei der RSV-induzierten Bronchiolitis, einem viralen Infektionsmodell, in dem die IL-4R α /STAT6-abhängige Induktion alternativ aktivierter Makrophagen über IL-4 und IL-13 entscheidend ist für einen positiven Verlauf der Erkrankung, eine TLR-abhängige Differenzierung von M2-assoziierten Mediatoren (174). Auch Gundra *et al.* konnten in ihrem Modell einer intrazerebralen Wurminfektion eine Reduktion der Expression von Markern alternativer Aktivierung durch Makrophagen wie Ym1 und Arginase-1 bei TLR2-Defizienz nachweisen (175). Weitere Studien zeigten eine TLR-vermittelte Differenzierung von Fibroblasten zu kollagenproduzierenden Myofibroblasten (126,141).

In den vorliegenden Ergebnissen, zur Klärung eines potentiellen kompensatorischen Einflusses dieses Signalweges bei Abwesenheit des IL-4-Rezeptors in der Spätphase der Hirnabszessentstehung, konnte allerdings kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von *Tlr2/Myd88* festgestellt werden. Entsprechend zeigte sich auch schon in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe keine Alteration der Kapselbildung bei TLR2^{-/-}- und TLR4^{-/-}-Mäusen (38).

Des Weiteren denkbar und in zukünftigen Projekten zu klären wäre eine kompensatorisch veränderte Immunantwort schon in der Akutphase nach der Infektion,

da auch die proinflammatorischen Zytokine und Chemokine Einfluss auf die Fibrosereaktion durch Unterdrückung der Kollagensynthese nehmen (126) und auch schon in anderen Infektionsmodellen eine veränderte T_H1 -Antwort bei IL-4R-Defizienz gezeigt wurde (176). Auch IL-10 und CCL17 wurden schon als effektive Inhibitoren von M1-Makrophagen beschrieben, somit könnte die signifikante Herabregulation dieser bei IL-4R α -Defizienz und nachfolgender Reduktion der T_H2 -Antwort auf eine initiale kompensatorische Induktion der T_H1 -Antwort hindeuten (177).

Eine Analyse der involvierten Zellpopulationen und deren Mediatoren bei IL-4R α ^{-/-}-Mäusen, auch an anderen Zeitpunkten, insbesondere in der Frühphase, konnte leider im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden.

Zusammengefasst muss also überraschenderweise, aber auch interessanterweise, festgehalten werden, dass es außer den bekannten Mechanismen der Aktivierung von Makrophagen zu einem „alternativen“ Phänotyp offenbar noch andere Wege geben muss, die IL-4R α - und vermutlich zumindest teilweise T_H2 -unabhängig verlaufen und die wir bislang nicht kennen. Auch die genauen Mechanismen, über die es trotz signifikanter Herabregulation der fibroseassoziierten Mediatoren wie IL-13, IL-10, TGF- β oder CCL17 bei IL-4R α -Defizienz zu einer ausreichenden Kapselbildung mit suffizienter Neovaskularisation und Kollagenproduktion kommt, müssen noch geklärt werden. Möglicherweise ist zumindest das bloße Vorhandensein der untersuchten T_H2 -Mediatoren sowie der M2-Population, wenn auch auf niedrigerem Niveau, allein ausreichend für die Einleitung der nachfolgenden Prozesse. Perspektivisch wäre diesbezüglich u.a. die isolierte Betrachtung der einzelnen regulierten Mediatoren unter Verwendung entsprechender Knockout-Mäuse ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Experimente. Auch die differenzierte Untersuchung sämtlicher involvierter Mediatoren per moderner Hochdurchsatzanalysen (z.B. RNA sequencing, Chip-Analysen, Panel-Analysen) könnte Aufklärung verschaffen.

5.5 Fazit und Ausblick

Neben den schon erwähnten Ideen für zukünftige Projekte ergeben sich für uns aus den vorliegenden Ergebnissen weitere Limitationen dieser Arbeit sowie weitere offene Fragestellungen.

Eine wesentliche Schwierigkeit unserer Methodik stellte eine gewisse Varianz bei der intrazerebralen Infektion der Mäuse dar, die sich u.a. daraus ergab, dass nicht alle Tiere

gleichzeitig infiziert werden konnten. Da nicht alle infizierten Tiere einen Abszess entwickelten, waren nicht alle Experimente an jedem der geplanten Untersuchungszeitpunkte auswertbar. Zudem existiert *bis dato* kein verlässliches Markerprofil um eingewanderte Makrophagen von ortsständig aktivierter Mikroglia des ZNS zu unterscheiden (178). Da diese Zellpopulationen in unserem Modell zentrale Aufgaben übernehmen, wäre deren separate Analyse sicherlich äußerst interessant. Dem näher zu kommen, ließe sich eventuell mit Mausmodellen unter der Verwendung von Knochenmarkschimären erreichen, so wie es Aldrich und Kielian im Rahmen der Akutphase der murinen Hirnabszessentwicklung bereits zeigen konnten (143). Ein Problem dabei könnte allerdings die unvorhersehbare Interaktion der Bestrahlungseffekte mit der Infektion sein, sodass man mit artifiziellen Einflüssen rechnen muss.

Eine weitere entscheidende Zellpopulation im Kontext einer fibrösen Reaktion mit z.T. mit Makrophagen überlappendem Mediatorenprofil und der Fähigkeit der Prolinproduktion stellen Fibroblasten dar (128,179). Da ein Fokus unserer Arbeit auf dem Mechanismen der Kapselbildung lag, sollten zukünftige Experimente den Einfluss der Fibroblasten mitbetrachten, insbesondere auch deren Interaktion mit Makrophagen und T-Zellen sowie in diesem Zusammenhang die Expression von weiteren $T_H2/M2$ - und fibroseassoziierten Mediatoren wie u.a. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren spezifische Inhibitoren (TIMPs) (129), IL-21 (124,126) oder IL-33 (124,150).

Weiterhin könnte eine Bestimmung der relevanten Mediatoren auf Proteinebene mittels ELISA oder WesternBlot hilfreiche Erkenntnisse bringen. Aufgrund des sehr hohen Materialverbrauchs bei zuvor genannten Methoden konzentrierten wir uns in unseren Experimenten auf die Analyse der Immunantwort auf Zell- und mRNA-Ebene, wodurch mehr Gene untersuchbar waren. Um dies fortzuführen, ist bereits eine Transkriptom-Analyse der Makrophagen per Mikroassay zur Untersuchung von weiteren möglichen relevanten Genen in Planung. Anschließend könnte durch Knockout stark regulierter und relevanter Gene bei Mäusen deren funktionelle Relevanz *in vivo* ermittelt werden.

5.5.1 Unterschiede zur humanen Situation

Der murine *S. aureus*-induzierte Hirnabszess spiegelt die charakteristischen morphologischen Veränderungen des humanen Hirnabszess wider. Unsere Arbeitsgruppe konnte bei humanen Hirnabszessen mittels histologischen Färbungen die wesentlichen beteiligten Zellpopulationen wie neutrophile Granulozyten, aktivierte

Makrophagen und Mikrogliazellen sowie CD4⁺-T-Lymphozyten in typischer Lokalisation identifizieren und eine Kollagen VI-reiche Abszesskapsel nachweisen (39). Viele Untersuchungen zeigten bisher weitere Parallelen der humanen und murinen Immunantwort. So konnte neben der generellen Existenz von T_H1- und T_H2-Zellen beim Menschen (51) beispielsweise die Induktion einer prominenten T_H2-Antwort als Reaktion auf eine Infektion mit *Schistosoma mansoni* (109,116) nachgewiesen werden oder auch die Expression entscheidender Mediatoren klassischer und alternativer Aktivierung wie IFN- γ , TGF- β , CCL17, IL-4R α , CD206 oder CD301 (84,96,124,149). Auch bezüglich der Fibrosereaktion konnte eine Induktion von Proteinen und Enzymen der Extrazellulärmatrix durch IL-4-aktivierte humane Makrophagen nachgewiesen werden (108). Dennoch finden sich in der Literatur auch zahlreiche Hinweise auf eine nur begrenzte Übertragbarkeit der murinen Situation auf den Menschen. So fehlt es am humanen Korrelat einiger Marker der alternativen Aktivierung (136,149,180). Ein Korrelat für Ym1 konnte z.B. im Menschen nicht entdeckt werden und Arginase-1 wurde entweder nicht durch IL-4 hochreguliert oder überhaupt nicht durch Makrophagen exprimiert (96,124,137,147). Martinez und Kollegen schätzen, dass ca. 50% der bekannten Marker der unterschiedlichen Makrophagenpolarisationen speziesspezifisch sind (181).

5.5.2 Therapeutische Konsequenz

Anhand der gewonnenen Daten könnten neue therapeutische Ansatzpunkte definiert werden, um den Krankheitsverlauf beim Menschen zu mildern bzw. günstig zu beeinflussen. Hier steht die mögliche Beeinflussung des Entzündungsverlaufes, über die Antibiotikagabe hinausgehend im Vordergrund, denn es ist bekannt, dass trotz Antibiose bis zu 15% der Hirnabszess-Patienten eine infauste Prognose haben (5). Insbesondere die exakte Analyse der Heilungsmechanismen und der Beendigung der Inflammation, bei der die alternativ aktivierten Makrophagen möglicherweise einen wesentlichen Anteil haben, ist vielversprechend um Zielmoleküle zu identifizieren auf denen ein Therapieansatz basieren könnte. So wurde im Rahmen des allergischen Asthmas beispielsweise die Wirksamkeit von IL-4-, IL-13- sowie IL-4-Rezeptor-Antagonisten als therapeutisches Mittel untersucht (88,93).

Die häufigsten im Kontext einer chronischen Entzündungsreaktion beschriebenen Therapieansätze basieren auf der Regulation der abschließenden Fibroseentstehung. Die T_H2/M2-Antwort induziert zwar einerseits eine Herabregulation der Immunreaktion

sowie die Wundheilung, die essentiell für das Überleben des Wirtes ist, wenn eine akute Infektion nicht zufriedenstellend bekämpft werden kann, andererseits ist diese aber auch an der Initiierung der Fibrosereaktion beteiligt, bei Übergang der Erkrankung in eine chronische Entzündung (126,129,178). Das Ziel wirkungsvoller Therapieoptionen sollte entsprechend die Wiederherstellung der normalen Gewebsarchitektur mit funktionsfähigem Parenchym sein und damit einer überschießenden Ablagerung von Extrazellulärmatrix zuvorkommen (128).

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Einfluss der T_H2-Immunantwort mit konsekutiver Polarisierung der Makrophagen hin zu einem alternativen Phänotyp auf die überlebenswichtige Abkapselung des Entzündungsprozesses zum Schutz des umliegenden gesunden Gehirnparenchyms vor eindringenden Erregern. Gelingt es in der Zukunft, diesen Vorgang gezielt zu beeinflussen, entstehen neue therapeutische Möglichkeiten, um Entzündungsprozesse frühzeitig zu beenden.

Letztendlich wird aber die Interaktion und der genaue Einfluss der einzelnen Zellpopulationen und Mediatoren noch sehr kontrovers diskutiert und scheint äußerst variabel, sodass sich das Verstehen der komplexen Vorgänge im Rahmen der Fibrosereaktion als sehr schwierig erweist.

Zusammengefasst bestätigt die vorliegende Arbeit den charakteristischen Krankheitsverlauf nach intrazerebraler Infektion der Maus mit *S. aureus* sowie die nachfolgenden grundsätzlichen zelltypischen Immunregulationsvorgänge.

Es wurden jedoch neue Aspekte bezüglich der Makrophagenpolarisation im Rahmen einer bakteriellen Entzündung aufgezeigt. Eine interessante Erkenntnis ist der sich im Verlauf der Erkrankung vollziehende Wandel des Aktivierungszustands der Makrophagen, feststellbar durch die zeitpunktabhängige Expression unterschiedlicher charakteristischer Marker. Ein unerwartetes Ergebnis war die IL-4R α -unabhängige Aktivierung alternativer Makrophagen. Die Architektur der Kollagenkapsel war bei Nachweis einer Herabregulation fibroseassoziiierter Mediatoren in ihrem Aufbau tatsächlich alteriert, ebenso die Positionierung der Makrophagen, deren Morphologie sowie auch die der Fibroblasten. In diesem Zusammenhang bedarf es weiterer Untersuchungen, um zugrundeliegende Mechanismen zu klären.

6 Literaturverzeichnis

1. Nicolosi A, Hauser WA, Musicco M, Kurland LT: Incidence and prognosis of brain abscess in a defined population: Olmsted County, Minnesota, 1935-1981. *Neuroepidemiology* 1991;10:122-31
2. Loftus CM, Osenbach RK, Biller J. Diagnosis and management of brain abscess. In: Wilkins RH, Rengachary SS, eds. *Neurosurgery*. 2nd ed., Vol 3. New York: McGraw-Hill; 1996;3285-98
3. Calfee DP, Wispelwey B. Brain abscess. *Semin Neurol* 2000;20:353-60
4. King N. Brain Abscess. In: Roos KL, Tunkel AR, eds. *Handbook of Clinical Neurology: Bacterial Infections of the Central Nervous System*. Amsterdam: Elsevier; Vol. 96. 2010:65-74
5. Brouwer MC, Tunkel AR, McKhann GM 2nd, van de Beek D. Brain abscess. *N Engl J Med* 2014;371:447-56
6. Canale DJ. William Macewen and the treatment of brain abscesses: Revisited after one hundred years. *J Neurosurg* 1996;84:133-42
7. Mathisen GE, Johnson JP. Brain abscess. *Clin Infect Dis* 1997;25:763-779
8. Samson DS, Clark K. A current review of brain abscess. *Am J Med* 1973;54:201-10
9. Alderson D, Strong AJ, Ingham HR, Selkon JB. Fifteen-year review of the mortality of brain abscess. *Neurosurgery* 1981;8:1-6
10. Mampalam TJ, Rosenblum ML. Trends in the management of bacterial brain abscess: A review of 102 cases over 17 years. *Neurosurgery* 1988;23:451-8
11. Yang SY, Zhao CS. Review of 140 patients with brain abscess. *Surg Neurol* 1993;39:290-6
12. Carpenter J, Stapleton S, Holliman R. Retrospective analysis of 49 cases of brain abscess and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:1-11
13. Menon S, Bharadwaj R, Chowdhary A, Kaundinya DV, Palande DA. Current epidemiology of intracranial abscesses: A prospective 5 year study. *J Med Microbiol* 2008;57:1259-68
14. Chun CH, Johnson JD, Hofstetter M, Raff MJ. Brain abscess: A study of 45 consecutive cases. *Medicine (Baltimore)* 1986;65:415-31
15. Giannoni CM, Stewart MG, Alford EL. Intracranial complications of sinusitis. *Laryngoscope* 1997;107:863-7

16. Gallagher RM, Gross CW, Phillips CD. Suppurative intracranial complications of sinusitis. *Laryngoscope* 1998;108:1635-42
17. Kangsanarak J, Fooanant S, Ruckphaopunt K, Navacharoen N, Teotrakul S. Extracranial and intracranial complications of suppurative otitis media. Report of 102 cases. *J Laryngol Otol* 1993;107:999-1004
18. Roche M, Humphreys H, Smyth E, Phillips J, Cunney R, McNamara E, O'Brien D, McArdle O. A twelve-year review of central nervous system bacterial abscesses; presentation and aetiology. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:803-9
19. Kastenbauer S. Infectious intracranial mass lesions. In: Noseworthy JH, ed. *Neurological Therapeutics: Principles and Practice*. London: Martin Dunitz; 2003:874-88
20. Britt RH, Enzmann DR, Yeager AS. Neuropathological and computerized tomographic findings in experimental brain abscess. *J Neurosurg* 1981;55:590-603
21. Britt RH, Enzmann DR. Clinical stages of human brain abscesses on serial CT scans after contrast infusion. Computerized tomographic, neuropathological, and clinical correlations. *J Neurosurg* 1983;59:972-89
22. Essick CR. Pathology of experimental traumatic abscess of the brain. *Arch Neurol Psychiatry* 1919;1:673-703
23. Falconer MA, McFarlan AM, Russell DS. Experimental brain abscesses in the rabbit. *Br J Surg* 1943; 30:245-60
24. Hassler O, Forsgren A. Experimental abscesses in brain and subcutis. A microangiographic study in the rabbit. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1964;62:59-67
25. Wood JH, Doppman JL, Lightfoote WE 2nd, Girton RT, Ommaya AK. Role of vascular proliferation on angiographic appearance and encapsulation of experimental traumatic and metastatic brain abscesses. *J Neurosurg* 1978;48: 264-73
26. Wallenfang T, Bohl J, Kretzschmar K. Evolution of brain abscess in the cats. Formation of capsule and resolution of brain edema. *Neurosurg Rev* 1980;3: 101-11
27. Enzmann DR, Britt RH, Yeager AS. Experimental brain abscess evolution: Computed tomographic and neuropathologic correlation. *Radiology* 1979;133: 113-22
28. Flaris NA, Hickey WF. Development and characterization of an experimental model of brain abscess in the rat. *Am J Pathol* 1992;141:1299-1307
29. Winn HR, Mendes M, Moore P, Wheeler C, Rodeheaver G. Production of experimental brain abscess in the rat. *J Neurosurg* 1979;51:685-90

30. Matsuura H, Kudo M, Ikeda Y, Isayama K, Nakazawa S. A model of brain abscess: Septic homologous blood clot emboli in rats. *J Neurosurg* 1986;64:125-7
31. Kielian T, Hickey WF. Proinflammatory cytokine, chemokine, and cellular adhesion molecule expression during the acute phase of experimental brain abscess development. *Am J Pathol* 2000;157:647-58
32. Kielian T, Barry B, Hickey WF. CXC chemokine receptor-2 ligands are required for neutrophil-mediated host defense in experimental brain abscesses. *J Immunol* 2001;166:4634-43
33. Kielian T, Bearden ED, Baldwin AC, Esen N. IL-1 and TNF-alpha play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced experimental brain abscess. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:381-96
34. Stenzel W, Soltek S, Schlüter D, Deckert M. The intermediate filament GFAP is important for the control of experimental murine *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess and *Toxoplasma* encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:631-40
35. Stenzel W, Dahm J, Sanchez-Ruiz M, Miletic H, Hermann M, Courts C, Schwindt H, Utermöhlen O, Schlüter D, Deckert M. Regulation of the inflammatory response to *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess by interleukin-10. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:1046-57
36. Stenzel W, Soltek S, Miletic H, Hermann MM, Körner H, Sedgwick JD, Schlüter D, Deckert M. An essential role for tumor necrosis factor in the formation of experimental murine *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess and clearance. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:27-36
37. Kielian T, Phulwani NK, Esen N, Syed MM, Haney AC, McCastlain K, Johnson J. MyD88-dependent signals are essential for the host immune response in experimental brain abscess. *J Immunol* 2007;178:4528-37
38. Stenzel W, Soltek S, Sanchez-Ruiz M, Akira S, Miletic H, Schlüter D, Deckert M. Both TLR2 and TLR4 are required for the effective immune response in *Staphylococcus aureus*-induced experimental murine brain abscess. *Am J Pathol* 2008;172:132-45
39. Held J. Distinct impact of IL-12- and IL-17A-driven inflammatory response in the initiation and resolution of experimental *Staphylococcus aureus*-mediated brain abscess. Unveröffentlichte Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 2013
40. Held J, Preuße C, Döser A, Richter L, Heppner FL, Stenzel W. Enhanced acute immune response in IL-12p35^{-/-} mice is followed by accelerated distinct repair mechanisms in *Staphylococcus aureus*-induced murine brain abscess. *J Infect Dis* 2013;208:749-60
41. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie*. 5th edition ed: Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, 2002:777

42. Leibowitz S, Hughes RA. The immune response in the central nervous system. In: Arnold E, ed. *Immunology of the nervous system*. Butler and Tanner, London, 1983:20-40
43. Tran EH, Becher B. Immune properties of the central nervous system. In: Antel J, Birnbaum G, Hartung HP, Vincent A, eds. *Clinical Neuroimmunology*. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, 2005:43-51
44. Hickey WF. Leukocyte traffic in the central nervous system: The participants and their roles. *Semin Immunol* 1999;11:125-37
45. Hickey WF. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 2001;36:118-24
46. Sredni-Kenigsbuch D. TH1/TH2 cytokines in the central nervous system. *Int J Neurosci* 2002;112:665-703
47. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57
48. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest*. 1991;88:346-50
49. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46
50. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517
51. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-93
52. Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: Roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* 2002;109:431-5
53. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 2008;123:326-38
54. Sher A, Coffman RL. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol* 1992;10:385-409
55. Kidd P. Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003;8:223-46

56. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587-96
57. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 1999;17:701-38
58. Kaplan MH, Whitfield JR, Boros DL, Grusby MJ. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. *J Immunol* 1998;160:1850-6
59. Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:399-408
60. Munder M, Eichmann K, Modolell M. 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* 1998;160:5347-54
61. Xu D, Liu H, Komai-Koma M, Campbell C, McSharry C, Alexander J, Liew FY. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. *J Immunol* 2003;170:394-9
62. Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003;197:1111-9
63. Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004;114:1209-17
64. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009;30:616-25
65. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988;334:260-2
66. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 1992;22:2501-6
67. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* 2000;165:4773-7
68. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765
69. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺Tregs: Limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004;114:1372-8

70. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 2005;175:342-9
71. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014;6:13
72. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992;176:287-92
73. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000;164:6166-73
74. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3:23-35
75. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995;13:151-77
76. Taub DD, Cox GW. Murine Th1 and Th2 cell clones differentially regulate macrophage nitric oxide production. *J Leukoc Biol* 1995;58:80-89
77. Dalton, DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 1993;259:1739-42
78. Jorens PG, Matthys KE, Bult H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators Inflamm* 1995;4:74-89
79. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995;375:408-11
80. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323-50
81. Kirkebøen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis: An overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999;43:275-88
82. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677-86
83. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008;13:453-61
84. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-69

85. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase - arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 1995;25:1101-4
86. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003;73:209-12
87. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 2001;167:6533-44
88. Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma - Interleukin-4: Its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* 2001;2:66-70
89. Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: A metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog* 2010;6:1-7
90. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 1996;4:313-9
91. Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996;380:630-3
92. Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology* 2009;214:630-41
93. Oh CK, Geba GP, Molino N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *Eur Respir Rev* 2010;19:46-54
94. Raes G, Noël W, Beschin A, Brys L, de Baetselier P, Ghassabeh GH. FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages. *Dev Immunol* 2002;9:151-9
95. Welch JS, Escoubet-Lozach L, Sykes DB, Liddiard K, Greaves DR, Glass CK. TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2002;277:42821-9
96. Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanham G, Noël W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Bergh R, Leenen PJ, De Baetselier P, Ghassabeh GH. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 2005;77:321-7

97. Sato K, Imai Y, Higashi N, Kumamoto Y, Onami TM, Hedrick SM, Irimura T. Lack of antigen-specific tissue remodeling in mice deficient in the macrophage galactose-type calcium-type lectin 1/CD301a. *Blood* 2005;106:207-15
98. Dupasquier M, Stoitzner P, Wan H, Cerqueira D, van Oudenaren A, Voerman JS, Denda-Nagai K, Irimura T, Raes G, Romani N, Leenen PJ. The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes independent of IL-4/IL-13 signaling. *J Leukoc Biol* 2006;80:838-49
99. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009;27:451-83
100. Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH, de Baetselier P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 2007;19:454-9
101. El Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, Smith AM, Thompson RW, Henao-Tamayo M, Basaraba RJ, König T, Schleicher U, Koo MS, Kaplan G, Fitzgerald KA, Tuomanen EI, Orme IM, Kanneganti TD, Bogdan C, Wynn TA, Murray PJ. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol* 2008;9:1399-1406
102. Mohrs M, Ledermann B, Köhler G, Dorfmueller A, Gessner A, Brombacher F. Differences between IL-4- and IL-4 receptor α -deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J Immunol* 1999;162:7302-8
103. Hölscher C, Arendse B, Schwegmann A, Myburgh E, Brombacher F. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol* 2006;176:1115-21
104. Mohrs M, Holscher C, Brombacher F. Interleukin-4 receptor α -deficient BALB/c mice show an unimpaired T helper 2 polarization in response to *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 2000;68:1773-80
105. Kropf P, Fuentes JM, Fähnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Müller I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J* 2005;19:1000-2
106. Piacenza L, Peluffo G, Radi R. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: Contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7301-6
107. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008;181:3733-9
108. Kreider T, Anthony RM, Urban JF Jr., Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol* 2007;19:448-53

109. Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Förster I, Brombacher F. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 2004;20:623-35
110. Scales HE, Ierna MX, Lawrence CE. The role of IL-4, IL-13 and IL-4Ralpha in the development of protective and pathological responses to *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol* 2007;29:81-91
111. Barner M, Welte M, Brombacher F, Kopf M. Differences between IL-4Ra and IL-4 deficient mice reveal a novel role of IL-13 in the regulation of T helper 2 cells and protection to nematode infection. *Curr Biol* 1998;8:669-72
112. Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M, Finkelman FD. IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 1998;8:255-64
113. Anthony RM, Urban JF Jr, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher JL, Van Rooijen N, Gause WC. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* 2006;12:955-60
114. Reece JJ, Siracusa MC, Scott AL. Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infect Immun* 2006;74:4970-81
115. Rosa Brunet L, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA, Pearce EJ. IL-4 protects against TNF-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol* 1997; 159:777-85
116. Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2002;2:499-511
117. Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie AN. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol* 2000;164:2585-91
118. Munitz A, Brandt EB, Mingler M, Finkelman FD, Rothenberg ME. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor $\alpha 1$ and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:7240-5
119. Byers DE, Holtzman MJ. Alternatively activated macrophages and airway disease. *Chest* 2011;140:768-74

120. Müller U, Stenzel W, Köhler G, Werner C, Polte T, Hansen G, Schütze N, Straubinger RK, Blessing M, McKenzie AN, Brombacher F, Alber G. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 2007;179:5367-77
121. Stenzel W, Müller U, Köhler G, Heppner FL, Blessing M, McKenzie AN, Brombacher F, Alber G. IL-4/IL-13-dependent alternative activation of macrophages but not microglial cells is associated with uncontrolled cerebral cryptococcosis. *Am J Pathol* 2009;174:486-96
122. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-37
123. Keating P, O'Sullivan D, Tierney JB, Kenwright D, Miromoeini S, Mawasse L, Brombacher F, La Flamme AC. Protection from EAE by IL-4R α (-/-) macrophages depends upon T regulatory cell involvement. *Immunol Cell Biol* 2009;87:534-45
124. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity* 2010;32:593-604
125. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. Resolution of inflammation: State of the art, definitions and terms. *FASEB J* 2007;21:325-32
126. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210
127. Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 2000;204:19-28
128. Barron L, Wynn T. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:723-8
129. Wynn TA. Fibrotic disease and the T_H1/T_H2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004;4:583-94
130. Wynn TA, Barron L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010;30:245-57
131. Allen JE, Wynn TA. Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002003
132. Sempowski GD, Beckmann MP, Derdak S, Phipps RP. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors: role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Immunol* 1994;152:3606-14

133. Chiaramonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:777-85
134. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999;103:779-88
135. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 2001;194:809-21
136. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 2011;89:557-63
137. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol* 2011;178:19-25
138. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol* 2009;175:2454-62
139. Witte MB, Barbul A, Schick MA, Vogt N, Becker HD. Upregulation of arginase expression in wound-derived fibroblasts. *J Surg Res* 2002;105:35-42
140. Saito A, Okazaki H, Sugawara I, Yamamoto K, Takizawa H. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;132:168-76
141. Meneghin MD, Hogaboam C. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J Clin Invest* 2007;117: 530-8
142. Baldwin AC, Kielian T. Persistent immune activation associated with a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced experimental brain abscess. *J Neuroimmunol* 2004;151:24-32
143. Aldrich A, Kielian T. Central nervous system fibrosis is associated with fibrocyte-like infiltrates. *Am J Pathol* 2011;179:2952-62
144. Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol* 1995;154: 4309-21
145. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8

146. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: Reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 2004;76:509-13
147. Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010;87:59-67
148. Arora S, Olszewski MA, Tsang TM, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2011;79:1915-26
149. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014;41:14-20
150. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229:176-85
151. Brombacher F, Arendse B, Peterson R, Hölscher A, Hölscher. Analyzing classical and alternative macrophage activation in macrophage/neutrophil-specific IL-4 receptor- α -deficient mice. *Methods Mol Biol* 2009;531:225-52
152. Dewals BG, Marillier RG, Hoving JC, Leeto M, Schwegmann A, Brombacher F. IL-4R α -independent expression of mannose receptor and Ym1 by macrophages depends on their IL-10 responsiveness. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e689
153. Locksley RM. Asthma and allergic inflammation. *Cell* 2010;140:777-83
154. Bellini A, Marini MA, Bianchetti L, Barczyk M, Schmidt M, Mattoli S. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients. *Mucosal Immunol* 2012;5:140-9
155. Belperio JA, Dy M, Murray L, Burdick MD, Xue YY, Strieter RM, Keane MP. The role of the Th2 CC chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2004;173:4692-8
156. Chiamonte MG, Cheever AW, Malley JD, Donaldson DD, Wynn TA. Studies of murine Schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* 2001;34:273-82
157. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF β 1 production and fibrosis. *Nat Med* 2006;12:99-106
158. Stout RD. Editorial: Macrophage functional phenotypes: no alternatives in dermal wound healing? *J Leukoc Biol* 2010;87:19-21

159. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-70
160. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 2010;184:3964-77
161. Grünig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM, Corry DB. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998;282:2261-3
162. Herbert DR, Orekov T, Perkins C, Rothenberg ME, Finkelman FD. IL-4R α expression by bone marrow-derived cells is necessary and sufficient for host protection against acute schistosomiasis. *J. Immunol* 2008; 180:4948-55
163. He L, Marneros AG. Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar. *Am J Pathol* 2013;182:2407-17
164. Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 2009a;5:e1000371
165. Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol* 1991;37:823-9
166. Kawakami K, Taguchi J, Murata T, Puri RK. The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood* 2001;97:2673-9
167. Chiaramonte MG, Mentink-Kane M, Jacobson BA, Cheever AW, Whitters MJ, Goad ME, Wong A, Collins M, Donaldson DD, Grusby MJ, Wynn TA. Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J Exp Med* 2003;197:687-701
168. Ramalingam TR, Pesce, JT, Sheikh F, Cheever AW, Mentink-Kane MM, Wilson MS, Stevens S, Valenzuela DM, Murphy AJ, Yancopoulos GD, Urban JF Jr, Donnelly RP, Wynn TA. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor alpha1 chain. *Nat Immunol* 2008;9:25-33
169. Martinez-Pomares L, Reid DM, Brown GD, Taylor PR, Stillion RJ, Linehan SA, Zamze S, Gordon S, Wong SY. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10 and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J Leukoc Biol* 2003;73:604-13

170. Schopf LR, Hoffmann KF, Cheever AW, Urban JF Jr, Wynn TA. IL-10 is critical for host resistance and survival during gastrointestinal helminth infection. *J Immunol* 2002;168:2383-92
171. Newcomb DC, Zhou W, Moore ML, Goleniewska K, Hershey GK, Kolls JK, Peebles RS Jr. A functional IL-13 receptor is expressed on polarized murine CD4⁺ Th17 cells and IL-13 signaling attenuates Th17 cytokine production. *J Immunol* 2009;182:5317-21
172. Chung DR, Kasper DL, Panzo RJ, Chitnis T, Grusby MJ, Sayegh MH, Tzianabos AO. CD4⁺ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 2003;170:1958-63
173. Shirey KA, Cole LE, Keegan AD, Vogel SN. Francisella tularensis live vaccine strain induces macrophage alternative activation as a survival mechanism. *J Immunol* 2008;181:4159-67
174. Shirey KA, Pletneva LM, Puche AC, Keegan AD, Prince GA, Blanco JC, Vogel SN. Control of RSV-induced lung injury by alternatively activated macrophages is IL-4R alpha-, TLR4-, and IFN-beta-dependent. *Mucosal Immunol* 2010;3:291-300
175. Gundra UM, Mishra BB, Wong K, Teale JM. Increased disease severity of parasite-infected TLR2^{-/-} mice is correlated with decreased central nervous system inflammation and reduced numbers of cells with alternatively activated macrophage phenotypes in a murine model of neurocysticercosis. *Infect Immun* 2011;79:2586-96
176. Balic A, Harcus YM, Taylor MD, Brombacher F, Maizels RM. IL-4R signaling is required to induce IL-10 for the establishment of T_H2 dominance. *Int Immunol* 2006;18:1421-31
177. Katakura T, Miyazaki M, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages. *J Immunol* 2004;172:1407-13
178. London A, Cohen M, Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: Functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci* 2013;7:34
179. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007;117:524-9
180. Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP, Ten Hacken NH, Cobos Jiménez V, Kootstra NA, Hamann J, Greaves DR, Locati M, Mantovani A, Gordon S. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 2013;121:57-69

181. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 2006;177:7303-11

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lydia Zobel, geb. Richter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Funktion von intrazerebralen Makrophagen beim Staphylococcus aureus-induzierten Hirnabszess im Kontext der IL-4R-abhängigen Aktivierung“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Frau Lydia Zobel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Piehler D, Stenzel W, Grahnert A, Held J, **Richter L**, Köhler G, Richter T, Eschke M, Alber G, Müller U. Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T-helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. Am J Pathol 2011;179:733-44

- Beisteuern von histologischen Färbungen von Mauslungen.

Publikation 2:

Held J, Preuße C, Döser A, **Richter L**, Heppner FL, Stenzel W. Enhanced acute immune response in IL-12p35^{-/-} mice is followed by accelerated distinct repair mechanisms in Staphylococcus aureus-induced murine brain abscess. J Infect Dis 2013;208:749-60

- Beisteuern von einigen den Graphiken zugrundeliegenden Daten per qPCR.

unter Revision:

Alternative activation of macrophages in Staphylococcus aureus-induced brain abscess is not dependent on functional IL-4R α signalling.

Lydia Zobel*; Josephin Held, PhD*; Frank L. Heppner, M.D.; Frank Brombacher, PhD; Gottfried Alber, D.V.M; and Werner Stenzel, M.D.

* geteilte Erstautorenschaft

unter Revision beim Journal of Neuropathology and experimental Neurology

- Versuchsdurchführung sowie Erhebung und Auswertung eines Großteils der zugrundeliegenden Daten per Durchflusszytometrie und qPCR sowie Beisteuern immunhistochemischer Färbungen

Abstract:

Journal of Neuroimmunology, Volume 228, Issues 1-2, 15. November 2012, page 81

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Originalartikel

a) veröffentlicht:

Held J, Preuße C, Döser A, **Richter L**, Heppner FL, Stenzel W. Enhanced acute immune response in IL-12p35^{-/-} mice is followed by accelerated distinct repair mechanisms in Staphylococcus aureus-induced murine brain abscess. J Infect Dis 2013;208:749-60

Piehler D, Stenzel W, Grahnert A, Held J, **Richter L**, Köhler G, Richter T, Eschke M, Alber G, Müller U. Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T-helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis. Am J Pathol 2011;179:733-44

b) unter Revision:

Alternative activation of macrophages in Staphylococcus aureus-induced brain abscess is not dependent on functional IL-4R α signalling.

Lydia Zobel*; Josephin Held, PhD*; Frank L. Heppner, M.D.; Frank Brombacher, PhD; Gottfried Alber, D.V.M; and Werner Stenzel, M.D.

* geteilte Erstautorenschaft

unter Revision beim Journal of Neuropathology and experimental Neurology

2. Abstract:

Journal of Neuroimmunology, Volume 228, Issues 1-2, 15. November 2010, page 81

3. Poster:

Richter L, Held J, Preuße C, Meisen M, Heppner FL, Stenzel W. Distinct macrophage subsets with divergent phenotypes and functional properties in murine brain abscess.

präsentiert auf dem International Congress of Neuroimmunology in Sitges/Barcelona, Spanien 2010

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Heppner für die Möglichkeit meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen sowie beim gesamten Team der Neuropathologie bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Werner Stenzel, dessen endlose Geduld, Hilfsbereitschaft und Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Er war nicht nur zu jeder Zeit für konstruktive Diskussionen erreichbar, sondern schaffte auch durch seine freundschaftliche Art eine unglaublich angenehme Arbeitsatmosphäre und ermöglichte mir die Teilnahme am International Congress of Neuroimmunology in Sitges/Barcelona. Die Zusammenarbeit mit ihm hat mich persönlich und meinen wissenschaftlichen Werdegang in vielerlei Hinsicht bereichert. Ich hätte mir keinen besseren Doktorvater vorstellen können.

Zudem gilt mein großer Dank der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Werner Stenzel, allen voran Alexandra Döser, Josephin Held sowie Corinna Preuße. Ihr habt wahrlich maßgeblichen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Bei euch, Mama, Papa und Matthias, für eure bedingungslose Unterstützung bei all meinen Vorhaben und Entscheidungen und euer Vertrauen in mich.