

**Die Funktion der inflammatorischen CCR2<sup>+</sup> Monozyten bei der postnatalen  
Mikrogliaentwicklung und bakteriellen Meningitis**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades  
„Doctor rerum naturalium“  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Alexander Mildner**  
aus Hannover

Göttingen 2007

---

D7

Referent: Prof. Dr. D. Doenecke

Korreferent: Prof. Dr. U. Groß

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2008

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die angeborene Immunabwehr.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die mononukleären Phagozyten.....</b>	<b>1</b>
1.2.1 Dendritische Zellen.....	2
1.2.2 Granulozyten.....	3
1.2.3 Makrophagen.....	4
<b>1.3 Die Mikroglia.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Die Mikrogliaentwicklung.....	7
1.3.2 Die Blut-Hirn-Schranke.....	8
<b>1.4 Funktionelle Aspekte der angeborenen Immunität bei der bakteriellen Meningitis.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Zielsetzung.....</b>	<b>11</b>
<b>2. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Publikation I: “Microglia in the adult brain arise from Ly-6C<sup>hi</sup> CCR2<sup>+</sup> monocytes only under defined host conditions”.....</b>	<b>12</b>
Summary.....	13
Introduction.....	13
Results.....	14
Discussion.....	19
Methods.....	21
Literature cited.....	21
Supplementary Figures.....	23
<b>2.2 Publikation II: “Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup>Granulocytes rather than Ly-6C<sup>hi</sup> CCR2<sup>+</sup> monocytes are required for the control of bacterial infection in the central nervous system.....</b>	<b>25</b>
Summary.....	26
Introduction.....	27
Results.....	29
Discussion.....	33
Figures.....	38
Material and Methods.....	45
Literature cited.....	48

---

<b>3. DISKUSSION.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Diskussion Publikation I.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1.1 Die hämatopoetische Vorläuferzelle der Mikroglia.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1.2 Die postnatale Mikrogliaentwicklung: eine Kontroverse?.....</b>	<b>53</b>
3.1.2.1 Einfluss der Bestrahlung auf die Homöostase im Gehirn.....	54
3.1.2.2 Einfluss der Bestrahlung auf die Integrität der Blut-Hirn- Schranke.....	56
<b>3.2 Diskussion Publikation II.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2.1 Rolle der angeborenen Immunabwehr während der bakteriellen Meningitis.....</b>	<b>58</b>
3.2.1.1 Rolle der Gewebemakrophagen.....	58
3.2.1.2 Rolle der neutrophilen Granulozyten.....	59
3.2.1.3 Rolle der Monozyten.....	60
<b>3.2.2 Die putative Funktion der Monozyten/Makrophagen.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.3 Mögliche Auswirkung auf neue Behandlungsmethoden.....</b>	<b>63</b>
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>65</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>67</b>

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$	anti-
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CCL2	Ligand des Chemokinrezeptors 2
CCR2	Chemokinrezeptor 2
CFU	colony-forming unit
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
IDC	Inflammatorische dendritische Zelle
kDa	kilo Dalton
KM	Knochenmark
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

---

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Die angeborene Immunabwehr

Das Immunsystem ist das wesentliche Abwehrsystem von Mensch und Tier gegenüber infektiösen, zum Teil pathogenen Organismen, wie z.B. Bakterien, Viren oder Pilzen. Eine wesentliche Eigenschaft des Immunsystems ist es, körperfremde Stoffe wie die erwähnten Krankheitserreger zu erkennen und zu bekämpfen. Dabei muss die Abwehr innerhalb kürzester Zeit einsetzen, um eine Verbreitung des Pathogens zu verhindern. Zu diesem schnell einsetzenden, sogenannten angeborenen Immunsystem zählen nicht nur anatomische und chemische Barrieren, wie Epithelien oder antimikrobielle Peptide in Körperflüssigkeiten, die das Eindringen von Pathogenen erschweren (SANSONETTI, 2004), sondern auch eine zellvermittelte, unspezifische Immunabwehr. Diese zellvermittelte Immunität wird hauptsächlich durch die Phagozyten gebildet, die sich aus dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten zusammensetzen (KAPETANOVIC und CAVAILLON, 2007). Die Phagozyten exprimieren eine große Anzahl an Rezeptoren, die konservierte Regionen von Fremdorganismen erkennen. Ein Beispiel für solche Rezeptoren sind *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) (ULEVITCH et al., 1999). TLR erkennen Oberflächenstrukturen, die im eigenen Organismus nicht vorkommen. So erkennt z.B. TLR4 Lipopolysaccharide, TLR5 Flagellin und TLR9 CpG-reiche DNA Sequenzen von Bakterien, oder TLR7 und TLR8 einzelsträngige RNA von Viren. Die Bindung des Liganden an den spezifischen TLR führt zu einer Aktivierung eines Phagozyten und damit zu der einleitenden Immunreaktion (OZINSKY et al., 2000). Im Folgenden sollen die einzelnen Phagozyten vorgestellt werden, die bei der angeborenen Immunabwehr eine Rolle spielen.

## 1.2 Die mononukleären Phagozyten

Alle zellulären Bestandteile des Blutes stammen von einer Vorläuferzelle ab, die im Knochenmark (KM) lokalisiert ist (VISSER et al., 1984). Aus dieser pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle entstehen einerseits die lymphoiden Zellen, wie die T-, NK- und B-Zellen, und andererseits die myeloische Zelllinie, aus der sich die verschiedenen Phagozyten differenzieren (BABA et al., 2004).

### 1.2.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) repräsentieren eine Gruppe der myeloischen Zellen. Ihr Name leitet sich aus dem lateinischen Wort *dendriticus* ab und verweist auf die verzweigte Morphologie der Zelle. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, im Gewebe Pathogene zu erkennen und diese durch phagozytotische Prozesse aufzunehmen. Im Gegensatz zu anderen Phagozyten wie Gewebemakrophagen verlassen die DC nach der Phagozytose das Gewebe und wandern in die peripheren lymphatischen Organe (BANCHEREAU und STEINMAN, 1998). Dort präsentieren sie kleine Peptidbestandteile des Pathogens über Histokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex*, MHC) T- und B-Lymphozyten, die dadurch aktiviert werden (SAVINA und AMIGORENA, 2007). Die DC werden daher auch professionelle antigenpräsentierende Zellen genannt. Aufgrund dieser Eigenschaft kommt den DC eine Sonderstellung innerhalb der mononukleären Phagozyten zu: Sie verknüpfen die angeborene Immunantwort mit der spezifischen, adaptiven Immunität, die über T-Zellen und B-Zellen vermittelt wird (BANCHEREAU et al., 2003). Mehrere Subpopulationen von DC mit unterschiedlichen Oberflächenmarkern und biologischen Funktionen sind identifiziert worden. Einige Beispiele für die Heterogenität der DC seien hier genannt:

Langerhans-Zellen sind langlebige DC in der Epidermis der Haut sowie in den Schleimhäuten. Sie stammen von inflammatorischen Monozyten ab (GINHOUX et al., 2006) und migrieren nach der phagozytotischen Aufnahme von Antigenen in die regionalen Lymphknoten, wo sie T-Lymphozyten aktivieren (ASAHINA und TAMAKI, 2006).

Die zirkulierenden plasmazytoiden DC sind auf die Erkennung von Viren spezialisiert. Bei einer Virusinfektion ist dieser Zelltyp verantwortlich für die Bildung der antiviralen Typ I Interferone IFN  $\alpha$  und IFN  $\beta$  (SIEGAL et al., 1999).

Eine erst kürzlich beschriebene Klasse der DC sind die inflammatorischen DC (IDC). Sie entstehen erst im Zuge von Infektionen und sind daher unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar. IDC konnten nach der Aktivierung von plasmazytoiden DC mit dem Influenzavirus (O'KEEFFE et al., 2002) oder auch nach der Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes* detektiert werden (SERBINA et al., 2003). Im Gegensatz zu anderen DC Subpopulationen, produzieren IDC *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF-  $\alpha$ ) und *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) und werden daher auch Tip-DC genannt. Auch diese Zellpopulation stammt von inflammatorischen Monozyten ab (SERBINA et al., 2003).

Die DC leiten also in der frühen Phase einer Infektion die adaptive Immunabwehr ein, indem sie Pathogene aufnehmen und in die Lymphknoten migrieren. Dort präsentieren

sie die Antigene über die MHC an T-Zellen. Ihr Beitrag zur lokalen Eindämmung von Pathogenen während der ersten Tage einer Infektion ist daher nicht essentiell.

### 1.2.2 Granulozyten

Eine weitere Gruppe der mononukleären Phagozyten sind die Granulozyten, die die zahlreichste Leukozytenpopulation im Blut darstellen. Ihren Namen erhielten sie aufgrund der deutlich anfärbbaren Granula im Zytoplasma. Es gibt drei Arten von Granulozyten, die alle verhältnismäßig kurzlebig sind.

Neutrophile Zellen bilden die umfangreichste und wichtigste zelluläre Komponente der angeborenen Immunität. Mit einem Anteil von 50-65% gehören sie zu den häufigsten Leukozyten im Blut. Nach einer Infektion verlassen die zirkulierenden neutrophilen Granulozyten das Blut und infiltrieren als erste Zellpopulation das entzündete Gewebe (YAMASHIRO et al., 2001). Neutrophile sind maßgeblich an der Eindämmung von bakteriellen Infektionen beteiligt (MEHRAD et al., 1999, TSAI et al., 2000).

Eosinophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von parasitischen Infektionen und repräsentieren nur 5% der mononukleären Zellen des Blutes (GLEICH und LOEGERING, 1984).

Die letzte Gruppe der Granulozyten stellen die basophilen Zellen dar. Im Differentialblutbild machen sie nur einen geringen Anteil aus (< 2 %). Auch Basophile sind an der Bekämpfung von parasitischen Infektionen beteiligt und ergänzen damit die Funktionen der Eosinophilen und Mastzellen (ANTHONY et al., 2007).

Eine der Haupteigenschaften, die Granulozyten auszeichnet, ist die Fähigkeit zur respiratorischen Entladung (*respiratory burst*) (GOLDSTEIN et al., 1975). Dabei werden aus den Inhalten der Speichervakuolen reaktive Sauerstoffderivate – z.B. Superoxid ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), die unspezifisch zur Immunabwehr und zur lokalen Zerstörung des Gewebes beitragen (BERTON et al., 1999) – abrupt in den Entzündungsbereich entladen. Weiterhin exprimieren Granulozyten Rezeptoren, die konservierte Fremdoberflächenstrukturen wie z.B. bakterielle Bestandteile erkennen (PARKER et al., 2005). Die Bindung eines Erregers an solche Rezeptoren führt zur Phagozytose des Fremdorganismus, der innerhalb spezialisierter Granula, den sogenannten Lysosomen, im Granulozyt abgetötet wird. Mit Hilfe von spezifischen Enzymen wie dem Lysozym, welches die Zellwand von Gram-positiven Bakterien zerstört, und antimikrobiellen Peptiden wie Lactoferrin werden die Erreger weiter abgebaut (HWANG et al., 1998). Die Aktivierung des neutrophilen Granulozyten hat außerdem die Ausschüttung einer Vielzahl von Proteinen zur Folge, die entscheidend zum weiteren Entzündungsvorgang beitragen: Das *macrophage infiltrating protein-1 $\alpha$*

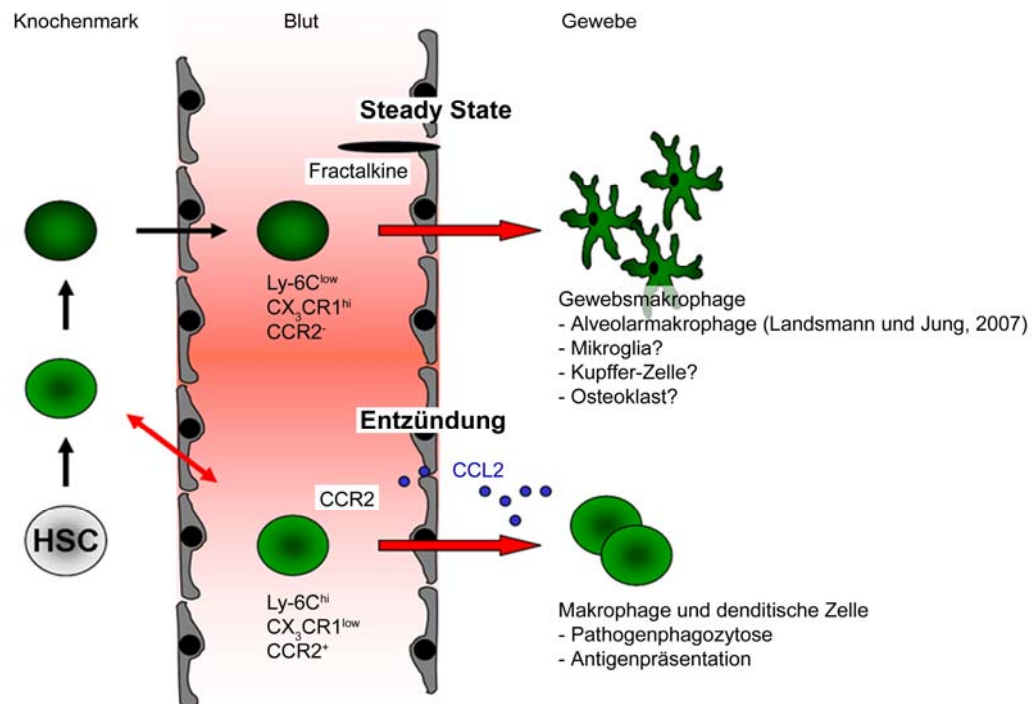


---

(MIP-1 $\alpha$ ) führt zur Rekrutierung von Monozyten, *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) stellt einen Überlebens- und Wachstumsfaktor der Granulozyten dar und TNF- $\alpha$  erhöht die Permeabilität der Endothelzellen (CASSATELLA, 1999). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neutrophile Granulozyten die ersten Blutzellen darstellen, welche das entzündete Gewebe infiltrieren und damit zur initialen Eindämmung der Infektion beitragen.

### 1.2.3 Makrophagen

Makrophagen bilden eine weitere Gruppe der Phagozyten. Die Größe der Zelle sowie ihre phagozytotischen Eigenschaften begründen den Namen *Macrophagocytus*. Sie kommen im Gegensatz zu Granulozyten auch unter nicht-pathologischen Bedingungen in vielen Körpergeweben vor und werden dann auch als Histozyten oder Gewebemakrophagen bezeichnet. Fast jedes Organ weist eine solche Klasse spezialisierter Gewebemakrophagen auf: In der Lunge findet man Alveolarmakrophagen, in der Leber die Kupffer-Zellen, in den Knochen die Osteoklasten und im Zentralnervensystem die Mikroglia (VAN FURTH und COHN, 1968). Diese ausdifferenzierten, langlebigen Makrophagen suchen die Organe auf eventuelle Schäden oder Pathogene ab. Gelangt ein Mikroorganismus über die Epithelzellen in das Innere des Körpers, so werden die Gewebemakrophagen als erstes u.a. über die TLR aktiviert und setzen damit die Entzündungsreaktion in Gang (OZINSKY et al., 2000). Aktivierte Makrophagen sind wie Granulozyten zur Phagozytose befähigt (ADEREM und UNDERHILL, 1999) und sezernieren des Weiteren eine Vielzahl von chemotaktisch aktiven Proteinen, die zu einer Rekrutierung von Granulozyten und weiteren Monozyten aus dem Blut führt. Diese unreifen, im Blut vorkommenden Monozyten sind die Vorläuferzellen der an dem entzündlichen Prozess teilnehmenden Makrophagen. Im Blut der Maus sind zwei unterschiedliche Monozytensubpopulationen identifiziert worden: die inflammatorischen Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten sowie die residenten Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten (GEISSMANN et al., 2003). Beide Populationen unterscheiden sich in ihren migratorischen Eigenschaften, was auf ein unterschiedliches Spektrum an Migrationsrezeptoren zurückzuführen ist (Abb. 1).



**Abb. 1: Modell zur Dichotomie der Monozyten-Subpopulationen.** Alle Blutzellen stammen von einer gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzelle (HSC) im Knochenmark ab. Diese differenziert sich zu Ly-6C<sup>hi</sup>, inflammatorischen (hellgrün) und Ly-6C<sup>low</sup>, residenten (dunkelgrün) Monozyten. Im Blut reagieren die Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten durch die Bindung von CCL2 an CCR2 auf inflammatorische Prozesse, wohingegen residente Monozyten die Vorläuferzellen für Gewebemakrophagen darstellen könnten (nach GEISSMANN et al., 2003).

Inflammatorische Monozyten exprimieren Rezeptoren wie den Chemokinrezeptor 2 (CCR2), der bei Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielt. Einer der Liganden für CCR2 ist das *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1 oder CCL2), welches von vielen aktivierten Zelltypen produziert werden kann (YOSHIMURA und LEONARD, 1991), um chemotaktisch Monozyten in das entzündete Gewebe zu locken. Wie wichtig CCR2 für die angeborene Immunantwort ist, zeigen Studien, bei denen der Chemokinrezeptor genetisch ausgeschaltet wurde (KUZIEL et al., 1997). PETERS und Kollegen (2001) konnten zeigen, dass CCR2 defiziente (CCR2<sup>-/-</sup>) Mäuse extrem anfällig für die Infektion mit dem Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* waren, was zu einer erhöhten Mortalitätsrate führte. Einher ging dieser Phänotyp mit einer deutlichen Reduktion an infiltrierenden Monozyten in der betroffenen Lunge (PETERS et al., 2001). Ähnliches wurde bei der Infektion von CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen mit *Aspergillus fumigatus* (BLEASE et al., 2000), *Listeria monocytogenes* (KURIHARA et al., 1997) und *Leishmania major* (SATO et al., 2000) beobachtet. Auch der Zelltransfer von sortierten Monozytenpopulationen hat bewiesen, dass nur die Ly-6C<sup>hi</sup> und nicht die Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten in das entzündete Gewebe migrieren können (GEISSMANN et al., 2003).

Doch nicht nur inflammatorische Prozesse, sondern auch homöostatische Prozesse sind abhängig von der Präsenz des CCR2. So weisen CCR2<sup>-/-</sup> Mäuse unter physiologischen Bedingungen eine stark reduzierte Anzahl an Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten im peripheren Blut auf, was jüngst auf eine gestörte Emigration dieser Zellen aus dem KM in das Blut zurückgeführt werden konnte (SERBINA und PAMER, 2006). Residente, Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten hingegen exprimieren kein CCR2. Dafür besitzen diese Zellen Rezeptoren, die konstitutiv vorhandene Chemokine binden und daher unter nicht-pathologischen Bedingungen eine entscheidende Rolle spielen. Beispielhaft sei hier nur auf den Fractalkinerezeptor CX<sub>3</sub>CR1 hingewiesen, der auf Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten deutlich stärker exprimiert wird. Fractalkine, der Ligand für CX<sub>3</sub>CR1, kommt hauptsächlich auf Epithelzellen als transmembranes Protein vor (LUCAS et al., 2001) und ermöglicht die Adhäsion von Zellen an die Epithelien. Dies stellt den ersten Schritt bei der transmembranen Migration dar, durch die Zellen in das umgebende Gewebe gelangen. Aus diesen Gründen wird diskutiert, dass die residenten Monozyten die Vorläuferzellen für Gewebemakrophagen wie die Mikroglia oder Alveolarmakrophagen in der Lunge sein könnten, was zumindest für letztere kürzlich gezeigt werden konnte (LANDSMAN und JUNG, 2007).

### 1.3 Die Mikroglia

Die Mikroglia, nach ihrem Entdecker auch Hortega-Zellen genannt, sind die residenten, mononukleären Phagozyten des Zentralnervensystems (ZNS). Unter nicht-pathologischen Konditionen sind die Mikroglia durch eine weit verzweigte Morphologie gekennzeichnet. Während das Soma der Zelle relativ fixiert im Gewebe verbleibt, sind die mikroglialen Fortsätze stets in Bewegung (NIMMERJAHN et al., 2005). Diese dynamische und kontinuierliche Bewegung erlaubt es der Zelle die Umgebung auf jegliche Arten von Veränderungen abzusuchen – z.B. auf den Zelltod von Neuronen oder das Eindringen von Pathogenen. Trifft sie auf solche pathologischen Bedingungen, wird die Mikroglia aktiviert und entwickelt alle Effektorfunktionen, die einen aktivierten Makrophagen kennzeichnen (HANISCH und KETTENMANN, 2007). Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Mikroglia als primäre Immunzelle des ZNS angesehen.

### 1.3.1 Theorien zum Ursprung der Mikroglia

Erstmals wurde die Mikroglia 1919 von Rio Hortega beschrieben, der sie als separate Zellpopulation neben Astrozyten und Neuronen im ZNS identifizierte (REZAIÉ und MALE, 2002). Der Ursprung der Mikroglia jedoch wird seit einigen Jahrzehnten diskutiert und ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt (CUADROS und NAVASCUES, 1998). Es gibt verschiedene Theorien die postulieren, dass die Mikroglia aus

- i) dem Neuroektoderm (wie Oligodendrozyten und Astrozyten),
- ii) einer langlebigen, im ZNS lokalisierten, hämatopoetischen Vorläuferzelle,
- iii) dem peripheren mesenchymalen Gewebe oder
- iv) aus zirkulierenden Blutmonozyten hervorgehen.

Aktuelle Daten unterstützen die letzten beiden Theorien (CHAN et al., 2006). Die ersten Zellen, die Oberflächenmarker von Mikroglia im ZNS aufweisen, können im Menschen während der fetalen Entwicklung in den Schwangerschaftswochen 12-15 (REZAIÉ et al., 2005) und in Mäusen ab dem embryonalen Stadium E9.5 festgestellt werden (ALLIOT et al., 1999). Histologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Kolonisierung des ZNS von Vorläuferzellen aus der Leber ausgeht und daher mesenchymalen Ursprungs sein muss (CHAN et al., 2006). Eine weitere, seit Jahren akzeptierte Theorie besagt, dass die Mikroglia, wie alle anderen geweberesidenten, mononukleären Phagozyten, von Monozyten aus dem Blut abstammen. Diese Hypothese basiert auf Experimenten, bei denen Mäuse ionisierter Strahlung ausgesetzt wurden, sodass die endogenen, stark proliferierenden hämatopoetischen Stammzellen im KM absterben. Aufgrund dieser akuten Lymphopenie sterben die bestrahlten Mäuse innerhalb weniger Tage, wenn man ihnen nicht unmittelbar nach der Bestrahlung vitale KM-Zellen injiziert. Diesen Umstand haben sich Forschergruppen zunutze gemacht und genetisch verändertes KM transplantiert. So konnten HICKEY und KIMURA (1988) zum ersten Mal zeigen, dass nach der Transplantation von KM der Lewis Ratte in bestrahlte DA Ratten die transplantierten KM-Zellen im ZNS nachweisbar waren und die charakteristische Morphologie von Mikroglia aufwiesen. Die eindeutige Identifizierung der Spenderzellen gelang durch die Verwendung unterschiedlicher Rattenstämme (Lewis und DA Ratten), die verschiedene MHC exprimieren. Die Ergebnisse wurden später von weiteren Forschergruppen bestätigt, die KM-Zellen mit einem Lentivirus transfizierten, der für das *green fluorescent protein* (GFP) kodierte (PRILLER et al., 2001a). Die transfizierten KM-Zellen wurden in bestrahlte Empfängertiere transplantiert und zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Präsenz von Mikroglia untersucht. GFP-exprimierende, stark verzweigte Zellen konnten in den Regionen Zerebellum, Hippocampus und im Bulbus olfactorius des Gehirns nachgewiesen werden. Diese Experimente zeigten, dass

neben der pränatalen Mikrogliaentwicklung auch eine postnatale Entwicklungslinie existieren muss. So scheinen hämatopoetische Vorläuferzellen in der Lage zu sein, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) auch unter nicht-pathologischen Bedingungen zu überwinden und sich zu Mikroglia differenzieren zu können. Eine eindeutige Identifizierung dieser Vorläuferzelle gelang allerdings noch nicht. GEISSMAN und Kollegen (2003) postulieren, dass die residenten Monozyten im Blut die Vorläuferzelle für alle Gewebemakrophagen sind, wohingegen die inflammatorischen Monozyten die Vorläufer von Makrophagen und DC darstellen, die nur bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen (siehe Abb.1).

### 1.3.2 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Relevanz einer Immunzelle im ZNS wird besonders deutlich, wenn man berücksichtigt, dass sich das ZNS von anderen Organen durch zwei maßgebliche Eigenschaften unterscheidet: Durch seinen „immunprivilegierten“ Status und der dazu beitragenden BHS. Der Begriff „Immunprivileg“ wurde zwar erstmals in der Veröffentlichung von BILLINGHAM und BOSWELL (1953) verwendet, aber das ausschlaggebende Experiment, welches auf eine Extrastellung des ZNS hindeutete, wurde bereits 1921 von dem Japaner SHIRAI durchgeführt. SHIRAI transplantierte ein aus der Ratte stammendes Sarkom in das Hirnparenchym einer Maus (SHIRAI, 1921). Im Gegensatz zu der Abstoßung dieses Tumors bei subkutaner oder intramuskulärer Transplantation wuchs der Tumor im Hirngewebe der Maus stetig. Dieses Experiment belegte zum ersten Mal, dass das Überleben des Tumors im Hirnparenchym durch die Abgrenzung des ZNS vom systemischen Immunsystem gewährleistet wird.

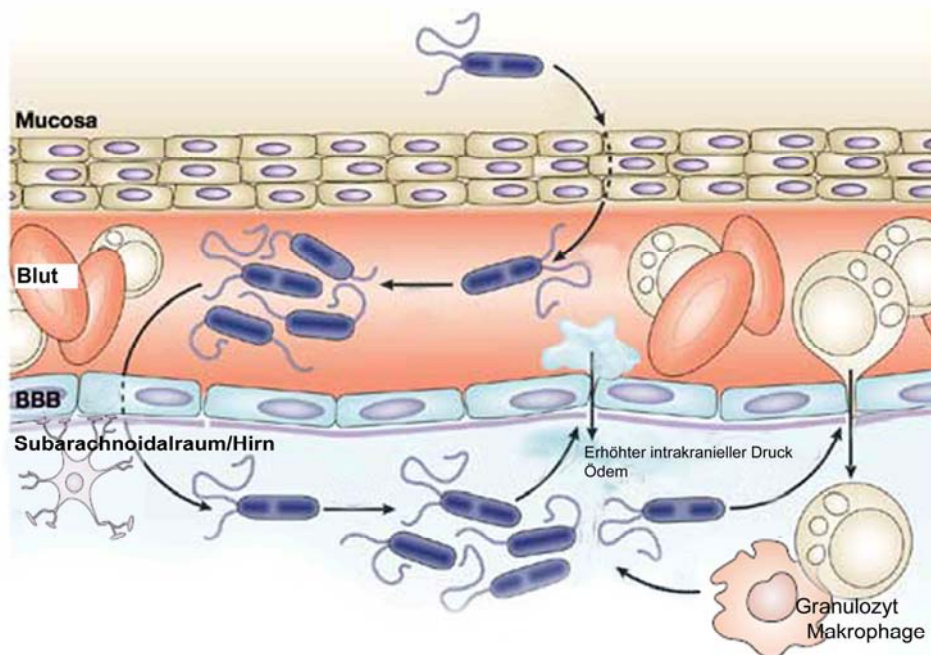
Einen entscheidenden Beitrag zu dieser Abgrenzung des ZNS vom Immunsystem leistet die BHS. Sie wurde 1885 von PAUL EHRLICH beschrieben, als er in einer Serie von Experimenten den Sauerstoffstatus verschiedener Organe vergleichen wollte. Er applizierte Ratten intravenös Lösungen, vor allem Anilin, dessen Farbe sich durch seinen Redoxzustand veränderte. Als er die Organe analysierte, stellte er fest, dass sich die peripheren Organe anfärben ließen, das Gehirn aber nicht. Er schlussfolgerte daraus: „Weiterhin ergibt sich unter diesen Voraussetzungen, dass die Aufnahme [sic!] beherrschenden Flächen am Gehirn [...] feinstporöse Beschaffenheit besitzen, während im Gegenteil Leber und Nierenzellen grobkörniges Material durchlassen.“ (EHRLICH, 1885). Dieser Unterschied ließ sich molekularbiologisch nachweisen. Im Gegensatz zu Endothelzellen, die die Blutgefäße in der Leber oder ähnlichen Organen bilden, sind die Endothelzellen der ZNS-Blutgefäße durch spezialisierte *tight junction*-Proteine wie Occludin und ZO-1 (DOBROGOWSKA und VORBRODT, 2004) fest

miteinander verbunden. Diese *tight junction*-Proteine kommen bis zu fünfmal häufiger auf Hirndothelzellen vor als auf Endothelzellen anderer Gewebe (HIRASE et al., 1997). Die Differenzierung dieser speziellen Endothelzellen und die Ausbildung der *tight junction* werden wiederum von den hirnspezifischen Astrozyten gesteuert (HAYASHI und YAMAMOTO, 1997). Durch den Aufbau einer solchen physiologischen Barriere wird gewährleistet, dass die Homöostase im Gehirn aufrechterhalten wird und von den Milieubedingungen des Blutes abgegrenzt bleibt. Des Weiteren gelangen so polare Substanzen nicht mittels des parazellulären Transports aus dem Blut in das Hirngewebe. Doch die BHS stellt nicht nur eine Barriere für wasserlösliche Substanzen und Moleküle dar, sondern auch für zirkulierende Immunzellen, was die Ergebnisse von SHIRAI (1921) und die Postulierung des Immunprivilegs erklärt. Aufgrund dieser Eigenschaft ist das ZNS vom systemischen Immunsystem isoliert und so vor Infektionen geschützt, die in der Peripherie stattfinden.

#### **1.4 Funktionelle Aspekte der angeborenen Immunität bei der bakteriellen Meningitis**

Die bakterielle Meningitis ist eine Entzündungskrankheit der Hirnhäute, bei der vor allem die auf dem Hirn aufliegenden Bindegewebshüllen wie die *Pia mater* und die *Arachnoidea* betroffen sind. Mit weltweit knapp 200.000 Todesfällen pro Jahr wird die bakterielle Meningitis als eine der zehn häufigsten Infektionskrankheiten gelistet (FAUCI, 2001). Von den Überlebenden zeigen 30-50% erhebliche neurologische Langzeitfolgen (GRIMWOOD et al., 2000). Hervorgerufen wird die bakterielle Meningitis durch eine Vielzahl von Bakterienarten, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* oder auch *Escherichia coli*, die über verschiedene Infektionswege, wie die Schleimhäute (Mucosa), in den Körper gelangen und meist nach einer Vermehrung im Blut die BHS passieren. Wie genau das Bakterium die BHS überwindet, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Bisher weiß man lediglich, dass das Bakterium zur Bindung an die mikrovaskulären Endothelzellen des Hirns befähigt sein (RUDRABHATLA et al., 2006) und während der transzellulären Migration durch die Endothelzelle überleben muss, was häufig mit der Befähigung zur Kapselbildung des Erregers assoziiert ist (HOFFMAN et al., 1999). Allerdings führt die Transzytose des Bakteriums dabei nicht zu einer erhöhten Permeabilität der BHS (KIM et al., 1997). Nach der Überquerung der BHS kommt es im Subarachnoidalraum zu einer weiteren Teilung der Bakterien (TUOMANEN et al., 1985). Über bakterielle Bestandteile wie z.B. Lipopolysaccharide kommt es zu einer Aktivierung von Endothelzellen und residenten

Gewebemakrophagen wie Meningealmakrophagen oder Mikroglia, die durch die Sekretion von TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) gekennzeichnet ist (BEUTLER et al., 1987). IL-1 $\beta$  bewirkt die Öffnung der BHS und erleichtert somit den weiteren Eintritt von neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus der Peripherie (FAUSTMANN et al., 1995; ANDERSSON et al., 1992). Durch die Effektorfunktionen der aktivierten neutrophilen Granulozyten und der in Makrophagen ausdifferenzierten Monozyten kommt es dann zu einer Bekämpfung des Pathogens. In Abbildung 2 ist schematisch der Infiltrationsweg der Bakterien dargestellt, sowie die am Entzündungsprozess beteiligten Zellen.



**Abb. 2 Infektionsweg eines Bakteriums während der Pathogenese der bakteriellen Meningitis.** Das Bakterium dringt über die Schleimhaut (Mucosa) in den Blutkreislauf ein, wo es zu einer Vermehrung des Erregers kommt. Anschließend durchquert es mittels Transzytose die Blut-Hirn-Schranke und kolonisiert den Subarachnoidalraum. Die Aktivierung von residenten Gewebemakrophagen führt zu einer Rekrutierung von Phagozyten aus dem Blut (Graphik nach KIM, 2003).

### **1.5 Zielsetzung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen zwei Hauptfragen geklärt werden:

- i) Zum einen soll die hämatopoetische Vorläuferzelle der postnatalen Mikroglia identifiziert und die Konditionen definiert werden, die notwendig sind, um eine Migration aus dem peripheren Blut in das Zentralnervensystem zu erreichen.
- ii) Zum anderen soll die Phagozytenpopulation beschrieben werden, die während der experimentellen Meningitis in der Maus protektive Eigenschaften besitzt und daher als putatives, therapeutisches Ziel fungieren könnte.



---

## 2. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

### 2.1 Publikation I

---

#### MICROGLIA IN THE ADULT BRAIN ARISE FROM Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> MONOCYTES ONLY UNDER DEFINED HOST CONDITIONS

---

Alexander Mildner<sup>1</sup>, Hauke Schmidt<sup>1</sup>, Mirko Nitsche<sup>2</sup>, Doron Merkler<sup>1</sup>, Uwe-Karsten Hanisch<sup>1</sup>, Matthias Mack<sup>3</sup>, Mathias Heikenwalder<sup>4</sup>, Wolfgang Brück<sup>1,5</sup>, Josef Priller<sup>6#</sup>  
and Marco Prinz<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Institute of Neuropathology, Georg August University, Göttingen, Germany

<sup>2</sup> Department of Radiation Oncology, Georg August University, Göttingen, Germany

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, University of Regensburg, Regensburg, Germany

<sup>4</sup> Institute of Neuropathology, Universitätsspital, Zurich, Switzerland

<sup>5</sup> Institute for Multiple Sclerosis Research, Georg August University, Göttingen, Germany

<sup>6</sup> Laboratory of Molecular Psychiatry and Department of Experimental Neurology, Charité- Universitätsmedizin Berlin, Germany

#both authors contributed equally

---

Published in:

Nature Neuroscience Dec 2007, 10 (12): 1544-1553

## ARTICLES

nature  
neuroscience

# Microglia in the adult brain arise from Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes only under defined host conditions

Alexander Mildner<sup>1</sup>, Hauke Schmidt<sup>1</sup>, Mirko Nitsche<sup>2</sup>, Doron Merkler<sup>1</sup>, Uwe-Karsten Hanisch<sup>1</sup>, Matthias Mack<sup>3</sup>, Mathias Heikenwalder<sup>4</sup>, Wolfgang Brück<sup>1,5</sup>, Josef Priller<sup>6,7</sup> & Marco Prinz<sup>1,7</sup>

Microglia are crucially important myeloid cells in the CNS and constitute the first immunological barrier against pathogens and environmental insults. The factors controlling microglia recruitment from the blood remain elusive and the direct circulating microglia precursor has not yet been identified *in vivo*. Using a panel of bone marrow chimeric and adoptive transfer experiments, we found that circulating Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes were preferentially recruited to the lesioned brain and differentiated into microglia. Notably, microglia engraftment in CNS pathologies, which are not associated with overt blood-brain barrier disruption, required previous conditioning of brain (for example, by direct tissue irradiation). Our results identify Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes as direct precursors of microglia in the adult brain and establish the importance of local factors in the adult CNS for microglia engraftment.

Microglia are an integral part of the resident mononuclear phagocyte population in the CNS. These cells share many phenotypical and functional characteristics with other tissue macrophages and with peripheral blood monocytes, suggesting that microglia participate in many immune reactions of the brain<sup>1</sup>. Microglia continuously monitor their local microenvironment with highly motile processes and constitute the first line of defense against invading pathogens<sup>2,3</sup>.

Microgliosis is a rather poorly understood process, despite it having a probable role in the pathogenesis of various CNS diseases<sup>4</sup>. One major issue is to determine the extent to which circulating monocytes contribute to the microglial response in the brain. Despite tremendous efforts in the past years, monocyte-derived and resident CNS parenchymal microglia remain virtually indistinguishable on the basis of known immunophenotypic markers, although they might be functionally heterogeneous<sup>5</sup>. Using chimeric mice, in which bone-marrow cells (BMCs) were marked with the green fluorescent protein (GFP), MHC class II, Y chromosome, congenic CD45.1/CD45.2 molecules and others, bone marrow-derived cells were shown to enter the brain during postnatal development and to differentiate into microglia<sup>6–8</sup>, but not into other glial cell types<sup>9</sup>. Subsequent studies in mice have even demonstrated enhanced microglia engraftment in several disease models, such as spongiform encephalopathies<sup>10,11</sup>, bacterial meningitis<sup>12</sup>, experimental autoimmune encephalomyelitis<sup>13</sup>, Parkinson's disease<sup>14</sup> and Alzheimer's disease<sup>5,15,16</sup>. Notably, bone marrow-derived microglia appeared to be functionally relevant in the brain; for example, they phagocytosed  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease transgenic mice, whereas resident microglia seemed to be rather ineffective in removing  $\beta$ -amyloid<sup>5</sup>. All of these chimeric mice studies used total

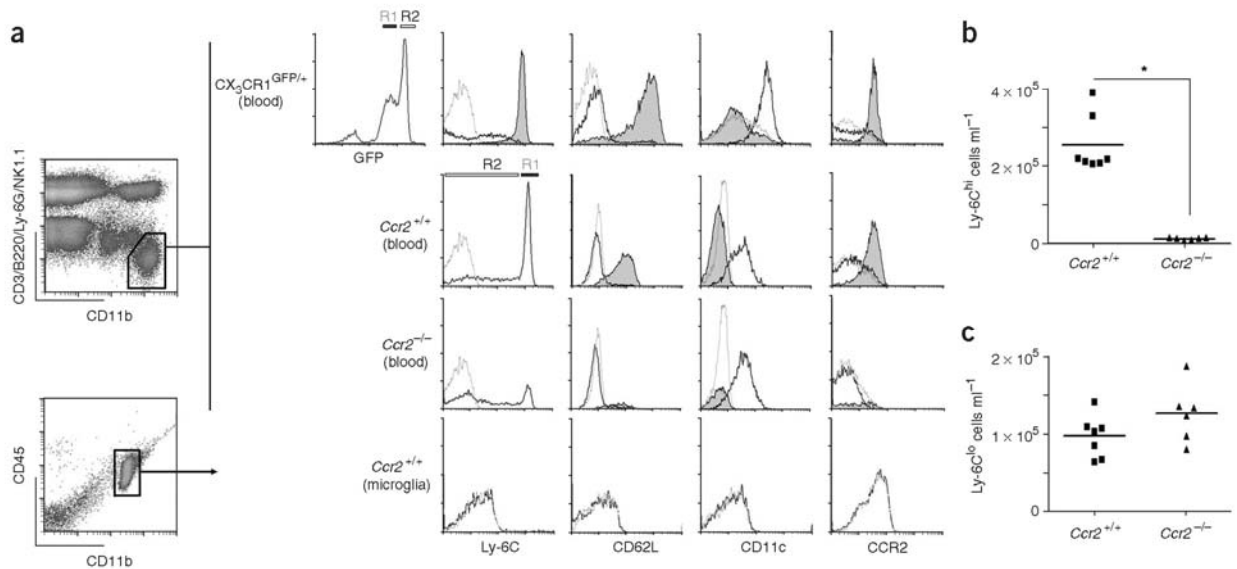
body irradiation as the conditioning regimen for the bone-marrow transplantation, thereby exposing the brain to potential irradiation-induced changes in the local microenvironment. Indeed, the few studies using nonirradiated parabiotic mice detected substantially less engrafted microglia in the brains<sup>17</sup>. Therefore, we designed a set of experiments using bone-marrow chimeric approaches to define the local conditions in the brain that allow the entry of blood-derived monocytes into the CNS and their differentiation into parenchymal microglia.

Furthermore, the direct circulating precursor of microglia in the peripheral blood has not yet been identified *in vivo*. Prevailing concepts view monocytes as intermediary cells that continuously develop in the bone marrow, circulate in the blood and migrate into tissues, where they become local macrophages, dendritic cells or other tissue descendants<sup>18</sup>. The identification of monocyte heterogeneity has led to the hypothesis that monocytes commit for specific functions while still in the circulation<sup>19</sup>. Indeed, both human and mouse monocytes fall into at least two phenotypically distinct subsets: Ly-6C<sup>hi</sup> (which are Gr-1<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>lo</sup>) and Ly-6C<sup>lo</sup> (which are Gr-1<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>) mouse monocytes, which correspond to human CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>–</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes, respectively<sup>20,21</sup>. It is generally thought that Ly-6C<sup>hi</sup> cells preferentially populate sites of experimentally induced inflammation, whereas their Ly-6C<sup>lo</sup> counterparts can enter lymphoid and nonlymphoid tissues under homeostatic conditions<sup>22</sup>.

Here we demonstrate that circulating Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes are direct circulating precursors of microglia in the blood. Genetic or antibody-mediated depletion of this specific monocyte subtype vastly prevented the recruitment of monocytes into the lesioned brain.

<sup>1</sup>Institute of Neuropathology and <sup>2</sup>Department of Radiation Oncology, Georg August University, Göttingen, Germany. <sup>3</sup>Department of Internal Medicine, University of Regensburg, Regensburg, Germany. <sup>4</sup>Institute of Neuropathology, Universitätsspital, Zurich, Switzerland. <sup>5</sup>Institute for Multiple Sclerosis Research, Georg August University, Göttingen, Germany. <sup>6</sup>Laboratory of Molecular Psychiatry, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany. <sup>7</sup>These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to M.P. (mprinz@med.uni-goettingen.de).

Received 17 May; accepted 25 October; published online 18 November 2007; doi:10.1038/nn2015



**Figure 1** Brain-specific macrophages (microglia) have an immunomarker profile similar to that of resident blood monocytes. (a) Blood monocytes (upper left density plot) of *Ccr2*<sup>+/+</sup>, *Ccr2*<sup>-/-</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> mice, and *ex vivo*-isolated microglia (lower left density plot) of *Ccr2*<sup>+/+</sup> mice were characterized by surface expression of the markers Ly-6C, CCR2, CD62L, CD11b and CD11c. Living blood cells were gated to determine the presence of CD11b<sup>hi</sup>CD3<sup>lo</sup>B220<sup>lo</sup>Ly-6G<sup>lo</sup>NK1.1<sup>lo</sup> monocytes (upper left). CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> mice were used to distinguish between CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> (R2, Ly-6C<sup>lo</sup>) and CX<sub>3</sub>CR1<sup>lo</sup> (R1, Ly-6C<sup>hi</sup>) blood monocytes. Percoll gradient-isolated microglia were gated as a CD45<sup>lo</sup>CD11b<sup>+</sup> cell population in the brain (lower left). R2 gates (thick lines) and R1 gates (filled curves) in the blood indicate Ly-6C<sup>lo</sup> and Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes, respectively. Isotype controls are shown as thin lines. (b) Adult CCR2-deficient mice showed a distinct lack of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes in the peripheral blood. Each symbol represents one individual mouse. The mean is indicated. Asterisk indicates statistical significance (*P* < 0.05). (c) No significant difference in the amount of Ly-6C<sup>lo</sup> monocytes was found in the peripheral blood of WT versus *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice. Each symbol represents one individual mouse. The mean is indicated.

Demyelinating and neurodegenerative CNS disease models without blood-brain barrier disruption were not sufficient to induce substantial microglia engraftment during adulthood, but additional host endogenous factors, such as irradiation-induced gene expression, were required to condition the adult brain for microglia engraftment.

**RESULTS**

**Microglia display surface markers of specific monocytes**

To test the hypothesis that a distinct subset of circulating monocytes represents the direct precursor of microglia in the adult brain, surface immunomarker expression of microglia was compared with circulating monocyte populations (Fig. 1). Monocytes in the peripheral blood were defined as CD11b<sup>hi</sup>CD3<sup>lo</sup>B220<sup>lo</sup>Ly-6G<sup>lo</sup>NK1.1<sup>lo</sup> mononuclear cells by flow cytometry as described previously (Fig. 1a)<sup>23</sup>. We took advantage of the CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> mice (GFP is inserted into one allele of the CX<sub>3</sub>CR1 locus), which allow division of the Ly-6C<sup>hi</sup> and Ly-6C<sup>lo</sup> fractions on the basis of GFP expression levels. Microglia were subsequently defined as being CD45<sup>lo</sup> and CD11b<sup>+</sup> according to the literature<sup>24</sup>. Notably, isolated microglia were CD62L<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup>Ly-6C<sup>lo</sup>, which was similar to the immunoprofile found on resident Ly-6C<sup>lo</sup> monocytes. This monocyte population, however, was reported to be CD11c<sup>+</sup> (ref. 23), which was not the case in isolated adult microglia.

A previous report claimed that the chemokine receptor CCR2 might also be required for the emigration of Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes from the bone marrow into the circulation<sup>25</sup>. Theoretically, this could cause a deficiency of this specific monocyte subpopulation in the peripheral blood stream. To test this hypothesis, we counted the number of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes in the blood of 8-week-old adult *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice and in age- and sex-matched *Ccr2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 1b). The amount of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes was substantially reduced in CCR2-deficient mice

compared with the wild-type (WT) situation (mean ± s.e.m., 1.2 ± 0.1 × 10<sup>4</sup> cells ml<sup>-1</sup> in *Ccr2*<sup>-/-</sup> and 25.6 ± 2.8 × 10<sup>4</sup> cells ml<sup>-1</sup> in WT mice). To ensure that only this specific monocyte subtype was affected, we examined the amount of Ly-6C<sup>lo</sup> monocytes (Fig. 1c). Notably, we found an unchanged amount of Ly-6C<sup>lo</sup> monocytes in CCR2-deficient mice compared to WT (mean ± s.e.m., 12.6 ± 1.7 × 10<sup>4</sup> cells ml<sup>-1</sup> in *Ccr2*<sup>-/-</sup> and 9.7 ± 1.0 × 10<sup>4</sup> cells ml<sup>-1</sup> in WT mice).

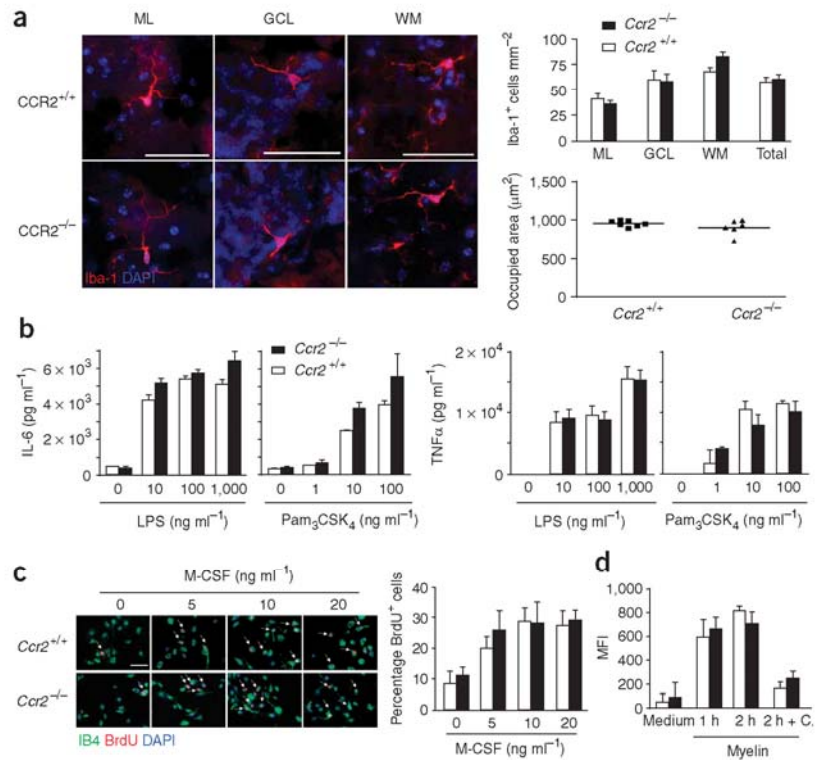
**CCR2-independent development and function of microglia**

Because the chemokine receptor CCR2 is crucial for monocyte and macrophage function (for example, for the chemotactic attraction during inflammation<sup>26</sup>), we investigated a potential role for CCR2 in the development and immunological properties of microglia. Morphology of brain microglia in the absence of CCR2 was assessed by using immunofluorescence staining with the macrophage and microglia marker Iba-1 (red, Fig. 2a). In different regions of the cerebellum (molecular layer, granular cell layer and white matter), Iba-1<sup>+</sup> parenchymal cells with typical round to spindle-shaped microglial morphology and distinct arborization pattern were undistinguishable in *Ccr2*<sup>+/+</sup> and *Ccr2*<sup>-/-</sup> brains (Fig. 2a, left). Quantitative morphometric analysis revealed comparable numbers of parenchymal Iba-1<sup>+</sup> microglia in different regions of the cerebellum. Cell dimension, as judged by the microglia occupying area (908 ± 40 μm<sup>2</sup> in *Ccr2*<sup>-/-</sup> and 957 ± 14 μm<sup>2</sup> in *Ccr2*<sup>+/+</sup>), was similar irrespective of the genotype (Fig. 2a, right).

We next examined the microglial ability to respond to the Toll-like receptors 2 and 4 ligands, lipopolysaccharide (LPS) and the lipopeptide Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, in a dose-dependent manner (Fig. 2b). Both CCR2-deficient and competent microglia produced similar amounts of the proinflammatory cytokines interleukin 6 (IL-6) and tumor

ARTICLES

**Figure 2** Normal development, morphology and function of microglia in the absence of CCR2. (a) Iba-1 immunohistochemistry (red) and DAPI staining of nuclei (blue) of cerebellar sections from 8-week-old *Ccr2<sup>+/+</sup>* and *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice revealed the same morphology and arborization pattern of parenchymal microglia in the molecular layer (ML), granule cell layer (GCL) and in the white matter (WM, upper left). Scale bars represent 40  $\mu\text{m}$ . The same number of Iba-1<sup>+</sup> ramified parenchymal cells was found in different localizations of the cerebellum (upper right). Data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. At least eight mice were examined for each group. Iba-1-immunoreactive areas in the cerebellar WM were quantified by determining the areas covered by the outer-most cell processes (lower right). For each mouse, at least 25 cells were assessed quantitatively. Each symbol represents the mean measurements in one mouse. The mean is indicated for each group. (b) Unaltered cytokine response in *Ccr2<sup>-/-</sup>* microglia. *Ccr2<sup>+/+</sup>* (white bars) or *Ccr2<sup>-/-</sup>* microglia (black bars) were exposed to increasing dosages of either LPS or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, and production of TNF $\alpha$  and IL-6 was measured by ELISA 18 h after exposition. Data represent means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. No statistically significant differences were detected ( $P > 0.05$ ). (c) Microglia cell proliferation does not require CCR2. Primary microglia were treated with different concentrations of M-CSF for 48 h. We added 10  $\mu\text{M}$  BrdU for 1 h and the cells were stained for isolectin B4 (green), BrdU (red) and DAPI (blue). Representative images are shown in the left panel. Scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ . Quantification of the percentage of BrdU<sup>+</sup> microglia revealed no differences in the proliferative responses of *Ccr2<sup>+/+</sup>* (white bars) or *Ccr2<sup>-/-</sup>* (black bars) microglia to M-CSF. (d) Mean fluorescence intensities (MFI) of *Ccr2<sup>+/+</sup>* (white bars) and *Ccr2<sup>-/-</sup>* (black bars) microglia ingesting fluorescein isothiocyanate-labeled myelin after 1 h, 2 h or after exposure of myelin with cytochalasin D for 2 h (+ C). Data represent means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments.



necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) after ligand challenge. In addition, surface expression of MHC class II molecules was upregulated to a similar degree after interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) stimulation (Supplementary Fig. 1 online). Recombinant IFN $\beta$ , in turn, counteracted the IFN $\gamma$ -induced MHC class II expression levels to a similar extent in *Ccr2<sup>+/+</sup>* and *Ccr2<sup>-/-</sup>* primary microglia. Because CCR2 may not only affect the activation response, we also investigated the effect of CCR2 on microglia proliferation (Fig. 2c). No difference was found in the ability of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) to stimulate microglia proliferation in the presence or absence of CCR2. We next exposed cultured microglia to fluorescently labeled myelin and measured the kinetics and quantity of myelin phagocytosis (Fig. 2d). Myelin uptake by microglia was independent of CCR2 expression, and could be specifically inhibited by incubation with cytochalasin D. Taken together, our data indicate that microglial development, morphology and innate immune functions are preserved in the absence of CCR2.

**Postnatal microglia derive from Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes**

As a result of the strong and specific reduction of the Ly-6C<sup>hi</sup> subpopulation in the absence of CCR2, *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice are a suitable tool for determining the monocyte fraction that might be the direct precursor of adult microglia in the peripheral blood. To do so, we generated double-transgenic mice by intercrossing ACT1 $\beta$  ( $\beta$ -actin)-EGFP mice with *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice. These mice express GFP on the *Ccr2<sup>+/+</sup>* (*Ccr2<sup>+/+</sup>*-GFP) or the *Ccr2<sup>-/-</sup>* (*Ccr2<sup>-/-</sup>*-GFP) background, respectively. To distinguish invading bone marrow-derived monocytes

from brain endogenous microglia during health and disease, we created bone-marrow chimeras. Respective GFP-marked BMCs were mixed with unlabeled WT BMCs (at a 1:3 ratio) and transplanted into lethally whole-body irradiated (including the brain) adult recipient mice. In the resulting *Ccr2<sup>+/+</sup>*-GFP  $\rightarrow$  *Ccr2<sup>+/+</sup>* chimeras (*Ccr2<sup>+/+</sup>*-Ch), both monocyte subsets express GFP, whereas chimeric *Ccr2<sup>-/-</sup>*-GFP  $\rightarrow$  *Ccr2<sup>+/+</sup>* mice (*Ccr2<sup>-/-</sup>*-Ch) express the fluorophore predominantly on Ly-6C<sup>lo</sup> monocytes. As expected, peripheral blood Gr-1<sup>hi</sup> (Ly-6C<sup>hi</sup>) monocytes were strongly diminished in chimeric *Ccr2<sup>-/-</sup>*-Ch mice compared with *Ccr2<sup>+/+</sup>*-Ch mice 4 weeks after bone-marrow transfer (exemplified in Fig. 3a). The general reconstitution efficacy, however, was similar in *Ccr2<sup>-/-</sup>*-Ch and *Ccr2<sup>+/+</sup>*-Ch mice, as indicated by comparable numbers of GFP<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> and GFP<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> lymphocytes (Fig. 3b).

To assess the ability of GFP-marked monocyte subsets derived from transplanted bone marrow to differentiate into microglia in the nondiseased brain, we analyzed recipient mice histologically 12 weeks after transplantation (Fig. 3c–e). Microscopical investigation of several CNS regions, such as the cerebellum, brain stem (Fig. 3c) and spinal cord (Fig. 3e), revealed some parenchymal cells with typical microglial morphology. These donor-derived GFP<sup>+</sup> cells were Iba-1<sup>+</sup> (Fig. 3c,e), as well as for the pan-macrophage marker F4/80 (Fig. 3d). Moreover, the engrafted cells were MHC class II<sup>-</sup> and were CD45<sup>lo</sup>, as determined by fluorescent-activated cells sorting (FACS) analysis (data not shown), providing further evidence for their microglial identity. Notably, however, engrafted GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells were predominantly found in the CNS of *Ccr2<sup>+/+</sup>*-Ch mice, whereas the number of engrafted microglia

© 2007 Nature Publishing Group http://www.nature.com/natureneuroscience

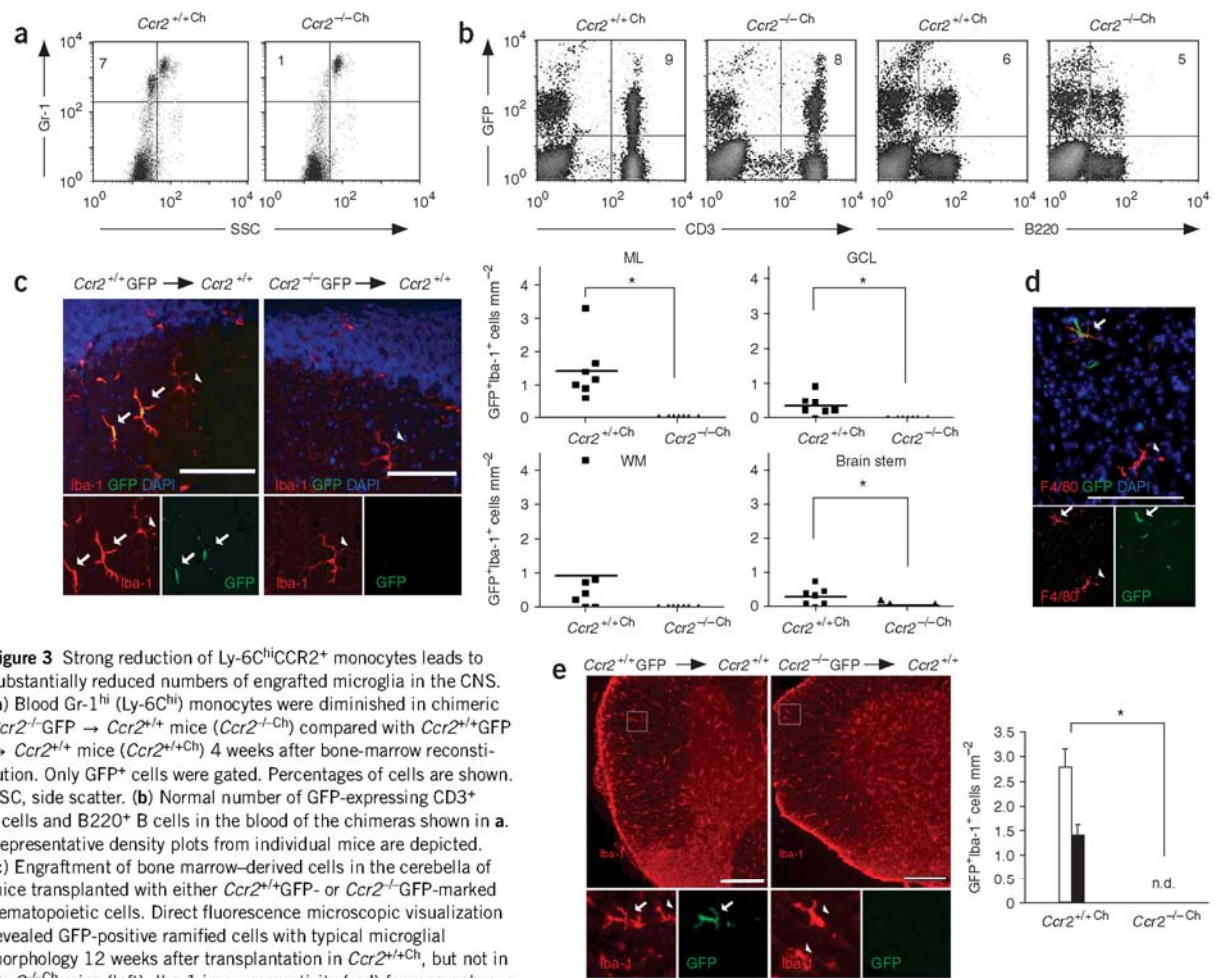
in *Ccr2<sup>-/-Ch</sup>* mice specifically lacking Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes was greatly reduced in the molecular layer of the cerebellum (for example,  $1.4 \pm 0.3$  cells mm<sup>-2</sup> in *Ccr2<sup>+/+Ch</sup>* mice and no detectable GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells in *Ccr2<sup>-/-Ch</sup>* mice) and in the spinal cord white matter ( $2.8 \pm 1.0$  cells mm<sup>-2</sup> in *Ccr2<sup>+/+Ch</sup>* mice and no detectable cells in *Ccr2<sup>-/-Ch</sup>* mice).

In conclusion, our data strongly suggest that Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes are the main source of bone marrow-derived microglia in several regions of the healthy adult CNS in a standard chimeric experimental setup that comprises irradiation of the CNS before bone-marrow reconstitution.

**Host factors modulate microglia engraftment during health**

The possibility that whole-body irradiation conditions the brain to microglia engraftment has been rarely addressed experimentally in

previous studies<sup>7,8,27</sup>. We therefore adapted the protocol using linear acceleration irradiation, which allows targeted irradiation that includes or excludes the brain before bone-marrow transplantation. As an obvious macroscopical sign of radiation protection, C57BL/6 mice that received selective-body irradiation (omitting the brain) retained the black fur color only on the head at 12 weeks after bone-marrow transplantation (Fig. 4a). These mice are subsequently referred to as 'protected' mice, in contrast to the 'unprotected' ones. It has been reported that irradiation of the CNS induces a tremendous and rapid gene regulation<sup>28,29</sup>. We therefore measured the time-dependent induction of several myeloattractants and TNF $\alpha$  in irradiated unprotected and nonirradiated protected parts of the CNS (Fig. 4b). Notably, we observed a strong induction of cytokines and chemokines at 16 d after irradiation in the unprotected spinal cord, but not in the nonexposed



**Figure 3** Strong reduction of Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes leads to substantially reduced numbers of engrafted microglia in the CNS. (a) Blood Gr-1<sup>hi</sup> (Ly-6C<sup>hi</sup>) monocytes were diminished in chimeric *Ccr2<sup>-/-GFP</sup> → Ccr2<sup>+/+</sup>* mice (*Ccr2<sup>-/-Ch</sup>*) compared with *Ccr2<sup>+/+GFP</sup> → Ccr2<sup>+/+</sup>* mice (*Ccr2<sup>+/+Ch</sup>*) 4 weeks after bone-marrow reconstitution. Only GFP<sup>+</sup> cells were gated. Percentages of cells are shown. SSC, side scatter. (b) Normal number of GFP-expressing CD3<sup>+</sup> T cells and B220<sup>+</sup> B cells in the blood of the chimeras shown in a. Representative density plots from individual mice are depicted. (c) Engraftment of bone marrow-derived cells in the cerebella of mice transplanted with either *Ccr2<sup>+/+GFP</sup>*- or *Ccr2<sup>-/-GFP</sup>*-marked hematopoietic cells. Direct fluorescence microscopic visualization revealed GFP-positive ramified cells with typical microglial morphology 12 weeks after transplantation in *Ccr2<sup>+/+Ch</sup>*, but not in *Ccr2<sup>-/-Ch</sup>* mice (left). Iba-1 immunoreactivity (red) for macrophages and microglia showed that some branched cells are GFP<sup>+</sup> and are therefore of hematopoietic origin (GFP, green, arrows), whereas others represent endogenous microglia expressing Iba-1 only (arrowheads). Scale bars represent 70  $\mu$ m (overviews) and 25  $\mu$ m (inserts). Semi-quantitative analysis of regional microglia engraftment (GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells) in the ML, GCL, WM and the brain stem 12 weeks after reconstitution (right). Each symbol indicates the value obtained per region from at least three sections in individual mice. Asterisks highlight statistical significances ( $P < 0.05$ ). (d) Donor-derived GFP<sup>+</sup> cells expressed the macrophage marker F4/80 (arrows). Some brain-endogenous microglia also showed F4/80 immunoreactivity (arrowheads). Scale bar represents 25  $\mu$ m. (e) GFP<sup>+</sup> ramified cells were detected in the spinal cords of *Ccr2<sup>+/+Ch</sup>*, but not of *Ccr2<sup>-/-Ch</sup>* mice. Blood-derived cells were mostly Iba-1<sup>+</sup> (arrow), whereas radio-resistant host microglia expressed Iba-1 only (arrowheads). Scale bars represent 200  $\mu$ m. Quantitative assessment (right) revealed significantly more GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells in the gray matter (GM, black bar) and WM (white bar) if the donor BMCs are *Ccr2<sup>+/+GFP</sup>* (*Ccr2<sup>+/+Ch</sup>*) ( $P < 0.05$ ). Data represent means  $\pm$  s.e.m. n.d., not detectable. Representative photographs are shown. For quantification, at least 3 sections of lumbar, thoracic and cervical spinal cords segments from 7–8 mice per group were used.

© 2007 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/natureneuroscience>

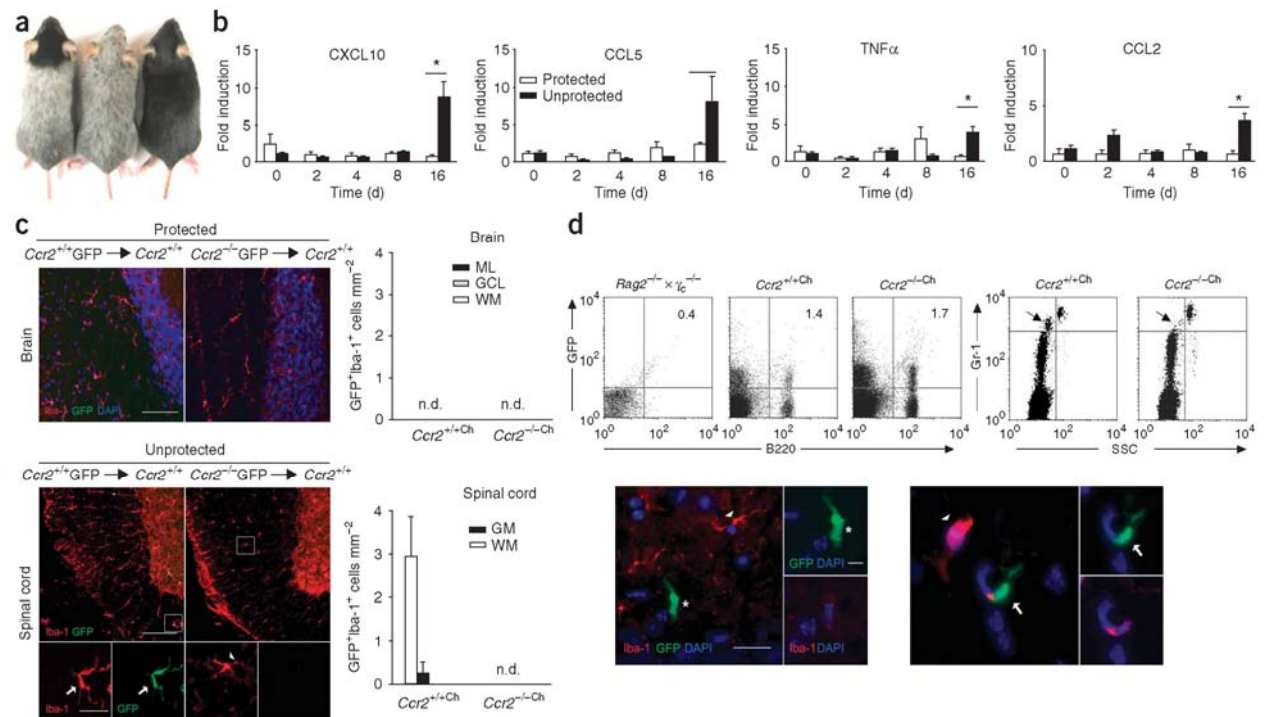


ARTICLES

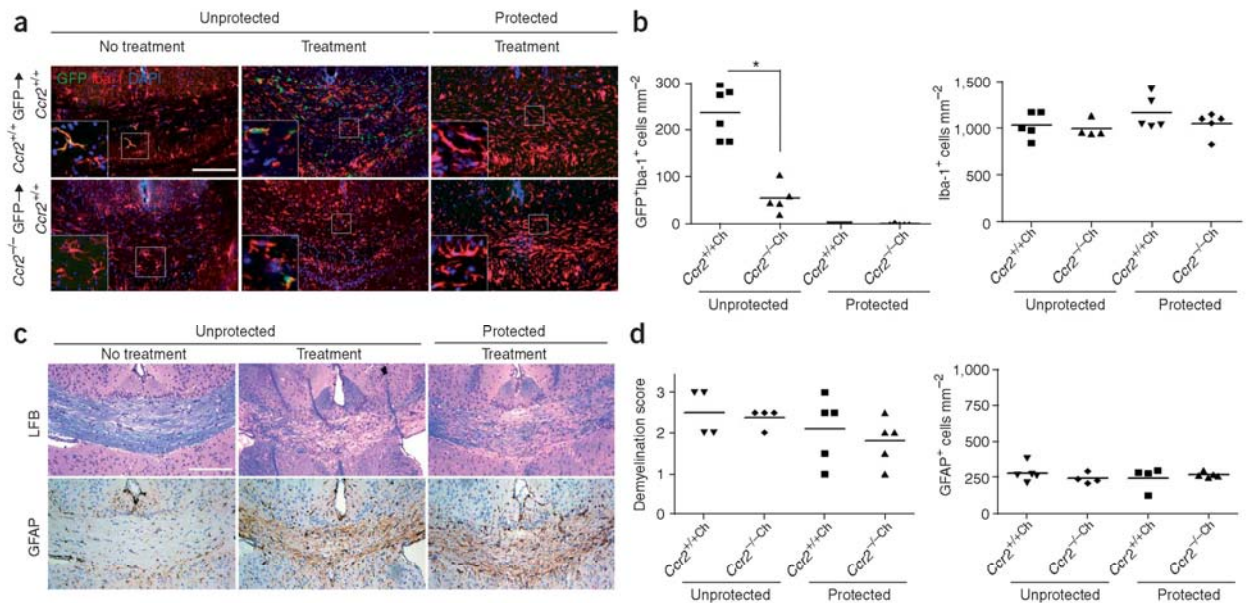
protected brain tissue ( $8.0 \pm 3.4$  versus  $2.4 \pm 0.2$ -fold increase for CCL5,  $P = 0.09$ ;  $8.7 \pm 2.1$  versus  $0.7 \pm 0.2$ -fold increase for CXCL10,  $P = 0.002$ ;  $3.6 \pm 0.7$  versus  $0.7 \pm 0.3$ -fold increase for CCL2,  $P = 0.04$ ;  $4.0 \pm 0.7$  versus  $0.6 \pm 0.1$ -fold increase for TNF $\alpha$ ,  $P = 0.003$ ). This significant chemokine and cytokine increase after 16 d appears to coincide with the appearance of GFP-expressing cells in perivascular and leptomeningeal sites at 2 weeks after bone-marrow transplantation<sup>8</sup>. To address the question of whether this chemokine induction might promote the selective engraftment of Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes in the irradiated parts of the CNS, we examined brain sections from the chimeric mice histologically (Fig. 4c). Notably, CNS microglia engraftment occurred only in regions of the brain that were conditioned by irradiation. Thus, significant numbers of GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup>-grafted microglia could only be detected in the spinal cord of *Ccr2*<sup>+/+Ch</sup> mice, which still contained the Ly-6C<sup>hi</sup> population in the blood ( $2.9 \pm 0.9$  GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells mm<sup>-2</sup> in *Ccr2*<sup>+/+Ch</sup> mice compared with no GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells in *Ccr2*<sup>-/-Ch</sup> chimeras,  $P = 0.04$ ). The protected brains of either *Ccr2*<sup>+/+Ch</sup> or *Ccr2*<sup>-/-Ch</sup> mice, however, did not show any donor-derived microglia in the cerebellum (Fig. 4c) or in the other regions examined, such as the cortex, striatum and hippocampus (data not shown).

Another possibility of hematopoietic reconstitution with donor-derived blood cell progeny without irradiation is the use of the *Rag2*<sup>-/-</sup>  $\times$   $\gamma_c$ <sup>-/-</sup> mice as recipients. Successful and stable lymphoid and myeloid reconstitution was achieved in *Rag2*<sup>-/-</sup>  $\times$   $\gamma_c$ <sup>-/-</sup> mice 32 weeks after BMC transfer (Fig. 4d). The number of GFP<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> lymphoid cells was similar in both *Ccr2*<sup>-/-Ch</sup>  $\rightarrow$  *Rag2*<sup>-/-</sup>  $\times$   $\gamma_c$ <sup>-/-</sup> chimeric mice (*Ccr2*<sup>-/-Ch</sup>) and *Ccr2*<sup>+/+Ch</sup>  $\rightarrow$  *Rag2*<sup>-/-</sup>  $\times$   $\gamma_c$ <sup>-/-</sup> mice (*Ccr2*<sup>+/+Ch</sup>) (Fig. 4d, upper left). As expected, the amount of Gr-1<sup>+</sup> (Ly-6C<sup>hi</sup>) cells was strongly reduced in the blood of *Ccr2*<sup>-/-Ch</sup> mice (Fig. 4d, upper right). Subsequent histological examination of the brains from *Ccr2*<sup>-/-Ch</sup> and *Ccr2*<sup>+/+Ch</sup> mice revealed donor-derived Iba-1-expressing perivascular cells, but no GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> ramified microglia in the cerebellar parenchyma (Fig. 4d, lower row). Single bipolar GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>-</sup> cells with immature morphology were rarely detected in the *Ccr2*<sup>-/-Ch</sup> cerebella (Fig. 4d, lower left).

In summary, our data provide strong evidence that microglia engraftment requires conditioning of the nondiseased adult CNS (as in our case, irradiation). Gene therapy protocols without CNS conditioning might fail to attract sufficient bone marrow-derived Ly-6C<sup>hi</sup> cells to the brain.



**Figure 4** Engraftment of donor-derived GFP<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes and differentiation into microglia requires a conditioned CNS. (a) Photograph showing long-term change of fur color. Irradiation led to selective loss of black fur color in the irradiated areas beginning at 3 months after irradiation, whereas the nonexposed head fur was unaffected. Left, protected mouse; middle, unprotected mouse; right, nonirradiated mouse. (b) Quantitative real-time PCR analysis of cytokine and chemokine induction in irradiated unprotected segments (lumbar spinal cord, black columns) and nonirradiated protected parts (brain, white bars) of the CNS after indicated time points post-irradiation. Data are means  $\pm$  s.e.m. Asterisks indicate statistical significance. (c) Engraftment of donor-derived GFP<sup>+</sup> ramified cells in the CNS parenchyma 12 weeks after transplantation occurred only if the region was previously irradiated (unprotected) and had a CCR2<sup>+</sup> genotype (*Ccr2*<sup>+/+Ch</sup>, left panel). Arrows label bone marrow-derived GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells and arrow heads mark endogenous host Iba-1<sup>+</sup> microglia. Scale bars represent 25  $\mu$ m (brain) or 200  $\mu$ m (spinal cord, overview), and 25  $\mu$ m (spinal cord, insert). Quantification of microglia engraftment is shown on the right. At least seven mice per group were used for quantification. (d) Successful lymphoid (B220) and myeloid (Gr-1) reconstitution in nonirradiated *Rag2*<sup>-/-</sup>  $\times$   $\gamma_c$ <sup>-/-</sup> mice 32 weeks after transfer of BMCs. *Ccr2*<sup>-/-Ch</sup>  $\rightarrow$  *Rag2*<sup>-/-</sup>  $\times$   $\gamma_c$ <sup>-/-</sup> chimeric mice (*Ccr2*<sup>-/-Ch</sup>) had a reduced number of Ly-6C<sup>hi</sup> (Gr-1<sup>+</sup>) monocytes in the peripheral blood (upper row, percentages are shown). Only GFP<sup>+</sup> cells were gated. Identification of donor-derived cells in the brains of chimeric mice 3 months after transplantation revealed no GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> ramified parenchymal cells in the host cerebella (lower). Endogenous microglia are Iba-1<sup>+</sup> (arrowheads). There was a single elongated bipolar cell having no typical microglia-like morphology that was GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>-</sup> (asterisk, lower left). Occasionally, GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> perivascular cells were found 3 months after bone-marrow transfer (arrow, lower right). Scale bars represent 25  $\mu$ m (overview) and 5  $\mu$ m (insert).



**Figure 5** Immigation of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes into the brain during cuprizone-induced demyelination requires host conditioning. **(a)** Engraftment of bone marrow-derived GFP<sup>+</sup> cells in the corpus callosum of brain-irradiated (unprotected) or non-brain-irradiated (protected) *Ccr2*<sup>+/+</sup>GFP → *Ccr2*<sup>+/+</sup> (*Ccr2*<sup>+/+</sup>*Ch*) and *Ccr2*<sup>-/-</sup>GFP → *Ccr2*<sup>+/+</sup> (*Ccr2*<sup>-/-</sup>*Ch*) chimeric mice after 5 weeks of cuprizone treatment (treated) or in untreated mice. Arrows point to double-positive GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> blood-derived cells, whereas arrowheads indicate radio-resistant Iba-1<sup>+</sup> host microglia. Scale bar represents 200 μm. **(b)** Quantitative assessment of donor-derived GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> macrophages and microglia (left) and overall Iba-1<sup>+</sup> cells (right) in the corpus callosum of chimeric mice 5 weeks after cuprizone treatment. Each symbol corresponds to the mean of one mouse after evaluation of at least two tissue sections. The mean is indicated for each group. **(c,d)** The extent of demyelination was evaluated qualitatively **(c)** and semi-quantitatively **(d)** by LFB staining and by immunohistochemistry for the astrocyte marker GFAP. Scale bar represents 200 μm. Representative microphotographs are shown. In the quantitative analysis, each symbol represents the mean from at least three tissue sections derived from one individual mouse. The mean is indicated for each group. No statistically significant differences were found (*P* > 0.05).

**No frank microglia engraftment during CNS neuropathology**

To investigate whether the generation of microglia from Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes is enhanced during CNS pathology and whether microglia recruitment into the diseased brain also requires a favorable host environment, we induced (i) demyelination in adult mice using the copper chelator cuprizone as a model of primary demyelination and (ii) neurodegeneration in adult mice using the facial nerve axotomy model.

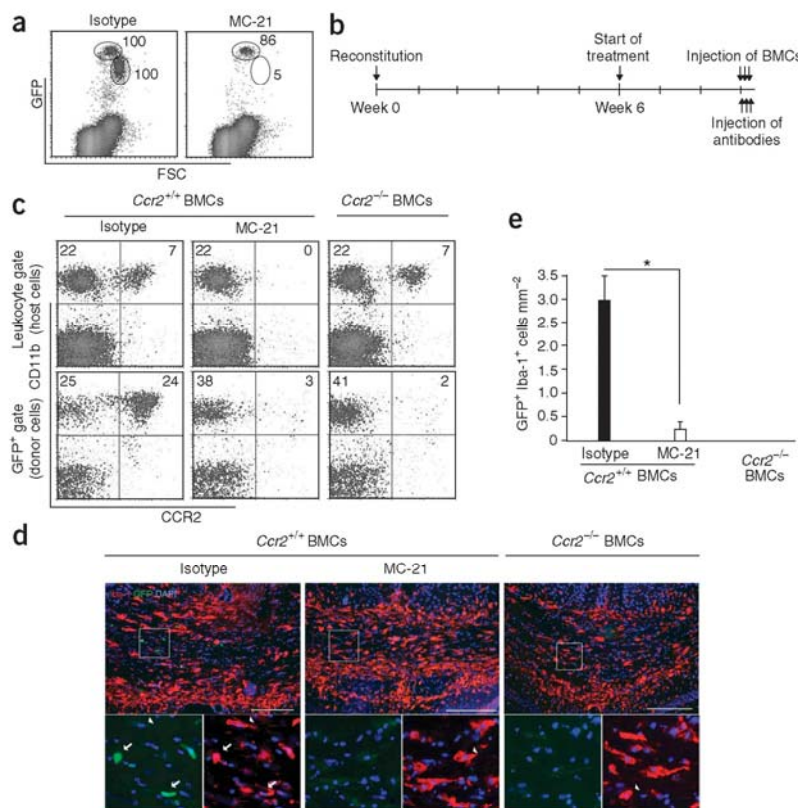
Treatment with cuprizone, administered as a food additive, induces demyelination selectively in the corpus callosum. Notably, cuprizone-induced demyelination does not promote blood-brain barrier damage<sup>30,31</sup>, but recruitment of peripheral macrophages has been reported in irradiated bone-marrow chimeric mice<sup>32</sup>.

Following bone-marrow transfer, protected and unprotected *Ccr2*<sup>+/+</sup>GFP → *Ccr2*<sup>+/+</sup> (*Ccr2*<sup>+/+</sup>*Ch*) and *Ccr2*<sup>-/-</sup>GFP → *Ccr2*<sup>+/+</sup> (*Ccr2*<sup>-/-</sup>*Ch*) chimeric mice were challenged with cuprizone, and microglia engraftment during toxic demyelination was investigated (Fig. 5). In unprotected mice, numerous Iba-1<sup>+</sup> GFP-expressing cells selectively infiltrated the demyelinated corpus callosum. However, the extent of engraftment appeared to be markedly more extensive in unprotected *Ccr2*<sup>+/+</sup>*Ch* mice compared with unprotected *Ccr2*<sup>-/-</sup>*Ch* mice (Fig. 5a). Both endogenous GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> and engrafted GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> macrophages and microglia showed morphological signs of activation, namely retraction of processes and rounding of cell soma. Quantification of donor-derived GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> macrophage and microglia engraftment revealed significantly more cells in the unprotected *Ccr2*<sup>+/+</sup>*Ch* group as compared with unprotected *Ccr2*<sup>-/-</sup>*Ch* mice (236.5 ± 55.5 GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells mm<sup>-2</sup> in unprotected *Ccr2*<sup>+/+</sup>*Ch* mice, 54.0 ± 30.6 cells mm<sup>-2</sup> cells

in unprotected *Ccr2*<sup>-/-</sup>*Ch* chimeras, *P* < 0.001), indicating that Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes were recruited to the demyelinating lesion in the irradiated brain (Fig. 5b, left). The few GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells found in the corpus callosum of *Ccr2*<sup>-/-</sup>*Ch* chimeras most likely represent descendants of the residual Ly-6C<sup>hi</sup> cells found in the peripheral blood of these mice. No GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells were detectable in the protected groups, irrespective of the genotype of the donor bone marrow. The data indicate that Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes are only recruited to the demyelinating lesion when the brain was irradiated. Notably, the overall number of Iba-1<sup>+</sup> cells was not substantially different in any of the chimeric groups investigated (Fig. 5b, right). We observed a strong local production of CCL2, CXCL10, CCL5 and TNFα in the damaged corpus callosum of WT mice after 5 weeks of cuprizone treatment (Supplementary Fig. 2 online), which was obviously not sufficient to trigger monocyte entry across the intact blood-brain barrier. To evaluate the contribution of donor-derived Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes to the process of demyelination, we evaluated the loss of myelin semi-quantitatively by luxol fast blue (LFB) staining (Fig. 5c,d). Demyelination was extensive in all experimental groups, with no statistically significant differences (*P* > 0.1). The distribution and amount of reactive GFAP<sup>+</sup> astrocytes were indistinguishable between the experimental groups (Fig. 5d, right).

To exclude the possibility that CCR2-knockout mice show effects from the genetic manipulation that are independent of CCR2 deficiency, we also carried out adoptive transfer experiments. We took advantage of the α-CCR2 antibody MC-21, which selectively depletes Ly-6C<sup>hi</sup> CCR2<sup>+</sup>, but not Ly-6C<sup>lo</sup> CCR2<sup>-</sup> monocytes in the peripheral blood (Fig. 6a) by an antibody-dependent cellular

ARTICLES



**Figure 6** Adoptively transferred Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes selectively migrate to the demyelinated area in the conditioned CNS. **(a)** MC-21 specifically depletes GFP<sup>lo</sup> monocytes (Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup>), but only barely affects GFP<sup>hi</sup> monocytes (Ly-6C<sup>lo</sup>CCR2<sup>-</sup>) in CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> mice. **(b)** Time scale of Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> depletion experiments using MC-21 in cuprizone-challenged chimeric mice (Ccr2<sup>+/+</sup> → Ccr2<sup>-/-</sup>). **(c)** FACS analysis revealed the depletion of CCR2<sup>+</sup> host cells (upper middle), as well as of adoptively transferred GFP<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> donor cells (lower middle), in the chimeric mice after injection of MC-21 versus isotype control injection (left). CCR2 expression could not be detected in the group receiving GFP<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> BMCs (right). **(d,e)** Engraftment of donor-derived GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> macrophages in the lesioned brain occurred when adoptively transferred GFP<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> BMCs were treated with the isotype control, but not when these cells were depleted by MC-21 or when CCR2<sup>-</sup> BMCs were used. Immunohistochemistry of brains 4 weeks after cuprizone challenge is shown **(d)**. Arrows point to double-positive GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> blood-derived cells, whereas arrowheads indicate radio-resistant Iba-1<sup>+</sup> host microglia. Scale bars represent 200 μm. Quantitative assessment of donor-derived GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> monocytes in the corpus callosum of chimeric mice 5 weeks after cuprizone treatment **(e)**. Data are means ± s.e.m. Asterisk indicates statistically significant difference (P < 0.05). At least four mice per group were examined.

cytotoxicity-mediated mechanism (data not shown). BMCs were injected intravenously into irradiated cuprizone-treated chimeric mice (Ccr2<sup>+/+</sup> → Ccr2<sup>+/+</sup>), and Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> cells were subsequently depleted (Fig. 6b). Immunohistochemical analysis revealed that donor-derived GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> monocytes were only recruited to areas of demyelination when the Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> subpopulation was present in the blood (Fig. 6c–e). Notably, we found that adoptively transferred Ccr2<sup>-/-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes could not be detected in the corpus callosum of cuprizone-treated mice. These data suggest that CCR2-dependent chemotaxis is a necessary process for monocytes to enter the lesioned and conditioned brain.

Finally, protected and unprotected CCR2-chimeras were subjected to unilateral facial nerve axotomy (Fig. 7). In this experimental procedure, the blood-brain barrier is intact, and a remote degeneration of the facial nucleus leads to local microglial activation with concomitant recruitment of bone marrow-derived microglia in whole-body irradiated mice<sup>8</sup>. Ramified GFP-expressing cells were found in close proximity to the lesioned facial motoneurons in unprotected Ccr2<sup>+/+</sup>GFP → Ccr2<sup>+/+</sup> (Ccr2<sup>+/+</sup><sup>Ch</sup>) mice 14 d after axotomy, and to a lesser degree in unprotected Ccr2<sup>-/-</sup>GFP → Ccr2<sup>+/+</sup> (Ccr2<sup>-/-</sup><sup>Ch</sup>) mice (Fig. 7a,c). These cells were identified as microglia by their morphology and by the expression of the Iba-1 antigen. In contrast, the unlesioned contralateral facial nucleus was largely devoid of engrafted GFP<sup>+</sup> microglia. Again, selective recruitment of donor-derived BMCs to the side of neurodegeneration took place only when the brain was primed before by irradiation. We found significantly more ramified GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells in the lesioned facial nucleus of Ccr2<sup>+/+</sup><sup>Ch</sup> mice (94.1 ± 2.5 GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells mm<sup>-2</sup>) than in Ccr2<sup>-/-</sup><sup>Ch</sup> mice (38.3 ± 3.2 cells mm<sup>-2</sup>) (P < 0.001). As expected, no ramified GFP-expressing cells

were found in the lesioned facial nuclei of protected Ccr2<sup>+/+</sup><sup>Ch</sup> mice and protected Ccr2<sup>-/-</sup><sup>Ch</sup> mice (Fig. 7b,c). These results underscore the requirement of brain conditioning for efficient microglia engraftment from circulating Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes in CNS diseases with intact blood-brain barriers.

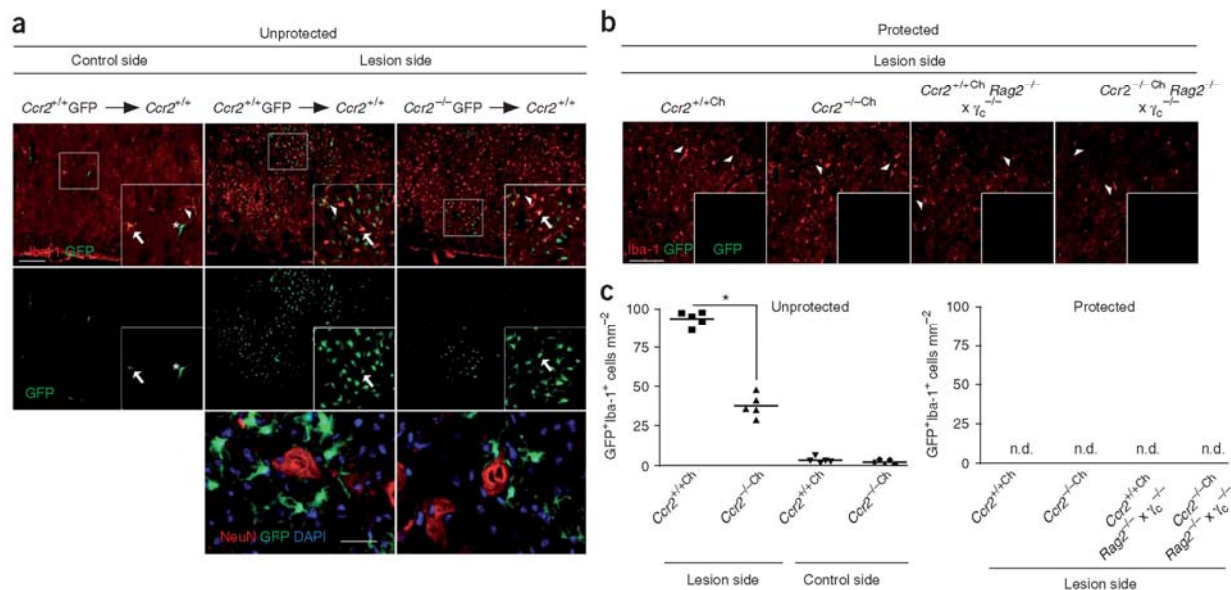
DISCUSSION

In this study, we identified a specific monocyte subpopulation, namely Ly-6C<sup>hi</sup>Gr-1<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>lo</sup> cells, as the precursor of adult murine microglia in the peripheral blood. Ly-6C<sup>hi</sup> CCR2<sup>+</sup> monocytes specifically accumulated in CNS lesions and differentiated into brain-specific macrophages, the microglia. Furthermore, we found that microglia engraftment during postnatal life is enhanced by CNS pathology, but requires conditioning of the brain (for example, by irradiation) if the blood-brain barrier remains intact. Thus, our data offer new insights into the mechanisms leading to microglia engraftment in the adult brain under normal and diseased conditions, and suggest a role for specific monocyte subpopulations as direct circulating microglia precursors.

The first microglia colonization of the CNS takes place during early embryogenesis, when microglia arise from hemangioblastic mesoderm and populate the developing neuroectoderm in rodents after embryonic day 8.5 (ref. 33). This early microglia engraftment most likely occurs independently of CCR2, as we could not detect any changes in the number, distribution, morphology or innate immune function of Iba-1<sup>+</sup> microglia in Ccr2<sup>-/-</sup> mice. During embryogenesis, microglia development is thought to be orchestrated by factors of the early myelopoiesis, such as PU.1 or M-CSF<sup>34</sup>. Notably, parenchymal microglia can arise from BMCs in nonirradiated neonates<sup>35</sup>, demonstrating that our findings are specific for the adult CNS. The







**Figure 7** Selective recruitment of donor-derived Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes after axotomized facial nucleus occurs only in conditioned CNS. **(a,b)** Microglia engraftment in the lesioned facial nucleus following facial nerve axotomy. Ramified GFP-expressing cells 14 d after axotomy express Iba-1 (arrows). Endogenous host microglia are Iba-1<sup>+</sup> (arrowheads). **(a)** In the unprotected control (nonlesioned) facial nucleus, one GFP<sup>+</sup> bipolar cell without microglia characteristics (asterisk). More numerous GFP-positive ramified cells were found in the lesioned facial nucleus of Ccr2<sup>+/+</sup>GFP → Ccr2<sup>+/+</sup> (Ccr2<sup>-/-</sup>Ch) mice than Ccr2<sup>-/-</sup>GFP → Ccr2<sup>+/+</sup> (Ccr2<sup>-/-</sup>Ch) chimeric mice. Scale bar represents 100 μm (upper and middle). Some ramified GFP-expressing cells were in close proximity to NeuN-immunoreactive neurons (red) in the facial nucleus in Ccr2<sup>-/-</sup>Ch chimeras (lower). Scale bar represents 10 μm. DAPI staining is shown in blue. **(b)** No engraftment of GFP<sup>+</sup> cells was found in the nonirradiated (protected) chimeras of any genotype. Iba-1 immunoreactivity identified host microglia (arrowheads). Scale bar represents 100 μm. **(c)** Quantification of donor-derived microglia and macrophage engraftment (GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup>) in the lesioned facial nucleus or the contralateral control facial nucleus 14 d after axotomy. A robust engraftment of GFP<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup> cells was found only in brain-irradiated (unprotected) Ccr2<sup>+/+</sup>Ch mice, whereas significantly fewer engrafted cells were visible in Ccr2<sup>-/-</sup>Ch chimeric mice lacking Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes ( $P < 0.001$ ). Irradiation-protected mice failed to show any engrafted GFP<sup>+</sup> cells in the facial nucleus. Symbols indicate individual mice. For all experimental groups, five mice were used. Asterisk shows statistically significant difference ( $P < 0.05$ ).

generation of microglia in the adult brain, however, is still a matter of debate. Initial studies using lethally irradiated rats found only limited turnover of microglia with their peripheral myeloid counterparts in the blood, which might be, at least in part, explained by the technical limitations of using MHC mismatch as a marker of donor BMCs<sup>7</sup>. More recently, labeling methods of BMCs, such as retroviral and transgenic approaches, have facilitated tracking of bone marrow-derived cells and their differentiation in the brain. A high percentage of newly engrafted microglia was observed in the adult mouse brain using this technique<sup>8</sup>. These initial data were confirmed and extended by others<sup>17,36,37</sup>. Even therapeutic approaches were successfully established using genetically modified microglia precursors in the blood as cellular vehicles for CNS gene therapy of metachromatic leukodystrophy in whole body-irradiated chimeras<sup>38</sup>.

Further studies documented an early and rapid engraftment of bone marrow-derived microglia in several models of neurodegenerative diseases, such as facial nerve axotomy<sup>8</sup>, scrapie<sup>10,11</sup>, the methylphenyl-tetrahydro-pyridin model of Parkinson's disease<sup>14</sup>, Alzheimer's disease transgenic mice<sup>15,16</sup> and toxic demyelination<sup>32</sup>. Recently, a critical role of bone marrow-derived microglia was attributed to their supposed function in restricting senile plaque formation in an amyloid β (A4) precursor protein/presenilin 1 mouse model of Alzheimer's disease<sup>5</sup>. This study further suggested that the bone marrow-derived cells selectively upregulated MHC class II and showed cell-specific phagocytic mechanisms of disease-associated

β-amyloid removal. It has further been reported that CCR2 deficiency renders mice more susceptible to Alzheimer's disease, most likely as a result of impaired amyloid degradation by brain endogenous phagocytes<sup>39</sup>.

In contrast to an earlier report, in which bone marrow-derived monocytes and macrophages constituted up to 20% of the CD11b<sup>+</sup> population during cuprizone-induced demyelination<sup>32</sup>, our data indicate that bone marrow-derived cells virtually do not contribute at all to the CD11b<sup>+</sup>/Iba-1<sup>+</sup> population when the CNS was protected from irradiation. Thus, proliferation of endogenous microglia seems to be the most plausible explanation for the increase in Iba-1<sup>+</sup> cell number. Indeed, local microglia proliferation in the lesioned CNS with intact blood-brain barrier has been reported<sup>11,40</sup>.

It seems crucial to note that the vast majority of the bone-marrow chimera data were obtained from experiments using whole-body irradiation, without selective marrow-specific targeting of the myeloablating treatment. The involvement of the head during the irradiation procedure might have led to substantial local priming in the brain with concomitant induction of myeloattracting and myelopromoting factors and/or inactivation of inhibitory cues. Indeed, previous reports have already pointed to a local production of TNFα, IL-1β and IL-6 in the irradiated rodent brain<sup>28</sup>. We now demonstrate that, besides other cytokines and chemokines, the CCR2 ligand, CCL2, is produced as a result of the irradiation procedure. Because CCL2 is also induced during brain diseases<sup>41</sup>, this factor could be involved in the recruitment of CCR2-expressing myeloid cells into the CNS under several

## ARTICLES

conditions. Thus, it seems plausible that Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes equipped with CCR2 are preferentially recruited into the CNS, where they subsequently differentiate into microglia. The CCL2/CCR2 axis in general is thought to be the critical cue, as CCR2 was reported to be necessary for the egression of monocytes from the bone marrow to the spleen<sup>25</sup> and from the blood stream to the tissue<sup>23</sup>. Nevertheless, it is possible that locally or distantly produced specific factors besides the investigated cytokines and chemokines are crucial for driving the recruitment of Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes into the CNS. In addition, subtle changes of blood-brain barrier integrity or inactivation of repulsive signals following irradiation might also promote cell engraftment.

Although we did not describe a role for Ly-6C<sup>lo</sup>CCR2<sup>-</sup> cells in the homeostasis of the brain or during disease, future studies may determine whether this monocyte subset, as possible precursors of dendritic cells<sup>20</sup>, influences the adaptive arm of the immune system in the CNS, particularly with respect to antigen presentation and lymphocyte activation, processes that are known to occur in sterile CNS autoimmunity.

Taken together, our results identify Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes as direct precursors of microglia and point to the local factors in the CNS that are required for this process. Future studies will help to evaluate the impact of brain conditioning for directed myeloid cell targeting to the brain in therapeutic approaches for CNS diseases.

## METHODS

**Mice, generation of bone-marrow chimeric mice and adoptive transfer experiments.** Bone-marrow chimeric mice were generated as described recently<sup>8,12,42–44</sup>. We reconstituted 6–8-week-old C57BL/6 (*Ccr2*<sup>+/+</sup>) recipient mice with BMCs derived from the tibias and femurs from adult ACTβ-EGFP mice alone (*Ccr2*<sup>+/+</sup>GFP<sup>+</sup>)<sup>45</sup> or from double-mutant mice intercrossed with CCR2-deficient mice (*Ccr2*<sup>-/-</sup>GFP<sup>+</sup>)<sup>26</sup>. Specific body (protected) irradiation of mice was carried out by a 6-MV X-Ray Varian linear accelerator. Mice were put into a 20 × 20 × 3-cm cast perspex-lined chamber (5-mm gage, density of 1.18 g cm<sup>-3</sup>). Spiracles were provided and the heads of the mice were carefully adjusted to it. Mice were treated with parallel opposed fields with a maximum dose at a depth of 1.5 cm. The field size was adjusted to 14 × 20 cm, placing the brains of the mice outside of the irradiation fields, with only the body being irradiated with 1,100 cGy. A safety margin of 0.5 cm from the field border to the head was preserved, so that no dose could affect normal brain tissue. We injected 5 × 10<sup>6</sup> *Ccr2*<sup>-/-</sup>GFP<sup>+</sup> or *Ccr2*<sup>+/+</sup>GFP<sup>+</sup> BMCs into the tail vein of recipients 24 h after irradiation. Reconstitution of total irradiated (unprotected) mice was carried out by mixing *Ccr2*<sup>-/-</sup>GFP<sup>+</sup> or *Ccr2*<sup>+/+</sup>GFP<sup>+</sup> BMCs in a 1:3 ratio with *Ccr2*<sup>+/+</sup> BMCs, which resulted in similar reconstitution levels in all chimeric mice. CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> mice were a kind gift of D. Littman (New York University School of Medicine)<sup>46</sup>. C57BL/10SgSnAi Rag2 common gamma chain mice were purchased from Taconic Europe. Reconstitution was assessed 6–8-weeks after grafting by FACS analysis of peripheral blood. Depletion of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes was carried out with an antibody to CCR2 (MC-21)<sup>47</sup> or the corresponding isotype control 2 h after each cell injection. We injected 50 μg of antibodies intraperitoneally.

**Quantification of microglia and macrophage engraftment in the CNS.** After transcardial perfusion with phosphate-buffered saline and subsequent 4% paraformaldehyde, we obtained 20-μm cryosections from the brains. Primary and preabsorbed antibodies were added overnight at a dilution of 1:100 for Iba-1 (WACO), 1:50 for F4/80 (Serotec), 1:100 for NeuN (Chemicon International). Cy3-conjugated secondary antibodies (Dianova) were added at a dilution of 1:100 for Iba-1 and 1:600 for the other antibodies for 1 h. Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). GFP-expressing ramified cells and Iba-1<sup>+</sup> or F4/80<sup>+</sup> macrophages and microglia were counted in at least three sections of each individual mouse. The number and the area occupied by engrafted cells were examined microscopically using a 200× microscopical magnification using a conventional fluorescence microscope (Olympus BX-51) equipped with a color camera (Olympus DP71).

**Cuprizone treatment and facial nerve axotomy.** Cuprizone experiments were carried out on 9–10-week-old chimeric mice. Mice were fed for 5 weeks with 0.2% (weight/weight) cuprizone (Sigma) in the ground breeder chow. Histopathological analysis using LFB staining for demyelination and GFAP immunohistochemistry for astrocytes was carried out as previously described<sup>48</sup>. Unilateral facial nerve axotomy was induced in bone-marrow chimeras (created with unmixed GFP<sup>+</sup> bone marrow) 4–6 weeks post-transplantation by transection of the facial nerve at the stylomastoid foramen, resulting in ipsilateral whisker paresis. Mice were killed for analysis after 14 d.

**Microglia isolation.** Murine microglia from adult mice were harvested using a percoll gradient as previously described<sup>49</sup>. For culture experiments, primary microglia were prepared from newborn mice as described<sup>50</sup>. For stimulation, microglial cells were seeded at a density of 2 × 10<sup>5</sup> cells per well, and different concentrations of LPS or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> were added to the cell culture medium for 18 h. Afterwards, TNFα and IL-6 enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were carried out according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). For MHC class II induction, cells were stimulated with IFNγ (20 ng ml<sup>-1</sup>) alone or in combination with IFNβ (100 U ml<sup>-1</sup>) for 18 h. For measurement of myelin phagocytosis, fluorescein isothiocyanate-labeled myelin was exposed to microglia at a protein concentration of 4 μg ml<sup>-1</sup> for 1 or 2 h alone or in the presence of cytochalasin D (5 μM). For microglia proliferation, culture medium was supplemented with different concentrations of recombinant mouse M-CSF (R&D Systems). After 48h, 10 μM BrdU (Sigma) was added for 1 h. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with the BrdU *in situ* detection kit according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen).

**Real-time PCR.** RNA was extracted from the brains and spinal cords at indicated time points after or without irradiation. The tissue was flushed with ice-cold Hank's buffered salt solution, and RNA was isolated using RNeasy Mini kits (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The samples were treated with DNaseI (Roche), and 1 μg of RNA was transcribed into cDNA using oligo-dT primers and the SuperScript II RT kit (Invitrogen). We transferred 2.5 μl cDNA into a 96-well Multiply PCR-plate (Sarstedt) and 12.5 μl Absolute QPCR SYBR Green master mix (ABgene) with 9.6 μl ddH<sub>2</sub>O was added. The PCR reaction was carried out as previously described<sup>43</sup>.

**Statistical analysis.** Statistical differences of clinical scores were evaluated using a nonpaired Student's *t* test. Differences were considered significant for *P* < 0.05.

*Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.*

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank O. Kowatsch, M. Schedensack, E. Pralle, P. Grämmel and S. Blumenau for excellent technical assistance. We thank S. Jung (Rehovot, Israel) for scientific input. This work was supported by grants from Gemeinnützige Hertie-Stiftung to M.P. and D.M., Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 507 A5 and PR 577) to J.P. and M.P. This project was supported by the DFG research Center for Molecular Physiology of the Brain Göttingen, but support was unfortunately discontinued. M.H. is supported by the Swiss MS Society and the Prof. Dr. Max-Cloëtta Foundation. A.M. and H.S. are fellows of the Gertrud Reemtsma Foundation.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.M., H.S., M.N., D.M., U.-K.H., J.P. and M.P. conducted the experiments. M.M., M.H. and W.B. provided reagents and scientific input. A.M., J.P. and M.P. designed the experiments and wrote the manuscript.

Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience>

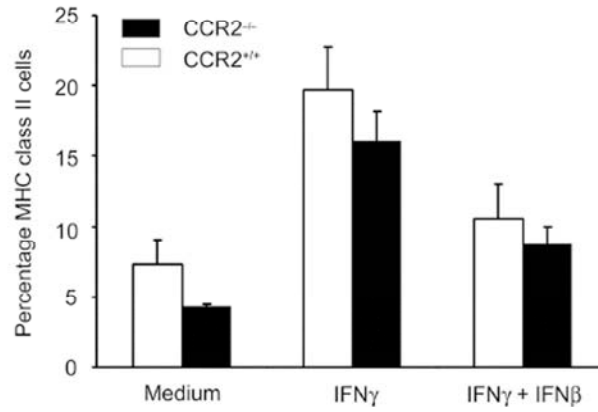
Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

- Hanisch, U.K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140–155 (2002).
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* **308**, 1314–1318 (2005).
- Davalos, D. *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat. Neurosci.* **8**, 752–758 (2005).

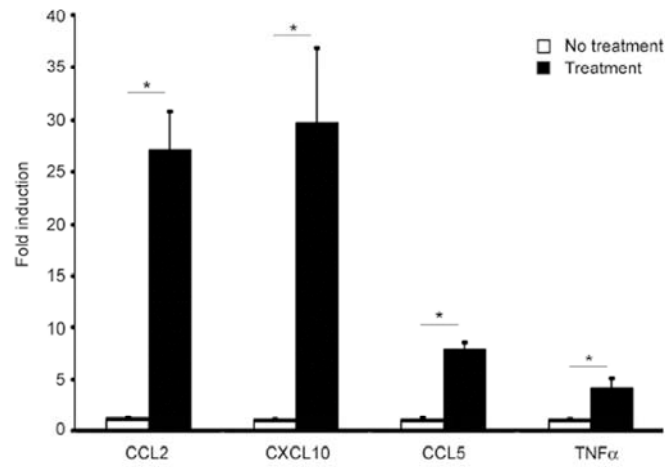


4. Streit, W.J., Walter, S.A. & Pennell, N.A. Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* **57**, 563–581 (1999).
5. Simard, A.R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.P. & Rivest, S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* **49**, 489–502 (2006).
6. Hickey, W.F. & Kimura, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science* **239**, 290–292 (1988).
7. Hickey, W.F., Vass, K. & Lassmann, H. Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **51**, 246–256 (1992).
8. Priller, J. *et al.* Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat. Med.* **7**, 1356–1361 (2001).
9. Wehner, T. *et al.* Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci.* **23**, 5004–5011 (2003).
10. Williams, A.E., Lawson, L.J., Perry, V.H. & Fraser, H. Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **20**, 47–55 (1994).
11. Priller, J. *et al.* Early and rapid engraftment of bone marrow-derived microglia in scrapie. *J. Neurosci.* **26**, 11753–11762 (2006).
12. Djukic, M. *et al.* Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* **129**, 2394–2403 (2006).
13. Heppner, F.L. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat. Med.* **11**, 146–152 (2005).
14. Kokovay, E. & Cunningham, L.A. Bone marrow-derived microglia contribute to the neuroinflammatory response and express iNOS in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **19**, 471–478 (2005).
15. Malm, T.M. *et al.* Bone marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol. Dis.* **18**, 134–142 (2005).
16. Stalder, A.K. *et al.* Invasion of hematopoietic cells into the brain of amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* **25**, 11125–11132 (2005).
17. Massengale, M., Wagers, A.J., Vogel, H. & Weissman, I.L. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J. Exp. Med.* **201**, 1579–1589 (2005).
18. van Furth, R. & Cohn, Z.A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 415–435 (1968).
19. Gordon, S. & Taylor, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964 (2005).
20. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
21. Grage-Griebenow, E., Flad, H.D. & Ernst, M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 11–20 (2001).
22. Sunderkotter, C. *et al.* Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* **172**, 4410–4417 (2004).
23. Swirski, F.K. *et al.* Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytes and give rise to macrophages in atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **117**, 195–205 (2007).
24. Sedgwick, J.D. *et al.* Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7438–7442 (1991).
25. Serbina, N.V. & Pamer, E.G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317 (2006).
26. Kuziel, W.A. *et al.* Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12053–12058 (1997).
27. Furuya, T. *et al.* Establishment of modified chimeric mice using GFP bone marrow as a model for neurological disorders. *Neuroreport* **14**, 629–631 (2003).
28. Linard, C. *et al.* Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 427–434 (2004).
29. Francois, S. *et al.* Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* **24**, 1020–1029 (2006).
30. Kondo, A., Nakano, T. & Suzuki, K. Blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in twitcher and cuprizone-intoxicated mice. *Brain Res.* **425**, 186–190 (1987).
31. Bakker, D.A. & Ludwin, S.K. Blood-brain barrier permeability during Cuprizone-induced demyelination. Implications for the pathogenesis of immune-mediated demyelinating diseases. *J. Neurosci.* **78**, 125–137 (1987).
32. McMahon, E.J., Suzuki, K. & Matsushima, G.K. Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* **130**, 32–45 (2002).
33. Alliot, F., Godin, I. & Pessac, B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **117**, 145–152 (1999).
34. Wegiel, J. *et al.* Reduced number and altered morphology of microglial cells in colony stimulating factor-1-deficient osteopetrotic op/op mice. *Brain Res.* **804**, 135–139 (1998).
35. Beers, D.R. *et al.* Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 16021–16026 (2006).
36. Vallieres, L. & Sawchenko, P.E. Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J. Neurosci.* **23**, 5197–5207 (2003).
37. Simard, A.R. & Rivest, S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* **18**, 998–1000 (2004).
38. Biffi, A. *et al.* Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.* **113**, 1118–1129 (2004).
39. El Khoury, J. *et al.* Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.* **13**, 432–438 (2007).
40. Remington, L.T., Babcock, A.A., Zehntner, S.P. & Owens, T. Microglial recruitment, activation and proliferation in response to primary demyelination. *Am. J. Pathol.* **170**, 1713–1724 (2007).
41. Yamamoto, M. *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 in beta-amyloid precursor protein transgenic mice show accelerated diffuse beta-amyloid deposition. *Am. J. Pathol.* **166**, 1475–1485 (2005).
42. Prinz, M. *et al.* Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature* **425**, 957–962 (2003).
43. Prinz, M. *et al.* Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **116**, 456–464 (2006).
44. Greter, M. *et al.* Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* **11**, 328–334 (2005).
45. Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. & Nishimune, Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* **407**, 313–319 (1997).
46. Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4106–4114 (2000).
47. Mack, M. *et al.* Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J. Immunol.* **166**, 4697–4704 (2001).
48. Merkler, D. *et al.* Multicontrast MRI of remyelination in the central nervous system. *NMR Biomed.* **18**, 395–403 (2005).
49. van Loo, G. *et al.* Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat. Immunol.* **7**, 954–961 (2006).
50. Prinz, M. & Hanisch, U.K. Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J. Neurochem.* **72**, 2215–2218 (1999).



**SUPPLEMENTARY FIGURES****Supplementary Figure 1: Microglial MHC class II modulation is independent of CCR2.**

The percentage of MHC class II-expressing microglia was assessed 18 h after stimulation with either IFN $\beta$  (100 U/ml) or IFN $\beta$  (100 U/ml) plus IFN $\gamma$  (20 ng/ml). Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments. No statistically significant differences were found between CCR2<sup>+/+</sup> (white bars) or CCR2<sup>-/-</sup> (black bars) microglia.



**Supplementary Figure 2: Toxic demyelination induces local production of chemoattractant proteins and proinflammatory cytokines.**

Cytokine and chemokine gene expression was measured quantitatively by real-time PCR in the corpus callosum of WT mice treated for 5 weeks with cuprizone (black bars) and compared with untreated controls (white bars). The means  $\pm$  SEM are shown. Asterisks indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). At least 2 mice were examined per group and molecule.

## 2.2 Publikation II

---

### **Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>GRANULOCYTES RATHER THAN Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> MONOCYTES ARE REQUIRED FOR THE CONTROL OF BACTERIAL INFECTION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM**

---

Alexander Mildner<sup>1#</sup>, Marija Djukic<sup>2#</sup>, David Garbe<sup>2</sup>, Andreas Wellmer<sup>2</sup>, Matthias Mack<sup>3</sup>, Roland Nau<sup>2</sup> and Marco Prinz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Neuropathology, Georg-August-University, D-37075 Göttingen, Germany

<sup>2</sup> Dept. of Neurology, Georg-August-University, D-37075 Göttingen, Germany

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, University of Regensburg, Regensburg, Germany

<sup>#</sup>both authors contributed equally

---

Submitted in:

Blood (manuscript ID number, BLOOD/2007/128223)

---

**SUMMARY**

Myeloid cell recruitment is a characteristic feature of bacterial meningitis. However, the cellular mechanisms important for the control of *Streptococcus pneumoniae* infection remain largely undefined. Previous pharmacological or genetic studies broadly depleted many myeloid cell types within the meninges which did not allow defining the function of specific myeloid subsets. Herein we show that both CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> granulocytes as well as CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> but not Ly-6C<sup>lo</sup>CCR2<sup>-</sup> monocytes were recruited to the brain as early as 12 h post bacterial challenge. Surprisingly, CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes modulated local CXCL2 and IL-1 $\beta$  production within the meninges but did not provide protection against bacterial infection. Consistent with these results, CCR2 deficiency strongly impaired monocyte recruitment to the infected brains but was redundant for disease pathogenesis. In contrast, specific depletion of polymorphonuclear granulocytes caused elevated local bacterial titer within the brains, led to an aggravated clinical course, and enhanced mortality. Thus, CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> myeloid cells but not Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes were found to be vital for host defense in bacterial meningitis by a predominantly extracellular pathogen.

## INTRODUCTION

*Streptococcus pneumoniae* is a Gram-positive extracellular bacterial pathogen that causes severe bacterial meningitis in industrialized countries with a mortality rate of one fourth in adults. Many patients survive with neurological sequelae such as deafness, epileptic seizures and neuropsychological deficits <sup>1,2</sup>.

In humans suffering from bacterial meningitis and in animal models of this disease, leukocytes, predominantly myelomonocytic cells such as monocytes, macrophages and neutrophil granulocytes, quickly enter the subarachnoid space in response to local production of cytokines, chemokines and other chemotactic stimuli <sup>3</sup>. Activated myeloid cells play a major role in bacterial clearance and also secrete a variety of inflammatory mediators that may not only kill bacteria, but also cause damage to the CNS <sup>4</sup>. Since the cerebrospinal fluid itself lacks cell populations capable of initiating effective immune response against invading pathogens, it remains obscure which cells are initially stimulated by bacteria and bacterial products and trigger leukocyte migration into the CNS.

Local tissue inflammatory responses to microbial challenge are not only characterized by early neutrophil attraction but also by concomitant prolonged monocyte recruitment. Although chemokine release and cell surface display of complementary leukocyte and endothelial/epithelial adhesion molecules are centrally involved in this process, the underlying role of monocyte recruitment during bacterial meningitis is still unclear. In a rat model of pneumococcal meningitis, liposome based depletion of meningeal and perivascular macrophages aggravated clinical symptoms and led to increased bacterial titers suggesting a protective role of these cells during bacterial meningitis <sup>5</sup>. Depletion of all blood monocytes and macrophages in spleen and liver and probably also many tissue macrophages including perivascular macrophages reduced the migration of white blood cells into the cerebrospinal fluid (CSF) and strongly inhibited local IL-1 $\beta$  concentrations in infected rats suggesting a crucial role of monocytes during meningitis <sup>6</sup>.

Monocytes, as blood mononuclear cells with bean-shaped nuclei, express CD11b, CD11c, CD14 and CD16 in humans and CD11b and F4/80 in mice, and lack B, T and NK markers. However, monocytes are morphologically and phenotypically heterogeneous with different roles. Nowadays, they are subdivided into two main subsets: a short lived "inflammatory" subset (Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>lo</sup>) that homes to inflamed tissue, where it can trigger immune response and a "resident" subset (Ly-6C<sup>lo</sup>CCR2<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>) with a longer half-time, which homes to non-inflamed tissues <sup>7</sup>. Dendritic cells such as Langerhans cells in the skin <sup>8</sup> and tissue



macrophages like postnatal microglia in the brain<sup>9</sup>, however, were recently shown to raise from the Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocyte population indicating a broad role of this myeloid subpopulation for tissue homeostasis during health and disease. Whether the different monocyte populations are already fully differentiated in the bone marrow or whether they can shift into each other in the peripheral blood is still a matter of debate. The monocyte population in the blood stream that is recruited to the inflamed meninges during bacterial infection has not yet been identified *in vivo*. Elucidating the cell types involved could theoretically open new therapeutically options. We therefore set out experiments to characterize the specific monocyte subtype that is recruited to the inflamed brain and then to identify its role for the local immune response within the meninges.

Neutrophils are among the first to be recruited to a site of infection or a diseased site. Among various inflammatory mediators, CXC chemokines including IL-8 (CXCL8), MIP-2 (CXCL2), and KC (CXCL1) are the most critical for such recruitment. Neutrophil granulocytes can be divided into three subpopulations based on distinct patterns of cytokine and chemokine production, TLR expression, and surface CD49d and CD11b<sup>10</sup> but they can also be distinguished based on the expression level of PMN-specific Gr-1 Ag<sup>11</sup>.

In this report we demonstrate that concomitant with CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup>granulocytes also CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> but not Ly-6C<sup>lo</sup>CCR2<sup>-</sup> monocytes invade the meninges during bacterial infection and are capable of modulating local cyto- and chemokine response. Recruitment of myelomonocytic cells is independent from CCR2 signalling but, surprisingly, the absence of inflammatory Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes does not alter host death and bacterial replication in the central nervous system (CNS) and the spleen. In contrast, our study identifies Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup>granulocytes as the major myeloid cell subset that crucially drives defense against *S. pneumoniae* infection in the CNS

## RESULTS

### **Rapid invasion of distinct myelomonocytic cell populations to the meninges during *S.pneumoniae* infection**

We first determined extent and kinetics to which specific myeloid subsets are recruited to the inflamed CNS. For this purpose wild-type (wt) mice were challenged with  $10^5$  CFU of *S. pneumoniae* injected into the lumbar cerebrospinal fluid and blood cells as well as infiltrated cells in the meninges were characterized by flow cytometry (Fig. 1). As early as 12 h after infection, a strong increase of CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> and to a lesser extent of CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> cells was detectable in the peripheral blood (Fig. 1A). Subsequent analysis revealed that these myeloid cells consisted mainly of CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> granulocytes (R2 gate) and of CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> (R1 gate) inflammatory monocytes. Comparative analysis to B lymphocytes indicated that Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> granulocytes increased from a  $0.33 \pm 0.05$  (mean  $\pm$  s.e.m.) ratio before infection to  $24.77 \pm 8.23$  36 h after infection whereas Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> inflammatory monocytes improved from a  $0.07 \pm 0.01$  ratio at 0 h to  $0.85 \pm 0.27$  after 36 h. Interestingly, the increase of myeloid cells during the first hours after infection was not due to the appearance of bacteria in blood, since we were only able to detect *S.pneumoniae* after 24 h post infection (p.i.) there (data not shown).

Importantly, myelomonocytic infiltrates were observed in the meninges of the central nervous system (CNS) already at 12 h (data not shown) and the cellular composition was examined in more detail at 30 h p.i. (Fig. 1B). Mice exhibited numerous CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> cells that were further categorized by their levels of Ly-6C and Ly-6G expression. Notably, we could detect large numbers of CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes as well as CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup>CCR2<sup>-</sup> granulocytes whereas the CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>lo</sup>CCR2<sup>-</sup> resident monocytes were not increased in the CNS during *S.pneumoniae* meningitis.

Taken together these data demonstrate that both CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes as well as CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup>CCR2<sup>-</sup> granulocytes are strongly attracted to the inflamed meningitis early after infection.

### **CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> monocytes are efficiently recruited to the inflamed meninges**

To assess the ability of GFP-marked monocyte subsets derived from bone marrow to be recruited to the meninges during *S. pneumoniae* infection we did adoptive transfer experiments. We took advantage of the CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> mice, which allow division of the

Ly-6C<sup>hi</sup> and Ly-6C<sup>lo</sup> monocyte fractions on the basis of GFP expression levels<sup>15</sup>. Respective GFP bone marrow cells were adoptively transferred 6 h p.i. and meningeal cells were prepared 24 h later and examined by flow cytometry (Fig. 2). GFP-labelled cells were clearly visible in the infected CNS but not in the healthy brain. Moreover, these donor derived attracted cells were clearly positive for CD11b and Ly-6C but negative for Ly-6G indicating the inflammatory nature of these myeloid cells. Interestingly, we were not able to detect any GFP<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>lo</sup> resident monocytes in the meninges after transfer of CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> bone marrow cells.

### **CCR2 is not required for the protection against *S. pneumoniae* meningitis**

The chemokine receptor CCR2 as the cognate receptor for CCL2 has been shown to be crucially involved in the pathogenesis of both sterile autoimmunity<sup>19</sup> as well as of several infections by bacterial and viral germs such as *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, Theiler's murine encephalomyelitis virus and influenza virus<sup>20-23</sup>.

To study the relevance of CCR2 for the pathogenesis of bacterial meningitis CCR2-deficient or competent mice were challenged with various quantities of *S. pneumoniae*, and survival time and clinical course were monitored (Fig. 3A). After intralumbal injection into the cerebrospinal fluid (CSF) with a high dose (10<sup>5</sup> CFU) and lower dose (10<sup>4</sup> CFU) of *S. pneumoniae* serotype 3, all treated CCR2<sup>-/-</sup> and wt mice reached terminal disease with similar kinetics without any statistically significant differences. In both genotypes, increased illness was correlated with typical clinical signs of meningitis such as seizures, paralysis and neck stiffness<sup>14</sup>. Disease score was clearly not different in both groups.

We then determined the ability of bacteria to multiply over time in spleens and brains of infected mice (Fig. 3B). Bacterial load was determined by plating serial dilutions of homogenized tissues on blood-agar plates. Bacterial growth was similarly low at 12 h p.i. in spleens and brains of both groups, but titers in the brain were always higher than in the spleen. Further measurements at 24 and 36 h after injection confirmed that the bacterial load in wt and CCR2<sup>-/-</sup> mice always were very similar. A lack of CCR2 therefore does not impair the kinetics of *S. pneumoniae* invasion and multiplication after administration of bacteria into the lumbar CSF.

It has been reported that the CCR2-CCL2 axis is required for the egress of bone marrow cells and that the lack of CCR2 results in fewer circulating Ly-6C<sup>hi</sup> cells<sup>9,24</sup>. We therefore determined the frequency and kinetics of Ly-6C<sup>hi</sup> cells in the meninges of CCR2 knockout and wt mice at different time points after infection. Importantly, the

amount of Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> monocytes and Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> granulocytes was identical in the meninges of CCR2<sup>-/-</sup> and wt mice prior to infection (Fig. 3C). After infection, however, the quantity of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes peaked in wt mice 24 h p.i. with similar frequency to Ly-6G<sup>+</sup> granulocytes and slightly decreased 6 h later. In contrast, CCR2-deficient mice largely failed to show a significant recruitment of Ly-6C<sup>hi</sup> cells into the CNS and only Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> granulocytes were detectable there. Further histochemical analysis confirmed the strong reduction of MAC-3<sup>+</sup> monocytes/macrophages in the meninges in the absence of CCR2 whereas the amount of chloracetate esterase<sup>+</sup> granulocytes was virtually indistinguishable between the two genotypes (Fig. 3D).

### **Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> monocytes regulate meningeal cyto- and chemokine production but are not required for the control of bacterial meningitis**

Inflammatory Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> monocytes are equipped with high levels of receptors that respond to inflammatory cytokines, resulting in migration of the cells to site of inflammation, where they subsequently contribute to resolution of the inflammatory process and might finally differentiate into dendritic cells <sup>7</sup>.

We generated mice lacking inflammatory Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> monocytes in order to determine whether these cells might contribute to protection from pneumococcal infection. Application of the  $\alpha$ -CCR2 antibody MC-21 resulted in an efficient reduction of this specific monocyte subset in the blood stream whereas Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> granulocytes (Fig. 4A) or Ly-6C<sup>-</sup>Ly-6G<sup>-</sup> resident monocytes remained numerically unchanged (not shown and <sup>9</sup>). Unexpectedly, both groups of infected mice had a similar survival curve and clinical scores across the entire disease time were almost identical (Fig. 4B). Even secondary lymphoid organs such as the spleen, which is an important bacterial clearance site, contained approximal equal bacterial titers in all animals tested independent from the presence of inflammatory monocytes (Fig. 4C). As expected, the amount of Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> monocytes was strongly diminished in the meninges of infected animals after application of the MC-21 antibody (Fig. 4D) pointing to a confined lack of this myeloid cell population. Subsequent histopathological analysis confirmed the reduction of MAC-3<sup>+</sup> monocytes/macrophages in the MC-21 treated animals whereas chloracetate esterase labeled granulocytes were still present (Fig. 4E).

The local cytokine and chemokine production was then assessed quantitatively by RT-PCR in Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> depleted animals during meningitis (Fig. 4F). Surprisingly, the enzyme lysozyme that has known antibacterial activity against Gram-positive bacteria

was slightly reduced and IL-1 $\beta$  and CXCL2 were significantly increased in the absence of Ly-6C<sup>hi</sup> cells. We therefore conclude that the presence of Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> inflammatory monocytes might not be a prerequisite for the control and resolution of *S.pneumoniae* infection within the CNS but their absence lead to a change of the cytokine repertoire.

### **Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> myeloid cells are mandatory for the control of *S.pneumoniae* infection of the meninges**

We next studied the impact of Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> granulocytes for disease pathogenesis. To do so Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> cells were pharmacologically depleted by using an  $\alpha$ -Gr-1 antibody prior to disease. Flow cytometry verified almost complete deletion of this myeloid cell population but Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> cells were unaltered (Fig. 5A).

Mice were subsequently inoculated with 10<sup>5</sup> CFU of *S. pneumoniae* and incubation times and clinical scores to terminal disease were measured (Fig. 5B). Importantly, Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> depleted animals died significantly earlier and exhibited more severe clinical symptoms of disease compared to isotype treated control animals (videos 1 and 2). We then compared bacterial loads in spleens and brains 24 h after infection (Fig. 5C). Notably, the bacterial concentrations were significantly increased in the CNS but not in the spleens after Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> depletion in comparison to immunocompetent animals proving an essential function of these cells for combating *S. pneumoniae* infection.

FACS analysis confirmed that Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> granulocytes were virtually absent from the meninges of antibody treated animals (Fig. 5D). Accordingly,  $\alpha$ -Gr-1 treated animals had much less meningeal granulocytes on histological sections during infection when compared to the control animals (Fig. 5E). Since Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> cells might contribute to the bacterial clearance by releasing bacteriotoxic cytokines, pro-inflammatory peptides in the meninges were measured 30 h p.i. (Fig. 5F). We observed strongly reduced level of CXCL2, IL-15 and IL-1 $\beta$  suggesting that bacterial clearance might act via a burst of several chemoattractive and proinflammatory factors.

The results imply that Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> cells rather than Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> or Ly-6C<sup>-</sup>Ly-6G<sup>-</sup> monocytes are required to provide local host resistance to bacterial meningitis induced by *S. pneumoniae*.

## DISCUSSION

We have shown here that specific myelomonocytic subsets, namely CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes, CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> granulocytes but not CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup> monocytes are efficiently recruited to the meningeal compartment during bacterial meningitis caused by the Gram-positive pathogen *S.pneumoniae*. Depletion of either CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes or the chemokine receptor CCR2 preserved the ability to limit bacterial growth, while depletion of Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> cells conferred an increased vulnerability to pneumococcal infection. These differential and non-redundant effects of specific myeloid subsets were surprising, since all defects affected cells, which are thought to be crucial for host defense against bacteria.

The different cell populations involved in the induction of the inflammatory response in the subarachnoid space during bacterial meningitis have not been fully characterized. For example, it still remains unclear which cells are primarily stimulated by the invading bacteria and bacterial products. A candidate for this initial step could be the meningeal macrophage. However, studies which investigated the role of meningeal macrophages during meningitis by liposomal clodronate depletion of these cells showed inconsistent results<sup>5,25</sup>. Both studies used different modes of clodronate administration, either the intraventricular<sup>5</sup> or the intracisternal<sup>18</sup> route. Because of the direction of CSF flow, the intraventricular route appears to be more efficient in depleting the macrophages of the choroid plexus, ventricular ependyma and possibly also of the meninges. Intraventricular clodronate strongly reduced meningeal inflammation in a murine model of pneumococcal meningitis<sup>5</sup>. This suggests that resident macrophages within the choroid plexus, ventricular ependyma and the meninges are responsible for the cytokine and chemokine gradient causing leukocyte extravasation in early meningitis.

The contribution of circulating monocytes is less clear. This prompted us to study meningeal inflammation during pneumococcal infection in more detail. We found that in response to intralumbal *S.pneumoniae* infection both Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes and Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> granulocytes rapidly became the predominant cell types in the diseased meninges, as has been similarly shown for the lung in response to i.p. *H.influenzae* injection<sup>26</sup>.

By virtue of their mobility, equipment with immune related receptors and their ability to produce antibacterial substances such as NO, IL-1 $\beta$  and others, CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes presented a plausible candidate for the uptake and killing of extracellular Gram-positive bacteria. We found a non-essential role of monocytes/macrophages as clearance sites of *S. pneumoniae*. However, meningeal macrophages may protect brain tissue from invasion by granulocytes and bacteria

thereby preventing neuronal injury during *S.pneumoniae* meningitis<sup>25</sup>. Neuron-specific enolase in CSF as a measure of neuronal tissue damage was elevated in experimental rabbits with *S. pneumoniae* meningitis after intraisternal clodronate treatment<sup>18</sup>. In the present study, we were unable to measure neuron-specific enolase in CSF because of the low CSF volume in mice.

Several groups have employed clodronate-containing liposomes to eliminate the circulating pool of monocytes and macrophages in the blood, spleen and liver<sup>27</sup>. This approach was also used to study the role of blood-derived macrophages in experimental pneumococcal meningitis in rabbits<sup>6</sup> and experimental autoimmune encephalomyelitis in rats<sup>28</sup>. In contrast to the present approach, these studies could not distinguish and deplete the different monocyte populations specifically. Clodronate liposomes lead to depletion of all circulating monocytes, including Ly-6C<sup>hi</sup> and Ly-6C<sup>lo</sup> monocytes, and tissue macrophages such as Kupffer cells and splenic macrophages<sup>29</sup>. A transient loss of NK cell activity after intravenous liposomal clodronate infusion also has been described<sup>30</sup>. These data also indicated that the usage of phagocyte depletion by clodronate has severe impact on the immune system in general by releasing intracellular factors from dying cells. Therefore, intravenous liposomal clodronate does not appear to be suitable for the detailed study of the pathogenic mechanisms of a myeloid-based immune response as in meningitis. To overcome these limitations, we decided to deplete only the invading Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes which does not result in increased cytokine levels in the blood<sup>13</sup>.

Although it has been shown that IL-1 $\beta$  produced by monocytes/macrophages during pneumococcal meningitis is a key player for the migration of granulocytes in the CSF<sup>31,32</sup>, depletion of Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes in the meninges did not change clinical outcome in our hands. The local IL-1 $\beta$  production within the meninges was not decreased by the lack of this monocyte subtype. Our data imply that local IL-1 $\beta$  production is primarily independent from invading Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes, and other cells can maintain inflammatory cytokine production. Due to our cell-specific depletion, F4/80<sup>+</sup> meningeal and perivascular macrophages usually diminished by local liposomal clodronate treatment were still present in the meninges of treated animals. Moreover, meningeal macrophages are not be the only source of proinflammatory cytokines in the brain including the CSF. The majority of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the CSF during meningitis presumably originates from blood-derived cells after migration into the CSF or other cells within the CNS (e.g. glial cells, endothelial cells). Interestingly, local CXCL2 and IL-1 $\beta$  production was even significantly increased in the absence of inflammatory Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes but changes in cellular compositions within the CSF could lead to alterations of the cytokine pattern.

Our results further show that CCR2, the receptor for CCL2, is not necessary to inhibit the growth of bacteria in pneumococcal meningitis. It has been shown in several infection models that CCR2-dependent monocyte recruitment and activation is essential for host survival e.g. during *Listeria monocytogenes* infection<sup>33</sup>. However, our results clearly indicate that CCR2 signaling also is not required for the development of inflammation in meningitis caused by the extracellular pathogen *S.pneumoniae*. These data nicely fit to the redundant role Ly-6C<sup>hi</sup> inflammatory monocytes in our depletion experiments in view of the fact that this myeloid subset is strongly reduced in CCR2-deficient animals since this chemokine receptor is needed for the egression of monocyte populations from the bone marrow<sup>24</sup>.

CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> granulocyte depleted animals consistently demonstrated in our study earlier death and higher CNS bacterial burdens compared to control animals. This is in conflict to a previous study where induction of systemic leukopenia by nitrogen mustard in experimental rabbits did not cause increased bacterial growth rates within the CSF after intracisternal injection of *S. pneumoniae*<sup>34</sup>. One reason may be the non-selective action of nitrogen mustard which affected several lines of leukocytes but probably did not fully deplete one class of white blood cells. In this study, *S.pneumoniae* led to the induction of numerous cyto- and chemokines in the brain, including CXCL2, IL-15 and IL-1 $\beta$  shortly after bacterial exposure. Granulocytes produce large amounts of these factors in an autocrine fashion, and CXCL2, IL-1 $\beta$  and IL-15 were clearly down-regulated in Gr-1 depleted animals. Therefore, our data imply that these molecules are required for the granulocyte-mediated host defense in experimental pneumococcal meningitis. These conclusions are in line with previous studies, which showed a critical role of neutrophils and CXCL2 and KC in the containment and neutralization of bacteria in a brain abscess model<sup>35</sup>.

Furthermore, we found that depletion of Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> granulocytes resulted in strongly decreased levels of the chemokine CXCL2. This chemokine has shown to play an important role in the pathogenesis of meningitis, since its neutralization reduced neutrophil recruitment to the CNS during bacterial meningitis caused by *H.influenzae*<sup>36</sup>. Another study nicely demonstrated that in mice deficient in the murine IL-8 receptor homologue (a receptor for CXCL2), invasion of Ly-6G<sup>+</sup> granulocytes into the peritoneal cavity in response to inflammatory stimuli was strongly impaired<sup>37</sup>. Conversely, increased levels of CXCL2 accompanied by enhanced granulocytosis in the CSF were not correlated to disease protection in CD14-deficient animals suffering from pneumococcal meningitis<sup>38</sup>.

It is well known that the  $\alpha$ -Gr-1 antibody used in our study strongly reacts with Ly-6G and this antibody also interferes with another Ly-6 family molecule, Ly-6C<sup>39</sup>. Ly-6G is



expressed on polymorphonuclear leukocytes (PMN), namely granulocytes, while Ly-6C is expressed on various mononuclear cells including PMNs and monocytes<sup>11,40</sup>. In the present study, we used an antibody concentration of 10 µg/ml that ensured selective depletion of CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> cells but not of CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> or CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup> monocytes<sup>9</sup>. Under these conditions we were able to dissect the functional properties of Gr-1<sup>+</sup> versus Gr-1<sup>-</sup> cells during bacterial meningitis.

How might granulocytes execute their antibacterial program? In addition to the production of proteolytic enzymes and reactive oxygen intermediates, interleukins are critical for the performance of granulocytes. A key role for IL-15 for the clearance of bacteria was shown recently<sup>26</sup>. IL-15 was produced by Gr-1<sup>+</sup> granulocytes. It was required for efficient clearance of experimental murine *H.influenzae* pneumonia, as 4 days p.i. lungs from IL-15 knock out mice contained 100-fold more bacteria than wt mouse lungs. IL-15 may enhance granulocyte activity via the autocrine system and activates NK cells by binding to IL-15Rα and/or IL-2R on the surface of NK cells and granulocytes<sup>26</sup>. IL-15 further plays a pivotal role in the activation and survival of NK cells by close interaction with granulocytes. Secretion of IL-15 by CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> cells could therefore result in further activation of NK cells. NK cells also produce IFNγ and other cytokines such as TNFα that are involved in killing of intra- and extracellular pathogens. Accordingly, CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> granulocyte-depleted C57BL/6 mice were in our hands more susceptible to pneumococcal meningitis demonstrating that this myeloid cell population is important for the control of extracellular bacteria as well and IL-15 might play a pivotal role in this scenario.

In addition to their beneficial effect in bacterial neutralization, granulocytes have the potential to induce tissue damage through the release of soluble factors. Indeed, previous studies have demonstrated that limiting granulocyte influx to the CNS provides some benefit in situations where inflammation accompanies CNS disease<sup>41,42</sup>.

In conclusion, this study clearly demonstrates that neutrophilic granulocytes are able to inhibit the growth of *S. pneumoniae* in meningitis thereby supporting antibiotic therapy administered under clinical conditions. Unlike macrophages resident within the CNS, circulating monocytes do not appear to contribute to the containment of infection in meningitis caused by predominantly extracellular encapsulated bacteria. Post-infection strategies aiming at enhancing the phagocytic activity of granulocytes in a specific time frame might offer some protection in meningitis.

**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Olga Kowatsch for excellent technical assistance. Grant acknowledgment: Fritz-Thyssen-Stiftung to MP and the Gemeinnützige Hertie-Stiftung to MP. AM is a fellow of the Gertrud Reemtsma foundation.

## FIGURES

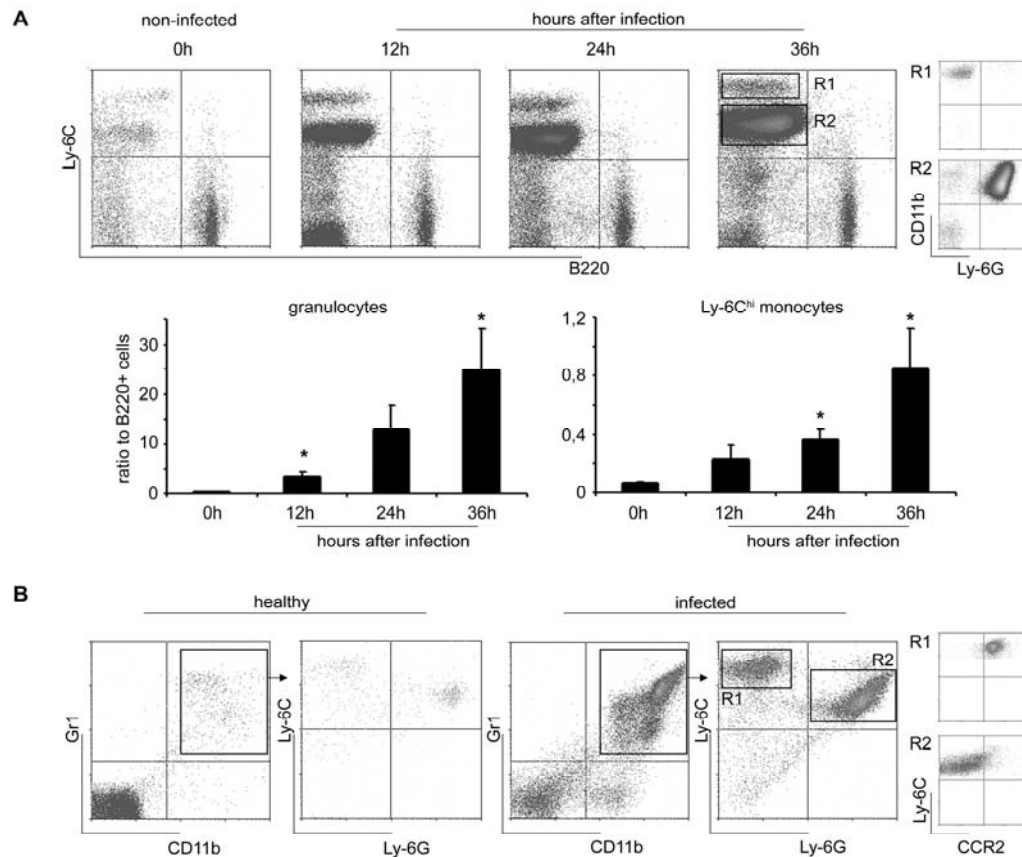
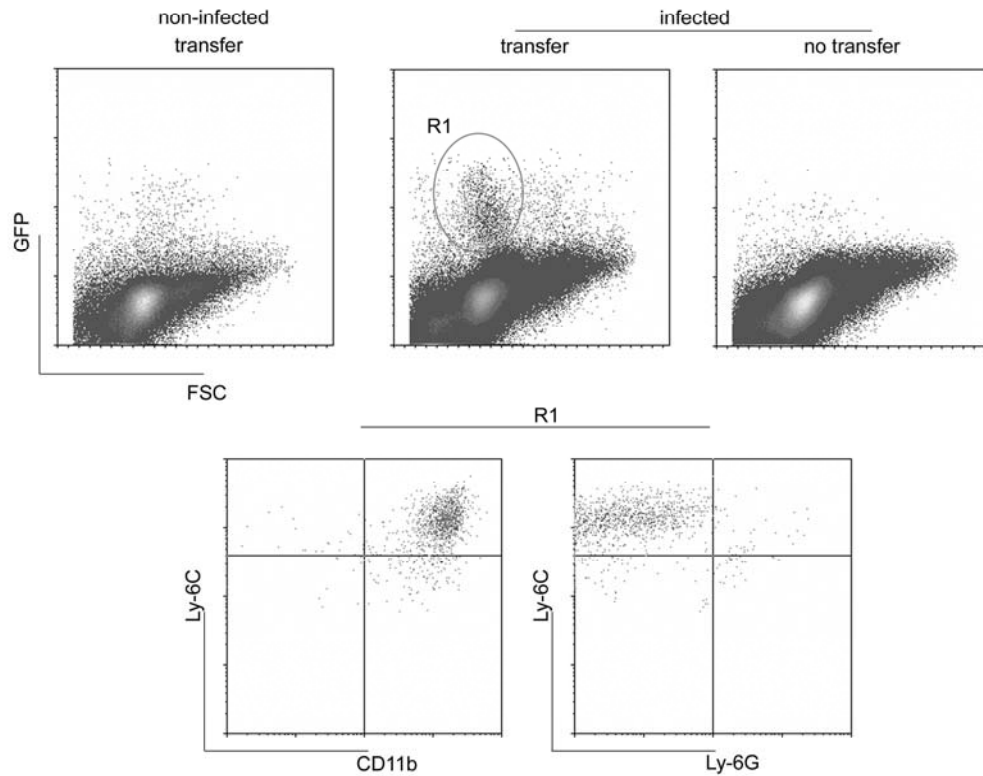


Figure 1

**Figure 1: Increase of CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes and CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> granulocytes during *S.pneumoniae* infection of the central nervous system.**

**A)** Inflammatory make up of the peripheral blood at indicated time points after bacterial infection examined by flow cytometry. Myeloid cells were normalized to 20.000 B cells (B220<sup>+</sup>) and a ratio was calculated. Data represent means  $\pm$  s.e.m. Asterisks indicate statistically significant differences to the non-infected controls ( $p \leq 0.05$ ). At least five mice per group were used for quantification.

**B)** Characterization of meningeal infiltrates 30 h post *S.pneumoniae* challenge (right) in comparison to healthy control mice (left). Notably, the Gr-1<sup>+</sup> staining revealed that infiltrates are dominated by CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes as well as by CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup>CCR2<sup>-</sup> granulocytes.

**Figure 2**

**Figure 2: Adoptively transferred inflammatory GFP<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes are efficiently recruited to the meninges during bacterial infection.**

CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> monocytes were injected 6 h after infection and meningeal cells were recovered 24 h later. Transferred cells were detectable in the CNS of infected but not in healthy control mice. GFP<sup>+</sup> cells (R1 gate) express the cell surface markers Ly-6C and CD11b but not Ly-6G.

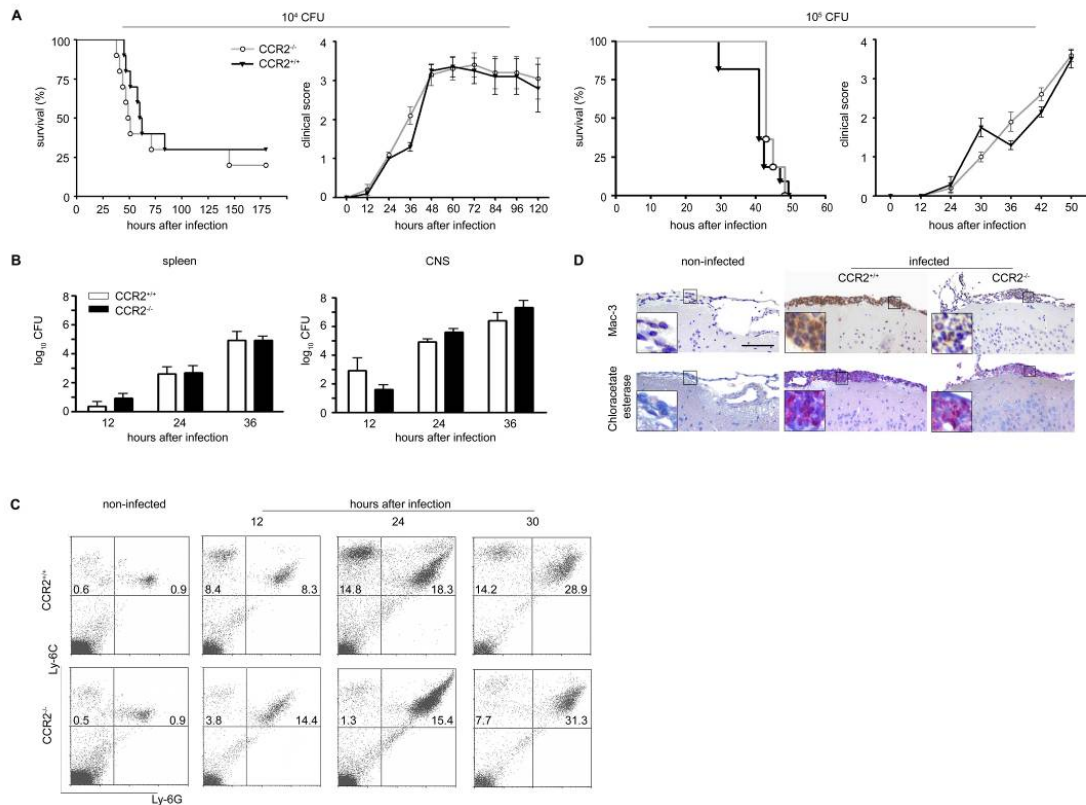


Figure 3

**Figure 3: Unaltered pathogenesis of *S.pneumoniae* meningitis in the absence of CCR2.**

**A)** CCR2<sup>-/-</sup> and CCR2<sup>+/+</sup> mice were challenged with either 10<sup>4</sup> (left) or 10<sup>5</sup> CFU (right) of *S.pneumoniae* and survival as well as clinical score were monitored. There were no statistically significant differences observed between the groups. At least ten animals per group were used. Data represent means ± s.e.m.

**B)** Normal bacterial clearance in the peripheral (spleen) and central compartment (central nervous system, CNS) 12, 24 and 36 h after infection. No statistically significant differences were detectable. At least 5 animals per time point were used.

**C)** Time dependent myeloid infiltration of the meninges after intraspinal *S.pneumoniae* infection. A strong influx of Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>-</sup> monocytes and Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> granulocytes was detectable in CCR2<sup>+/+</sup> animals. In contrast, CCR2 deficient mice revealed strongly diminished numbers of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes during infection, whereas the Ly-6G<sup>+</sup> granulocytes appeared largely unchanged. One representative animal out of five is shown.

**D)** Immunohistochemistry of the meninges depicted less MAC-3<sup>+</sup> monocytes/macrophages in CCR2<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type controls whereas chloroacetate esterase staining showed similar amount of polymorphonuclear granulocytes during *S.pneumoniae* meningitis. Tissue samples were taken 30 h after infection. Bar = 100 μm.

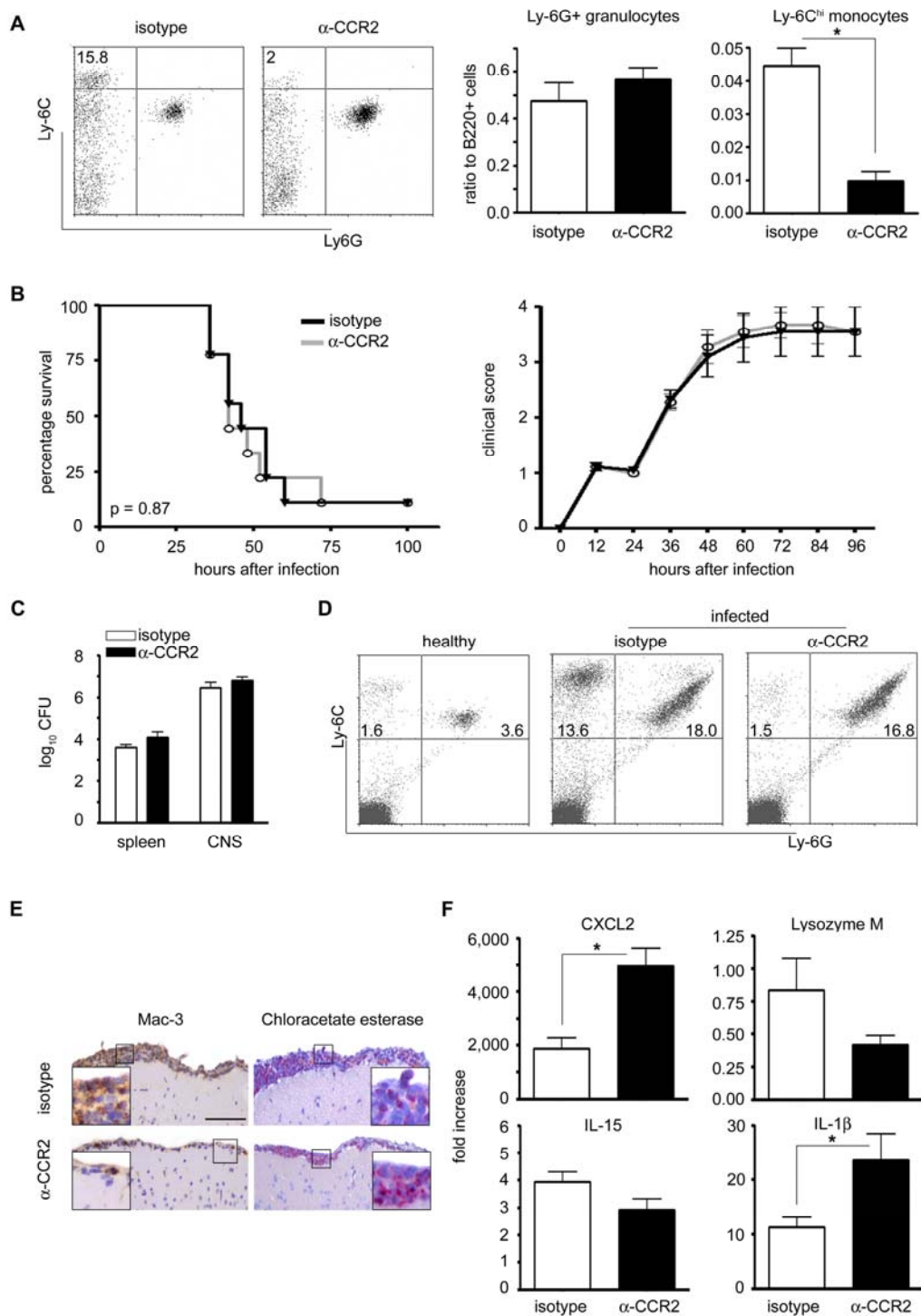


Figure 4

Figure 4: CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes modulate local CXCL2 and IL-1 $\beta$  production within the CNS but do not provide protection against bacterial infection.

**A)** Application of an  $\alpha$ -CCR2 antibody (MC-21) strongly depleted Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes but not Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> granulocytes in the peripheral blood 12 h after injection of 10  $\mu$ g of the antibody or of the IgG2b isotype control, respectively (left). Only CD11b<sup>+</sup> cells were gated in the dot blots. Ratio of Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes and Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> granulocytes to B220<sup>+</sup> B cells in the peripheral blood (right). At least five animals per group were used. Asterisk indicates significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

**B)** Depletion of Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes did not modulate the survival of mice (left) and the clinical score (right) of meningitis. Injection of antibodies was performed 12 h prior to infection and every 24 h later. Ten mice per group were used. Data indicate means  $\pm$  s.e.m.

**C)** Unchanged bacterial loads of *S.pneumoniae* 36 h after infection in spleen and cerebellum in the absence of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes. Data represent means  $\pm$  s.e.m.,  $n = 5$  animals.

**D)** Strong decrease of invading inflammatory monocytes into the meninges after depletion of Ly-6G<sup>-</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes in the peripheral blood. Importantly, the influx of Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> granulocytes remained unchanged. One representative animal out of five is shown.

**E)** Histological examination of the meninges illustrating a strong reduction of infiltrating monocytes/macrophages (MAC-3) in Ly-6C<sup>hi</sup> depleted animals in comparison to an unchanged amount of chloracetate esterase<sup>+</sup> granulocytes. Bar = 100  $\mu$ m.

**F)** RNA was isolated from meningeal cells and real-time PCR was performed for CXCL2, lysozyme M, IL-15 and IL-1 $\beta$ . White bars illustrate control (isotype-treated) animals and black bars represent Ly-6C<sup>hi</sup> depleted animals. Three mice were used per group. Data show means  $\pm$  s.e.m. Asterisks indicate statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

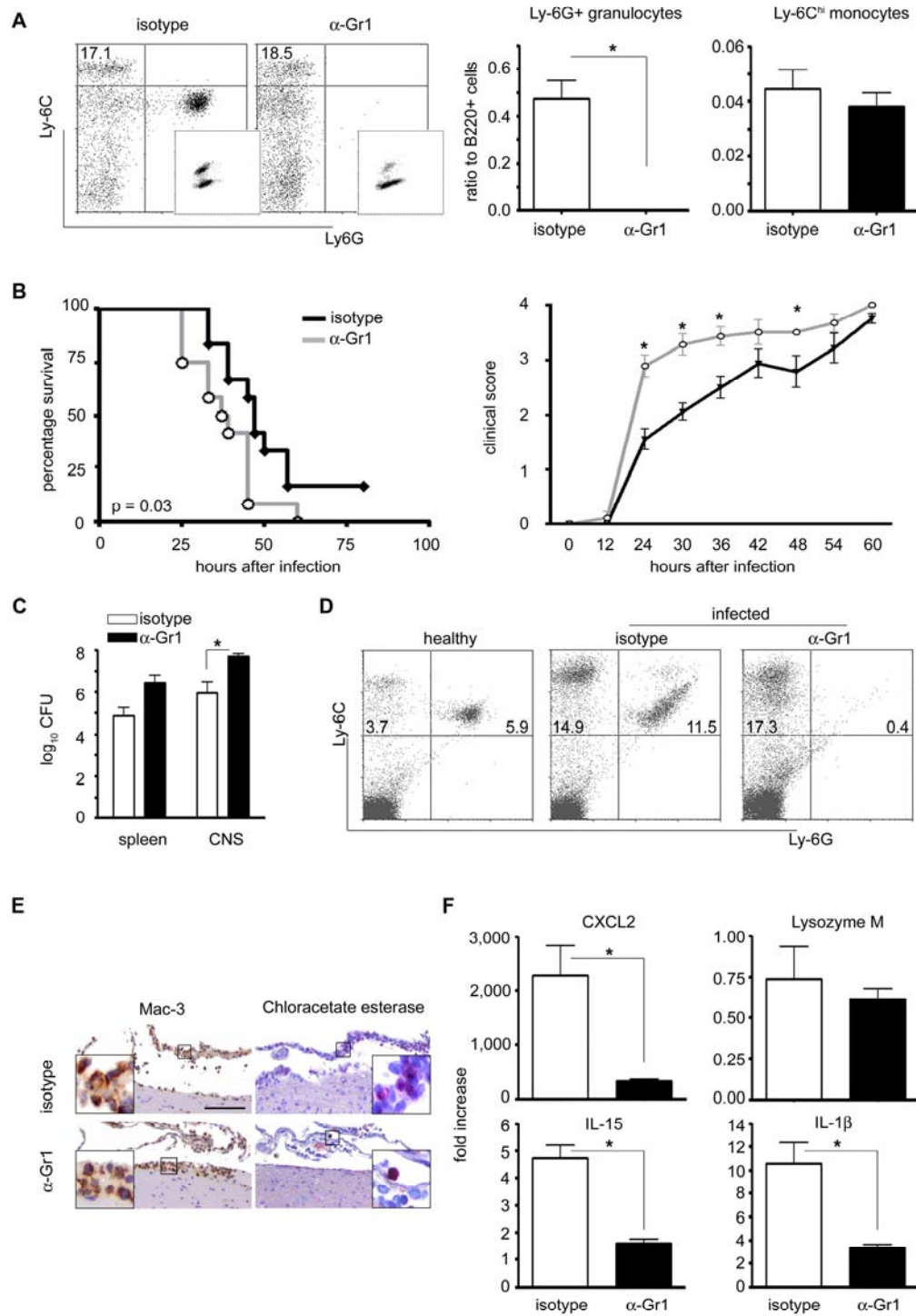


Figure 5

Figure 5: CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> myeloid cells are essential for the control and clearance of *S.pneumoniae* meningitis.



**A)** Efficient depletion of Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> granulocytes in the peripheral blood by monoclonal  $\alpha$ -Gr1 antibody RB6-8C5. 10  $\mu$ g of  $\alpha$ -Gr1 led to a complete absence of Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> granulocytes in comparison to isotype control (rat IgG2b). Inserts in the FACS blots (left) showed in the forward and side scatter that the  $\alpha$ -Gr1 treatment did not lead to a down regulation of Gr1 since the side scatter high cells are disappearing. Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes were not affected by this protocol. Quantification was performed by counting similar numbers of B220<sup>+</sup> cells. Five animals per group were used. Asterisk indicates significant difference ( $p < 0.05$ ).

**B)** Depletion of granulocytes led to earlier death (left) of infected mice and a significantly increased clinical score (right). Injection of antibodies was performed 12 h prior to infection and every 24 h later. Ten mice per group were used. Asterisk indicates statistically significant difference ( $P < 0.05$ ).

**C)** *S.pneumoniae* CFU was measured 24 h after infection in isotype and  $\alpha$ -Gr1 treated mice. Elevated bacterial load in the cerebella of  $\alpha$ -Gr1 treated mice ( $p < 0.05$ ).

**D)** FACS analysis of antibody treated animals revealed the absence of Ly-6G<sup>+</sup>Ly-6C<sup>int</sup> granulocytes in the meninges. One representative animal out of five is shown.

**E)** Absence of granulocytes was confirmed by immunohistochemical staining of the meninges. In  $\alpha$ -Gr1 treated mice Mac-3<sup>+</sup> monocytes/macrophages were present in comparable numbers, whereas chloracetate esterase positive cells were detectable in low numbers. Bar = 100  $\mu$ m.

**F)** RNA was isolated from the meninges 30 h post infection and real-time PCR was performed for CXCL2, Lysozyme M, IL-15 and IL-1 $\beta$ . Isotype control animals are shown as white bars and granulocyte-depleted mice as black bars. Three mice were used per group. Data are shown as means  $\pm$  s.e.m. Asterisks indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

**Video 1:** Clinical disease of isotype treated infected mice at 30 h p.i..

**Video 2:** Enhanced clinical disease in Ly-6C<sup>int</sup>Ly-6G<sup>+</sup> depleted animals at 30 h p.i.

## MATERIAL AND METHODS

### Induction of meningitis and myeloid cell depletion

A strain of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 was used. Bacteria were grown on blood agar plates overnight and harvested with 0.9% saline. Frozen aliquots were used for the experiments and adjusted with saline to the required concentration of 4 or 5 log<sub>10</sub>CFU in 25 µl. Meningitis experiments were conducted in male C57BL/6 and CCR2<sup>-/-</sup> mice using a modification of a previously published model of meningitis based on injection of bacteria into the lumbar cerebrospinal fluid<sup>12</sup>. In brief, mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamin 100 mg/kg and xylazine 20 mg/kg. A skin incision was made exposing the lumbar spine. Using a 29-gauge needle, 25 µl of a suspension containing 4 or 5 log<sub>10</sub>CFU *S.pneumoniae* or an equal amount of saline were slowly injected into the spinal canal at the level of L4 or L5. All animals resumed their normal behavior after awaking from anesthesia. For depletion experiments, antibodies were injected 12 h prior infection and every 24 h later. Transient neutropenia was achieved by using 10 µg anti Gr-1 mAb (RB6-8C5; eBioscience). Inflammatory monocytes were depleted with 10 µg mAb MC-21<sup>9,13</sup>. Rat IgG2b served as control antibody.

During the course of the experiment mice were assessed by a clinical score<sup>14</sup>. Mice unable to walk were killed for ethical reasons. For the determination of bacterial load, animals were killed at several time points and the cerebellum and spleen were removed, homogenized in saline (dilution 1:10), and undiluted homogenate as well as serial 1: 10 dilutions (10 µl each) were plated on blood-agar plates. The detection limit was 10<sup>3</sup> CFU/ml. CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> mice were a kind gift of Dan Littman, New York<sup>15</sup> and CCR2<sup>-/-</sup> animals were provided by William A. Kuziel, Texas<sup>16</sup>.

### Cell preparation

For meningeal cell isolations mice were transcardially perfused with PBS. With longitudinal and diagonal incisions through the cranium, cranial bone were removed. Meninges were afterwards carefully removed and rinsed in PBS. For adoptive transfer experiments mice received 2.5 x 10<sup>5</sup> GFP<sup>+</sup> bone marrow cells from CX<sub>3</sub>CR1<sup>GFP/+</sup> mice i.v. 6 h after infection with *S.pneumoniae* or saline and 24 h later meningeal cells were isolated and cells were prepared for FACS analysis.

---

All experiments were performed at the Central Animal Care Facility of the University Hospital Göttingen. The protocol was approved by the district Braunschweig legislation for animal experiments, Germany.

### **RNA isolation and real-time PCR analysis**

RNA was extracted from isolated meningeal cells by using RNAeasy Mini Kits (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. The tissue was flushed with ice cold HBSS and RNA was isolated using RNAeasy Mini kits (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturers instructions. The samples were treated with DNaseI (Roche, Mannheim, Germany) and 1 µg of RNA was transcribed into cDNA using oligo-dT primers and the SuperScript II RT kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). 2,5 µl cDNA was transferred into a 96-well Multiply<sup>®</sup> PCR-plate (Sarstedt, Germany) and 12,5 µl ABsolute<sup>™</sup> QPCR<sup>®</sup> SYBR Green master mix (ABgene, Surrey, UK) plus 9,6 µl ddH<sub>2</sub>O was added. The PCR reaction was performed as described recently<sup>17</sup>.

### **Flow cytometry**

Blood and meningeal cell samples were prepared at 4°C in buffer solution (PBS containing 2% FCS and 0.2% NaN<sub>3</sub>) and stained with CD11b, Gr-1, B220, NK1.1, CD45 (all eBioscience), Ly-6C and Ly-6G (BD Pharmingen) or CCR2<sup>18</sup>. After lysis of erythrocytes with FACS lysis solution for blood samples (Becton Dickinson, San Jose, California), cell suspensions were analyzed on a FACS Calibur (Becton Dickinson). Data were acquired with WinMDI.

### **Tissue preparation and immunohistochemistry**

Deparaffinised and hydrated brain tissue was cut into 1-µm-thick sections. Sections were then pre-treated with microwaving for 3 × 5 minutes in citric acid buffer, 10 mmol/L, pH 6.0. After blocking with 10% fetal calf serum/phosphate-buffered saline (FCS/PBS) for 30 minutes, primary antibodies were applied. For chloracetate esterase staining longitudinal paraffin sections were incubated for 1 h with a solution containing naphthol-AS-D chloracetate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pararosaniline (Merck, Darmstadt, Germany) and sodium nitrite (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Granulocytes appeared as red stained cells, evidence for metabolism of chloracetate esterase.

For MAC-3 staining was used rat MAC-3 anti mouse antibody (1:200, Becton Dickinson, San Jose, California) for 30 minutes at room temperature. As secondary

antibodies were biotinylated rabbit anti-rat (DAKO, Copenhagen, Denmark) used diluted 1:200 in PBS containing 1% bovine serum albumin for 60 minutes. The slides were counterstained with hemalaun (Merck, Darmstadt, Germany) and washed with aqua dest.

**Statistical analysis.**

Statistical differences of clinical scores were evaluated using a non-paired Student's *t* test. Differences were considered significant when *p* value < 0.05.

---

**LITERATURE CITED**

- (1) Bohr V, Paulson OB, Rasmussen N. Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol*. 1984;41:1045-1049.
- (2) Schmidt H, Heimann B, Djukic M et al. Neuropsychological sequelae of bacterial and viral meningitis. *Brain*. 2006;129:333-345.
- (3) Nau R, Bruck W. Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci*. 2002;25:38-45.
- (4) Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:721-736.
- (5) Polfliet MM, Zwijnenburg PJ, van Furth AM et al. Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J Immunol*. 2001;167:4644-4650.
- (6) Zysk G, Bruck W, Huitinga I et al. Elimination of blood-derived macrophages inhibits the release of interleukin-1 and the entry of leukocytes into the cerebrospinal fluid in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol*. 1997;73:77-80.
- (7) Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71-82.
- (8) Ginhoux F, Tacke F, Angeli V et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol*. 2006;7:265-273.
- (9) Mildner A, Schmidt H, Nitsche M et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6C(hi)CCR2(+) monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci*. 2007;10:1544-1553.
- (10) Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M et al. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity*. 2004;21:215-226.
- (11) Miyazaki S, Ishikawa F, Fujikawa T, Nagata S, Yamaguchi K. Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide induces dynamic migration of Gr-1high polymorphonuclear neutrophils in the murine abdominal cavity. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11:452-457.
- (12) Djukic M, Mildner A, Schmidt H et al. Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain*. 2006;129:2394-2403.
- (13) Bruhl H, Cihak J, Plachy J et al. Targeting of Gr-1+,CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2975-2985.
- (14) Wellmer A, Gerber J, Ragheb J et al. Effect of deficiency of tumor necrosis factor alpha or both of its receptors on *Streptococcus pneumoniae* central nervous system infection and peritonitis. *Infect Immun*. 2001;69:6881-6886.

- 
- (15) Jung S, Aliberti J, Graemmel P et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol.* 2000;20:4106-4114.
  - (16) Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12053-12058.
  - (17) Prinz M, Garbe F, Schmidt H et al. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2006;116:456-464.
  - (18) Mack M, Cihak J, Simonis C et al. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol.* 2001;166:4697-4704.
  - (19) Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2000;192:899-905.
  - (20) Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997;186:1757-1762.
  - (21) Peters W, Scott HM, Chambers HF et al. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:7958-7963.
  - (22) Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda N. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol.* 2000;156:1951-1959.
  - (23) Bennett JL, Elhofy A, Charo I et al. CCR2 regulates development of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Viral Immunol.* 2007;20:19-33.
  - (24) Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006;7:311-317.
  - (25) Trostorf F, Bruck W, Schmitz-Salue M et al. Reduction of meningeal macrophages does not decrease migration of granulocytes into the CSF and brain parenchyma in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol.* 1999;99:205-210.
  - (26) Miyazaki S, Ishikawa F, Shimizu K et al. Gr-1<sup>high</sup> polymorphonuclear leukocytes and NK cells act via IL-15 to clear intracellular Haemophilus influenzae in experimental murine peritonitis and pneumonia. *J Immunol.* 2007;179:5407-5414.
  - (27) Huitinga I, Damoiseaux JG, van Rooijen N, Dopp EA, Dijkstra CD. Liposome mediated affection of monocytes. *Immunobiology.* 1992;185:11-19.
  - (28) Huitinga I, van Rooijen N, de Groot CJ, Uitdehaag BM, Dijkstra CD. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med.* 1990;172:1025-1033.

- 
- (29) van Rooijen N, Kors N, ter Hart H, Claassen E. In vitro and in vivo elimination of macrophage tumor cells using liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1988;54:241-245.
- (30) Pinto AJ, Stewart D, van Rooijen N, Morahan PS. Selective depletion of liver and splenic macrophages using liposomes encapsulating the drug dichloromethylene diphosphonate: effects on antimicrobial resistance. *J Leukoc Biol.* 1991;49:579-586.
- (31) Ramilo O, Saez-Llorens X, Mertsola J et al. Tumor necrosis factor alpha/cachectin and interleukin 1 beta initiate meningeal inflammation. *J Exp Med.* 1990;172:497-507.
- (32) Saukkonen K, Sande S, Cioffe C et al. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med.* 1990;171:439-448.
- (33) Serbina NV, Kuziel W, Flavell R et al. Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity.* 2003;19:891-901.
- (34) Ernst JD, Decazes JM, Sande MA. Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes in pathogenesis. *Infect Immun.* 1983;41:275-279.
- (35) 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;166:4634-4643.
- (36) Diab A, Abdalla H, Li HL et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1alpha attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. *Infect Immun.* 1999;67:2590-2601.
- (37) Cacalano G, Lee J, Kikly K et al. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science.* 1994;265:682-684.
- (38) Echchannaoui H, Frei K, Letiembre M et al. CD14 deficiency leads to increased MIP-2 production, CXCR2 expression, neutrophil transmigration, and early death in pneumococcal infection. *J Leukoc Biol.* 2005;78:705-715.
- (39) Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol.* 1993;151:2399-2408.
- (40) Matsuzaki J, Tsuji T, Chamoto K et al. Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo. *Cell Immunol.* 2003;224:98-105.
- (41) Lindsberg PJ, Siren AL, Feuerstein GZ, Hallenbeck JM. Antagonism of neutrophil adherence in the deteriorating stroke model in rabbits. *J Neurosurg.* 1995;82:269-277.
- (42) Jiang N, Moyle M, Soule HR, Rote WE, Chopp M. Neutrophil inhibitory factor is neuroprotective after focal ischemia in rats. *Ann Neurol.* 1995;38:935-942.

### 3. DISKUSSION

#### 3.1 Diskussion Publikation I:

##### **“MICROGLIA IN THE ADULT BRAIN ARISE FROM Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> MONOCYTES ONLY UNDER DEFINED HOST CONDITIONS”**

Alexander Mildner, Hauke Schmidt, Mirko Nitsche, Doron Merkler, Uwe-Karsten Hanisch, Matthias Mack, Mathias Heikenwalder, Wolfgang Brück, Josef Priller and Marco Prinz

Mikroglia stellen die residenten Gewebemakrophagen des ZNS dar und fungieren als primäre Immunzelle, wenn das ZNS pathologischen Konditionen ausgesetzt wird. Unter diesen Umständen findet eine rasche Zunahme dieser Zellpopulation im ZNS statt, die sogenannte Mikrogliose. Allerdings konnte bis heute nicht geklärt werden, ob diese Zunahme durch die Rekrutierung von peripheren Blutzellen in das ZNS zustande kommt oder ob die endogene Mikroglia im ZNS proliferiert. KM-Transplantationsexperimente, bei denen das KM eines Donors in einen total bestrahlten Empfänger transplantiert wurde, führten zu dem Ergebnis, dass sich die hämatopoetischen Zellen in Mikroglia differenzieren können und dass es bei ZNS-Pathologien zu einer vermehrten Einwanderung dieser Blutvorläuferzellen kommt. Ziel der Arbeit war es, die hämatopoetische Vorläuferzelle der postnatalen Mikroglia zu charakterisieren. Weiterhin sollten alternative Transplantationsexperimente etabliert werden, um einen artifiziellen, durch die Bestrahlung des Gehirns hervorgerufenen Effekt auf die Mikroglialgenese auszuschließen.

#### 3.1.1 Die hämatopoetische Vorläuferzelle der Mikroglia

Seit 20 Jahren wird über eine Genese der Mikroglia aus peripheren Immunzellen in adulten Vertebraten diskutiert (CUADROS und NAVASCUES, 1998; KAUR et al., 2001; STREIT, 2001). Einen ersten Beweis für diese Theorie erbrachten HICKEY und KIMURA (1988), als sie das KM einer Lewis-Ratte in eine bestrahlte DA-Ratte transplantierten. Sie beobachteten, dass im Gehirn des Rezipienten morphologisch den Mikroglia



entsprechende Zellen detektierbar waren, die aufgrund der genetischen Unterschiede zwischen den Rattenstämmen von dem transplantierten Donor-KM stammen mussten. Durch den Einsatz von transgenen Mäusen, die das GFP unter der Kontrolle des Aktinpromotors exprimieren, wurde es möglich, transferierte KM-Zellen im Empfängerorganismus eindeutig identifizieren zu können. Mittels dieser Technik zeigten BRAZELTON und Kollegen (2000), dass hämatopoetische Zellen nach der Transplantation in bestrahlte Empfängertiere auch unter physiologischen Bedingungen im ZNS nachweisbar waren und sich dort zu Mikroglia und möglicherweise Neuronen differenzieren konnten. Wiederholungsexperimente von anderen Gruppen bestätigten die Entwicklung von Mikroglia aus Blutzellen, nicht jedoch die Differenzierung in Neurone (CASTRO et al., 2002). Die Anzahl der GFP positiven ( $\text{GFP}^+$ ) hämatogenen Mikroglia im Zerebellum belief sich 4 Monate nach der Transplantation auf bis zu 30% aller Mikroglia (PRILLER et al., 2001a). Durch diese Ergebnisse etablierte sich die Theorie, dass sich Mikroglia nicht nur während der pränatalen Phase entwickeln, sondern auch postnatal, d.h. dass sie durch hämatopoetische Zellen repopuliert werden können. Ungeklärt blieb allerdings, welche hämatopoetische Zelle die direkte Vorläuferzelle für die postnatale Mikroglia darstellt. Das vorherrschende Konzept betrachtet Monozyten als den intermediären Zelltyp, der nach der Emigration aus dem KM in die Gewebe migriert, um sich dort in residente Makrophagen zu differenzieren (VAN FURTH und COHN, 1968). Die Entdeckung unterschiedlicher Subpopulationen von Monozyten im peripheren Blut führte zu der Hypothese, dass bereits zirkulierende Monozyten durch die Expression verschiedener Migrationsrezeptoren für die Differenzierung in unterschiedliche Makrophagentypen prädispositioniert sind (GEISSMANN et al, 2003). So entwickeln sich  $\text{Ly-6C}^{\text{hi}}$  Monozyten zu Makrophagen und dendritischen Zellen, die an entzündlichen Prozessen beteiligt sind, wohingegen die  $\text{Ly-6C}^{\text{low}}$  Monozyten die Vorläuferzellen für Gewebemakrophagen darstellen.

Zur Klärung der Frage nach der mikroglialen Vorläuferzelle wurden in der vorliegenden Arbeit KM-Transplantationsexperimente durchgeführt, bei denen das Spender-KM von  $\text{CCR2}^{-/-}$  Mäusen stammte. Diese Mäuse zeichnen sich durch eine signifikant reduzierte Anzahl an  $\text{Ly-6C}^{\text{hi}}$  Monozyten im Blut aus (Abb. 1), was auf einen Defekt im Emigrationsverhalten dieser Zellen aus dem KM zurückgeführt werden kann (SERBINA und PAMER, 2006). Daher kann die  $\text{CCR2}^{-/-}$  Maus in Experimenten eingesetzt werden, bei denen der Einfluss von  $\text{Ly-6C}^{\text{hi}}$  Monozyten untersucht werden soll. Nach der Transplantation von GFP exprimierenden  $\text{CCR2}^{-/-}$  KM-Zellen in bestrahlte Wildtyp (WT)-Empfängertiere stellte sich heraus, dass in den Empfängertieren keine  $\text{GFP}^+$  hämatogenen Mikroglia beobachtet werden konnten (Abb. 3). Nur bei Anwesenheit von  $\text{Ly-6C}^{\text{hi}}$  Monozyten im Blut kam es zu einer postnatalen Mikrogliaentwicklung. Diese

Experimente belegen, dass sich nicht die residenten Monozyten zu Mikroglia entwickeln, wie von GEISSMANN und Kollegen (2003) postuliert, sondern die CCR2 exprimierenden inflammatorischen Monozyten.

### 3.1.2 Die postnatale Mikrogliaentwicklung: eine Kontroverse?

Eine Voraussetzung, die alle hier beschriebenen KM-Transplantationsexperimente gemeinsam haben, ist die vor der Transplantation angewendete Bestrahlung zur Abtötung des Empfänger-KM. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit diese Experimente die physiologischen Bedingungen im Organismus widerspiegeln. Oder anders formuliert: Ist die Bestrahlung vielleicht selbst für den beobachteten Effekt der postnatalen Mikrogliaentwicklung verantwortlich?

Ein Experiment, welches diese These unterstützt, wurde von MASSENGALE und Kollegen durchgeführt (2005). Sie verwendeten die Technik der Parabiose, bei der der Blutkreislauf von zwei Mäusen miteinander verbunden wird und so auf eine Bestrahlung verzichtet werden kann. In diesem Fall wurde das hämatopoetische System einer WT Maus (Partner 1) mit einer transgenen Maus verbunden, die GFP unter dem Aktinpromotor exprimiert (Partner 2). Nach 7 Monaten wurde das ZNS der WT Partner 1 Maus auf die Anwesenheit von GFP<sup>+</sup> hämatogenen Mikroglia untersucht. Es stellte sich heraus, dass 10-fach weniger GFP<sup>+</sup> Mikroglia in den Gehirnen parabiotischer Mäuse nachgewiesen werden konnten, als in den Bestrahlungsexperimenten.

Um den Einfluss der Präkonditionierung des ZNS durch die Bestrahlung zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Technik angewendet, bei der die Bestrahlung auf den Körper der Maus beschränkt und das Hirn dadurch vor induzierten Strahlungsschäden geschützt wurde (Abb. 4a + 4b). Dies gelang durch die Einschränkung des Bestrahlungsfeldes, sodass nur ein Teil des ZNS, das Rückenmark, bestrahlt wurde und somit als interne Kontrolle dienen konnte, wohingegen das Gehirn protektiert war.

Wie in den Ergebnissen der Abbildung 4 zu sehen ist, kam es in Mäusen, deren Gehirn vor der Bestrahlung geschützt wurde, zu keiner postnatalen Mikrogliaentwicklung, unabhängig von der Präsenz von Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten im Blut. Auch unter pathologischen Bedingungen, bei denen die BHS intakt bleibt, wie bei der Cuprizin-induzierten Demyelinisierung (MCMAHON et al., 2002) oder einer Degeneration des Nervus facialis (PRILLER et al., 2001a), kam es im Gegensatz zu den ganzkörperbestrahlten Kontrolltieren zu keiner Infiltration von Monozyten in das Gehirn

(Abb. 5 und 7). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wie auch die Ergebnisse von MASSENGALE und Kollegen (2005) mit parabiotischen Mäusen, deuten darauf hin, dass die Bestrahlung selbst eine essentielle Präkonditionierung für die postnatale Mikrogliaentwicklung darstellt und zu einer artifiziellen Mikroglia-genese führt. Daraus ergibt sich folgende Frage: Welche Faktoren sind dafür verantwortlich, dass spezifisch inflammatorische Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten in das durch die Bestrahlung präkonditionierte ZNS wandern? Zwei Möglichkeiten zur Beantwortung der Frage wären denkbar:

- i) Die Bestrahlung führt zu veränderten Milieubedingungen im Gehirn, was die spezifische Rekrutierung von Monozyten auslöst
- ii) Die Bestrahlung beeinflusst die Permeabilität der BHS

Im Folgenden sollen diese beiden Thesen diskutiert werden.

### 3.1.2.1 Einfluss der Bestrahlung auf die Homöostase im Gehirn

Abbildung 4b zeigt, dass die Bestrahlung zu einer erhöhten Chemokin- und Zytokinproduktion im ZNS führt. Diese Chemokine bewirken die gerichtete Chemotaxis von Immunzellen entlang eines bestehenden Gradienten (BAGGIOLINI, 1993). Dass die Bestrahlung eine Aktivierung von ZNS Zellen bewirkt und zu einer lokalen Zytokinproduktion führt, konnte auch von LINARD und Kollegen (2001) beobachtet werden. Der programmierte Zelltod, die Apoptose, kann durch die Bestrahlung ausgelöst werden und stellt somit eine Möglichkeit dar, warum es zu einer Sezernierung von Entzündungsmediatoren kommt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung den Zelltod von Neuronen bewirkt, jedoch keine direkte Auswirkung auf die residenten Mikroglia hat (BEN ABDALLAH et al., 2007). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse in Abbildung 4b, dass es 16 Tage nach der Hirnbestrahlung zu einer signifikanten Erhöhung des Chemokins CCL2 auf Transkriptionsebene kam, dessen Rezeptor CCR2 hauptsächlich auf Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten exprimiert wird (Abb. 1a). Somit ist es möglich, dass die Sekretion von CCL2 zu einer spezifischen Mobilisierung von CCR2<sup>+</sup> Monozyten aus dem peripheren Blut führt. Dies wurde auch in transgenen Mäusen beobachtet, die unter einem Oligodendrozyten-spezifischen Promotor das Chemokin CCL2 im ZNS ektopisch exprimierten (FUENTES et al., 1995). Im Gegensatz zu WT Tieren zeigten die transgenen Mäuse eine selektive Rekrutierung von Monozyten in den perivaskulären Raum des Gehirns. Eine direkte Infiltration der Monozyten in das Hirnparenchym und eine Differenzierung in Mikroglia konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. In einer weiteren transgenen Maus, die CCL2 unter der Kontrolle eines astroglialen Promotors produziert, konnten mononukleäre Zellinfiltrate beobachtet werden, die jedoch nicht im Hirnparenchym lokalisiert waren

---

und keine Mikroglia Morphologie zeigten (HUANG et al., 2002). Erst nach einer intraperitonealen Injektion von Pertussistoxin und einem auf Mineralöl basierenden Adjuvans (Freudsches Adjuvans) konnte eine massive Infiltration in das Parenchym des ZNS induziert werden, was zugleich zu erheblichen neurologischen Symptomen in den Mäusen führte. Doch muss berücksichtigt werden, dass Pertussistoxin zu einer erhöhten Permeabilität der BHS führt und damit die Transmigration der Monozyten ins Hirnparenchym erleichtert (KÜGLER et al., 2007). Diese Experimente beweisen zwar, dass das Chemokin CCL2 in der Lage ist, selektiv Monozyten zu rekrutieren, aber allein nicht ausreicht, um eine Infiltration der Monozyten in das Hirnparenchym und eine Differenzierung in Mikroglia zu bewirken. Die in Abbildung 5 gezeigten Ergebnisse unterstützen ebenfalls diese Hypothese. In diesen Experimenten wurde in Mäusen eine durch den Kupferchelator Cuprizin-induzierte Demyelinisierung im Corpus Callosum ausgelöst (MATSUSHIMA und MORELL, 2001), bei der die BHS intakt bleibt und keine erhöhte Permeabilität aufweist (MCMAHON et al., 2002). Cuprizin führt zur Apoptose von Oligodendrozyten, die das Myelin produzieren, welches die Nervenfortsätze umlagert und so die Reizweiterleitung ermöglicht. Durch die Apoptose dieser Zellen kommt es zu einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten. FARINA und Kollegen (2007) beschrieben, dass die Aktivierung von Astrozyten zu einer Produktion von CCL2 führt, welches wiederum für die Rekrutierung von peripheren CCR2<sup>+</sup> Immunzellen verantwortlich sein könnte. Um zu überprüfen, ob auch die Cuprizin-induzierte Demyelinisierung zu einer verstärkten Produktion von CCL2 führt, wurde aus dem entzündeten Corpus Callosum Cuprizin-behandelter Tiere RNA isoliert und die Chemokin- und Zytokintranskription untersucht. Wie in der *Supplementary* Abbildung 2 zu sehen ist, führte die Demyelinisierung zu einer starken Induktion von CCL2, CXCL10, CCL5 und TNF- $\alpha$ . Daher wäre eine Infiltration des ZNS mit peripheren Immunzellen theoretisch möglich. Mit KM-Transplantationsexperimenten konnte in der Tat bewiesen werden, dass hämatopoetische Zellen in das ZNS migrieren und im Entzündungsbereich des Corpus Callosum lokalisiert waren (MCMAHON et al., 2002). Allerdings verwendeten die Autoren ein Protokoll, bei dem die Empfängertiere einer Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt wurden, sodass auch hier ein Effekt der Bestrahlung selbst nicht ausgeschlossen werden konnte. Um diese Bestrahlungseffekte zu umgehen, wurde in dieser Arbeit während der Bestrahlung der Kopf ausgespart und so vor induzierten Schäden geschützt. Trotz hoher CCL2 Expression im Corpus Callosum während der Cuprizin-induzierten Demyelinisierung kam es in diesen Mäusen zu keiner Genese von Mikroglia aus den peripheren CCR2<sup>+</sup> Monozyten (Abb.5). Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass die alleinige Expression von chemotaktischen Proteinen im ZNS nicht ausreicht, um eine Mikrogliaentwicklung

zu bewirken. Daher müssen noch andere Faktoren beteiligt sein, die eine Migration aus dem Blut in das ZNS unterstützen.

### 3.1.2.2 Einfluss der Bestrahlung auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke

Die BHS ist die physiologische Barriere, die das ZNS vom Blutkreislauf trennt, um so die Milieubedingungen und die Homöostase des Hirns aufrechtzuerhalten. Sie zeichnet sich durch spezialisierte *tight junctions* aus, die die Endothelzellen fest miteinander verbinden und eine Infiltration von Blutzellen in das ZNS Gewebe verhindern (siehe 1.3.2). Unter pathologischen Bedingungen, wie bei der bakteriellen Meningitis, bei der es zu einer Entzündungsreaktion im Subarachnoidalraum oder im Hirn selbst kommt, muss der Organismus dennoch in der Lage sein, auf die Infektion angemessen zu reagieren. D.h. das ZNS muss kurzfristig seinen immunprivilegierten Status aufgeben, um den Immunzellen den Zutritt zum Subarachnoidalraum zu gewähren. Eine Möglichkeit, die zu einem Verlust des Immunprivilegs führt, ist die Öffnung der BHS.

Die während einer Entzündung von aktivierten Phagozyten ausgeschütteten Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$ , bewirken eine Veränderung der Lipidzusammensetzung in den *tight junctions*. LI und Kollegen (2007) konnten zeigen, dass die genannten Zytokine zu einer Verdrängung der *tight junction*-Proteine Flotillin-1 und Occludin von den Membranen der *tight junction* führen, was in einer erhöhten Permeabilität der BHS resultiert. Für das Chemokin CCL2 sind ebenfalls Effekte auf die Integrität der BHS beschrieben worden. So konnte gezeigt werden, dass CCL2 nicht nur die Expression, sondern auch die Proteinmenge der *tight junction* Proteine ZO-1 und Occludin reduziert (SONG und PACTER, 2004). Dies erleichtert die Transmigration von Makrophagen durch die Endothelzellen (DZENKO et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte für CCL2 und TNF- $\alpha$  eine signifikant erhöhte Induktion 16 Tage nach der Bestrahlung festgestellt werden (Abb. 4b). Diese erhöhte Chemokin- und Zytokinproduktion fällt in den Zeitraum, in dem die ersten GFP<sup>+</sup> hämatopoetischen Zellen im ZNS detektierbar sind (PRILLER et al., 2001b). Die permeabilitätsteigernden Eigenschaften des CCL2 und TNF- $\alpha$  könnten daher den Eintritt von Immunzellen in das ZNS ermöglichen und zu einer erleichterten Transmigration beitragen (KÜGLER et al., 2006). Diese Erklärung erscheint jedoch für die Genese von postnatalen Mikroglia vor dem Hintergrund unwahrscheinlich, da auch die Cuprizin-induzierte Demyelinisierung zu einer stark erhöhten CCL2 und TNF- $\alpha$  Expression führt (Suppl. Abb. 2) und dennoch keine GFP<sup>+</sup> Mikroglia in dem geschützten ZNS nachweisbar waren (Abb. 5a). Entsprechend müssen andere

Mechanismen als die durch Chemokine und Zytokine induzierte Erhöhung der BHS-Permeabilität für die Infiltration des ZNS durch Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten verantwortlich sein. Auch die Bestrahlung allein kann eine Veränderung der BHS auslösen. Experimente belegen, dass die Permeabilität der BHS nach der Bestrahlung abnimmt (DISERBO et al., 2002; YUAN et al., 2003). Demonstriert wurde dies mit der intravenösen Injektion von Molekülen unterschiedlicher Größe unmittelbar nach der Bestrahlung von Ratten. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Moleküle immunhistologisch im ZNS angefärbt. Allerdings war die transiente Öffnung der BHS beschränkt auf die ersten 24 Stunden nach der Bestrahlung sowie auf Moleküle, deren Molekulargewicht nicht größer war als 70 kDa (YUAN et al., 2003). Ein weiterer Effekt, der nach der Bestrahlung von Ratten beobachtet werden konnte, ist der Verlust von den *tight junction* Proteinen Occludin und ZO-1, was zu einer erhöhten Permeabilität (KAYA et al., 2004), sowie die Apoptose von Endothelzellen (LI et al., 2004) führte. Die Apoptose der Endothelzellen konnte über einen Zeitraum von einer Woche beobachtet werden. Nach 14 Tagen erreichte die Endothelzellzahl wieder das Grundniveau (LI et al., 2004). Diese Experimente belegen, dass die Bestrahlung zu zahlreichen Veränderungen im Organismus führt, die allerdings nur transient nachweisbar sind. Da die erste Lokalisation von GFP<sup>+</sup> Zellen im ZNS erst 14 Tage nach der Transplantation stattfindet (PRILLER et al., 2001b) und die Zellzahl von aus dem Blut abstammenden Mikroglia mit der Zeit stetig zunimmt, müssen längerfristige Veränderungen durch die Bestrahlung ausgelöst werden, die noch nicht beschrieben wurden. Eine Möglichkeit wäre, dass die Bestrahlung zu einer Veränderung der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen führt. Die Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen wird durch Adhäsionsmoleküle, den sogenannten Selektinen, vermittelt, die die Transmigration der Immunzellen durch das Endothel einleiten (FRENETTE und WAGNER, 1997). Eine erhöhte Expression von Selektinen führt zu einer stärkeren Bindung zwischen der Endothelzelle und dem Monozyt, sodass die Transmigration erleichtert wird (WANG et al., 2002). Eine erhöhte Expression des Selektins ICAM-1 konnte in der Tat nach der Bestrahlung nachgewiesen werden (HALLAHAN und VIRUDACHALAM, 1997). Doch auch hier war die Induktion nur transient und für eine Woche zu beobachten.

Offen bleibt, welcher Faktor genau für die Transmigration der Monozyten in das ZNS verantwortlich ist. Zur Beantwortung dieser Frage könnten *Microarray*-Analysen aus verschiedenen Gewebezellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung sowie Rekonstitutionsexperimente mit verschiedenen *knockout* Tieren als Empfänger beitragen.

### 3.2 Diskussion Publikation II

#### **“Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> GRANULOCYTES RATHER THAN Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> MONOCYTES ARE REQUIRED FOR THE CONTROL OF BACTERIAL INFECTION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM”**

Alexander Mildner, Marija Djukic, David Garbe, Andreas Wellmer, Matthias Mack, Roland Nau and Marco Prinz

Die bakterielle Meningitis stellt eine der häufigsten humanen Infektionserkrankungen dar und zeichnet sich durch eine hohe Mortalitätsrate von etwa 30% aus (SWARTZ, 2004). Die therapeutische Intervention beschränkt sich auf die Behandlung mit Antibiotika, deren Wirkung allerdings aufgrund des immunprivilegierten Status des ZNS sowie durch das Auftreten von Antibiotika-resistenten Pathogenen eingeschränkt ist (VIEIRA et al., 2007). Ziel der zweiten Studie war die Identifizierung der Zellpopulation, die maßgeblich an der Eindämmung des Bakteriums *Streptococcus pneumoniae* während der experimentellen Meningitis beteiligt ist. Die Ergebnisse der Arbeit können neue Ansatzpunkte für eine zelluläre Immuntherapie aufzeigen.

#### **3.2.1 Rolle der angeborenen Immunabwehr während der bakteriellen Meningitis**

Während der bakteriellen Meningitis tragen hauptsächlich drei Zellpopulationen zur Immunabwehr in den Meningen bei: residente Gewebemakrophagen wie Meningealmakrophagen, neutrophile Granulozyten und Monozyten. Nachfolgend soll der Einfluss dieser drei Phagozytenpopulationen auf den Krankheitsverlauf der bakteriellen Meningitis diskutiert werden.

##### 3.2.1.1 Rolle der Gewebemakrophagen

Nachdem die Bakterien das Blut verlassen und die BHS über den Mechanismus der Transzytose überquert haben, kommt es zu einer weiteren Teilung des Erregers im Subarachnoidalraum der Meningen. Die Infiltration von peripheren Leukozyten setzt mit Erreichen einer Bakterienzellzahl von  $10^5$  Pneumokokken/ml ein (TUOMANEN et al., 1985). Zu diesem Zeitpunkt können bereits in der Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit, dem Liquor, signifikant erhöhte Konzentrationen der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$

nachgewiesen werden (SAUKKONEN et al., 1990). Diese Daten sprechen dafür, dass es schon vor der Infiltration von Leukozyten zu einer Aktivierung von Immunzellen kommen muss. Allerdings ist die Zelle, die als erste durch die lebenden Bakterien oder aber bakterielle Bestandteile aktiviert wird und damit die Entzündung initiiert, bisher nicht eindeutig identifiziert worden. Versuche mit in Liposomen eingekapseltem Clodronat zur spezifischen Depletion von Meningealmakrophagen zeigten keine Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf der bakteriellen Meningitis (TROSTDORF et al., 1999). In diesem Modell wurde das Clodronat direkt in den Liquor appliziert, um Effekte auf das periphere Blut auszuschließen. Das führte zu einer Reduktion der Meningealmakrophagen von 75%. Dennoch konnten vergleichbare Mengen der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den infizierten Tieren gemessen werden, sowie eine gleiche Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten. Die Ergebnisse aus dieser Studie deuten darauf hin, dass die Meningealmakrophagen nicht die primären Zellen darstellen, die durch die Bakterien aktiviert werden.

Eine weitere Möglichkeit, wie es zu der einleitenden Entzündungsreaktion kommen könnte, ist die Aktivierung von parenchymalen Mikroglia oder Endothelzellen, die ebenfalls durch Lipopolysaccharide aktivierbar und zur Ausschüttung von Zytokinen befähigt sind (ADAM et al., 2005). Sinnvoll wären daher Experimente mit konditionalen *knockout* Mäusen, bei denen eine Gendeletion durch das Cre-loxP System zellspezifisch durchgeführt werden kann (GU et al., 1994). So könnte beispielsweise das Gen, welches IL-1 $\beta$  kodiert, zellspezifisch auf Endothelzellen ausgeschaltet werden, um dessen Einfluss auf die initiale Entzündungsreaktion zu untersuchen.

### 3.2.1.2 Rolle der neutrophilen Granulozyten

Durch die zellspezifische Depletion der Granulozyten konnte in der vorliegenden Arbeit der protektive Effekt dieser Zellpopulation während der Meningitis nachgewiesen werden (Abb. 5). Auch in anderen letalen bakteriellen Krankheitsmodellen spielen neutrophile Granulozyten für den Krankheitsverlauf eine entscheidende Rolle. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass es durch die Blockade des Chemokinrezeptors CXCR2, der hauptsächlich auf Granulozyten exprimiert wird (SPRENGER et al., 1994), zu einer erhöhten Mortalität in verschiedenen Tiermodellen der Lungenentzündung kommt (MEHRAD et al., 1999; TSAI et al., 2000; MOORE et al., 2000). TSAI und Kollegen (2000) demonstrierten, dass es in den Lungen der infizierten Mäuse nach Injektion eines CXCR2 Antikörpers zu einer Inhibierung der Granulozyteninfiltration kam, was mit einem erhöhten Bakterientiter verbunden war. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in einem Tiermodell für bakterielle Hirnabzesse



erzielt werden, bei denen CXCR2 defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Infektion aufwiesen (KIELIAN et al., 2001). Allerdings konnte bisher nur die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe nachgewiesen werden, nicht jedoch die Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen. Dieser Unterschied in der Zellquantifizierung basiert möglicherweise auf der Verwendung des Gr1 Antikörperklon RB6-8C5, der sowohl Granulozyten als auch Monozyten detektiert (FLEMING et al., 1993). Der Gr1 Antikörper ist gegen das *myeloid differentiation antigen* gerichtet, welches sich aus den beiden differentiell exprimierten Epitopen Ly-6C und Ly-6G zusammensetzt. Ly-6C wird von vielen Leukozyten exprimiert, wohingegen neutrophile Granulozyten zusätzlich den Oberflächenmarker Ly-6G aufweisen (Abb. 1). KIELIAN und Kollegen (2001) verwendeten beispielsweise den Gr1 Antikörper für die Detektion der Granulozyten, sodass keine Aussage über die ebenfalls Gr1 positiven, infiltrierten Monozyten gemacht werden kann.

Welche Effektormechanismen der neutrophilen Granulozyten letztendlich zu der Bakterieneindämmung entscheidend beitragen und was sie dadurch von Makrophagen unterscheidet, muss durch weitere Experimente geklärt werden. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre das Enzym Myeloperoxidase, das hauptsächlich in Granulozyten und nicht in Monozyten vorkommt (ARATANI et al., 2006). Dieses Enzym ist an der Synthese von reaktiven Sauerstoffderivaten beteiligt und katalysiert in Anwesenheit von  $H_2O_2$  die Produktion von antimikrobiellen Hydrogenchloridronat (KLEBANOFF, 2005). Auch der Einsatz von Mäusen, die eine zellspezifische Deletion der NADPH Oxidase auf Phagozyten aufweisen, könnte den protektiven Mechanismus der Granulozyten klären. Die NADPH Oxidase überträgt ein von der Oxidation des NADPH freigesetztes Elektron auf Sauerstoff, was zur Entstehung von reaktivem Hyperoxid ( $O_2^-$ ) führt (JEREMY et al., 2007). SHILON und Kollegen (1999) konnten bereits belegen, dass für die NADPH Oxidase defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Bakterien aufwiesen.

### 3.2.1.3 Rolle der Monozyten

Nach der Sekretion von chemotaktischen Proteinen kommt es zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in den Subarachnoidalraum (FAUSTMANN et al., 1995). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden (Abb. 1b). Beide Zellpopulationen kamen in vergleichbaren Zellzahlen vor, was im Einklang mit histologischen Quantifizierungsmethoden der infiltrierten Meningen steht (DIAB et al., 1999). Allerdings konnten Studien im Liquor von infizierten Mäusen nur bis zu 20% Monozyten nachweisen (CAUWELS et al., 1999; ECHCHANNAOUI et al., 2005). In

Liquoruntersuchungen werden aber nur in der Gewebsflüssigkeit schwimmende Zellen detektiert, wohingegen mit den Meningen assoziierte Zellen vernachlässigt werden. Die Bindung des Bakteriums an den Phagozyten führt zur Phagozytose des Erregers sowie zur Aktivierung der Effektorfunktionen (OZINSKY et al., 2000). Zur Beantwortung der Frage, welche Zellen für die Eindämmung der Entzündung wichtig sind, führten ZYSK und Kollegen (1997) erste Experimente an Kaninchen durch, die vor der Infektion mit *S. pneumoniae* eine systemische Injektion von Clodronat erhielten. In Liposomen eingekapseltes Clodronat führt zu einer Apoptose von phagozytierenden Makrophagen, was durch immunhistologische Untersuchungen gezeigt werden konnte (VAN ROOIJEN und CLAASSEN, 1988). Die Depletion von peripheren Monozyten und Makrophagen während der pneumokokkalen Meningitis führte zu einer kompletten Inhibition der meningealen Infiltration, sowie zu einer Reduktion der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (ZYSK et al., 1997). Diese Daten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, bei der die Depletion von Monozyten zu keinem veränderten Krankheitsverlauf führte (Abb. 4). Da in Liposomen eingekapseltes Clodronat allerdings erst phagozytiert werden muss, um seine apoptotische Wirkung zu entfalten, ist ein Effekt des Clodronats auf alle Phagozyten, einschließlich Granulozyten, nicht ausgeschlossen. In der Tat belegen frühere Studien, dass neben der Depletion von zirkulierenden Phagozyten auch Kupffer-Zellen in der Leber (VAN ROOIJEN und CLAASSEN, 1988), Milzmakrophagen (VAN ROOIJEN und CLAASSEN, 1988) sowie myeloische Vorläuferzellen im KM (TACKE et al., 2003) depletiert werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich eine unspezifische Clodronatdepletion auf die Milieubedingungen im Blut sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen signifikant auswirkt. Dass gerade die für die bakterielle Meningitis entscheidenden Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach der Clodronatdepletion reduziert werden, konnte von D'SOUZA und Kollegen (1999) nachgewiesen werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass allein die Unterdrückung der Immunabwehr durch die Clodronatbehandlung einen Effekt auf den Krankheitsverlauf haben könnte. Unter Berücksichtigung dieser „Nebeneffekte“ erscheint die Verwendung von genetischen sowie Antikörper-medierten Zelldepletionen deutlich spezifischer zu sein. In dieser Arbeit konnte erstmals die Infiltration von Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten in die Meningen gezeigt werden. Daher wurde die Depletion im Gegensatz zur Verwendung von Clodronat auf diese Population beschränkt. Durch den CCR2 Antikörper konnten ausschließlich die Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten im peripheren Blut depletiert werden (Abb. 4), da residente Makrophagen wie auch Granulozyten keine Expression des Chemokinrezeptors aufweisen (MACK et al., 2001). Die Antikörperinjektion in der hier verwendeten Konzentration (10 $\mu$ g) führte zu keiner veränderten Zytokinproduktion im peripheren

Blut (nicht gezeigt; BRÜHL et al., 2007), sodass die Milieubedingungen während des Krankheitsverlaufes nicht beeinflusst wurden. Ebenfalls werden durch die Verwendung der CCR2<sup>-/-</sup> Maus, die eine starke Reduktion der Ly-6C<sup>hi</sup> Monozyten aufweist, als genetisches Zelldepletionsexperiment systemische Effekte auf das Immunsystem durch die Behandlung vermieden.

### 3.2.2 Die putative Funktion der Monozyten/Makrophagen

Neben der Infiltration von Granulozyten in die Meningen von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Tieren kam es zu einer Migration von inflammatorischen Monozyten in das entzündete Gewebe (Abb. 1). Mit genetischen sowie immunologischen Depletionsexperimenten konnte demonstriert werden, dass diese Zellpopulation keinen Einfluss auf die letale Infektionserkrankung ausübt und daher für die einleitende Entzündungsreaktion entbehrlich ist (Abb. 3 und Abb. 4). Es stellt sich daher die Frage, welche möglichen Funktionen die Zellen während der Entzündung spielen.

Neben ihren inflammatorischen Eigenschaften besitzen Monozyten auch regulatorische Funktionen, die während der bakteriellen Meningitis eine Rolle spielen könnten. Granulozyten sind ausgestattet mit einer Vielzahl von Effektormechanismen, die toxisch und unspezifisch auf Pathogene wirken (GUDMUNDSSON und AGERBERTH, 1999). Der Ausstoß von Sauerstoffderivaten oder Proteasen hat jedoch nicht nur einen Einfluss auf die Erreger, sondern wirkt sich auch toxisch auf das umliegende Gewebe aus (HENSON und JOHNSTON, 1987). Oxidantien führen zu einer Degeneration von Lipiden und tragen dadurch zur Zerstörung von Zellmembranen bei (TAPPEL und DILLARD, 1981). Zusätzlich kann eine von aktivierten Granulozyten ausgehende karzinogene Wirkung auf Fibroblasten nachgewiesen werden, was auf die Mutagenität der oxidativen Moleküle auf die DNA schließen lässt (WEITZMAN et al., 1985). Dass die reaktiven Sauerstoffderivate eine direkte Rolle bei der neuronalen Schädigung während der bakteriellen Meningitis spielen, konnte durch die Verabreichung von Antioxidantien in experimentellen Tierversuchen gezeigt werden. Diese führten zu einem reduzierten Zelltod von hippokampalen und kortikalen Neuronen und damit zu einer Reduktion der klinischen Symptome in den behandelten Tieren (LEIB et al., 1996). Diese Beispiele verdeutlichen, wie entscheidend einerseits die Einleitung der Immunabwehr zur Eindämmung des Erregers ist, andererseits aber auch, wie die Entzündungsreaktion selbst zu den Langzeitfolgen der Infektion führen kann. Daher ist eine Ausbalancierung zwischen Immunabwehr und Entzündungshemmung von

zentraler Bedeutung. Granulozyten zeichnen sich durch eine kurze Lebenszeit aus, die mit einer hohen Apoptose-Rate verbunden ist (YAMASHIRO et al., 2001). Durch die Apoptose kommt es zu einer zusätzlichen Freisetzung toxischer Moleküle in das entzündete Gewebe, was sich additiv auf die Gewebsschädigung auswirkt. Daher ist die Beseitigung von apoptotischen Granulozyten durch Phagozytose für die Wundheilung ein essentieller Faktor. Von NEWMAN und Kollegen (1982) bestätigten, dass Makrophagen an diesem Prozess beteiligt sind und Granulozyten phagozytieren. Interessanterweise war dieser Prozess auf ausgereifte Makrophagen beschränkt, wohingegen unreifen Monozyten aus dem peripheren Blut keine phagozytotische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Phagozytose führt zu einer Sezernierung von anti-inflammatorischen Mediatoren (FADOK et al., 1998) und zu einer transkriptionellen Inhibition von pro-inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen (MCDONALD et al., 1999). Damit wirkt sich die Phagozytose von apoptotischen Zellen positiv auf die Inhibition der Entzündung aus. Außerdem konnte eine von den Makrophagen durch direkten Zellkontakt induzierte Apoptose von Granulozyten nachgewiesen werden (MESZAROS et al., 2000).

Diese Daten sprechen dafür, dass Makrophagen eine immunmodulatorische Funktion während der bakteriellen Meningitis ausüben und an der Auflösung des entzündlichen Prozesses beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde ein letales Tiermodell der experimentellen Meningitis eingesetzt, aufgrund dessen eine Regenerationsreaktion nicht beobachtet werden konnte. Um die spezifische Rolle der infiltrierten Monozyten zu klären, müssten schwächer dosierte Infektionen durchgeführt werden, bei denen es zwar zu einer Entwicklung von klinischen Symptomen kommt, aber eine vollständige Genesung gewährleistet ist. Auch die Behandlung der Tiere mit Antibiotika während der Infektion wäre möglich, um das Überleben der Mäuse zu sichern und den Einfluss der Monozyten auf die durch Gewebsschäden verursachten Langzeitfolgen zu untersuchen.

### **3.2.3 Mögliche Auswirkungen auf neue Behandlungsmethoden**

Eine Behandlung der bakteriellen Meningitis wurde erst nach der Entdeckung des Penizillins durch ALEXANDER FLEMING (1929) möglich. Die therapeutische Gabe des Antibiotikums führte zu einer Reduzierung der Mortalität der pneumokokkalen Meningitis (SWARTZ, 2004). Dennoch blieb die Behandlung mit dem Antibiotikum unter den Erwartungen, was auf eine schlechte Absorption des Penizillins in den Liquor zurückgeführt werden konnte (RAMMELKAMP und KEEFER, 1943). Penizillin war

beispielsweise nach einer intravenösen Injektion von 20.000 Units in gesunde Probanden sowie an Meningitis erkrankten Patienten im Liquor kaum nachweisbar. Erst mit dem Einsatz hoher Dosen Penizillins (bis zu 1.000.000 Units) gelang es DOWLING und Kollegen (1949) die Mortalität auf 30% zu senken. Diese Mortalitätsrate ist bis heute konstant geblieben und konnte nicht weiter reduziert werden (SWARTZ, 2004).

Erschwerend kommt hinzu, dass vermehrt Penizillin-resistente Stämme auftreten (VIEIRA et al., 2007). Aufgrund der symptomfreien Vermehrung des Erregers im Blut kann die bakterielle Meningitis erst im klinischen Stadium diagnostiziert werden, d.h. nach Infiltration des Subarachnoidalraumes. Da die Infektion in dem durch die BHS abgeschirmten ZNS stattfindet, ist eine schnelle Wirkung des Penizillins im Zielorgan nicht sichergestellt. Aus diesem Grund kommt es nach wie vor zu Todesfällen innerhalb weniger Stunden nach der Diagnose (GARDNER, 2006).

Diese Umstände belegen die Notwendigkeit einer schnellen und effizienten Behandlung gerade zu Beginn der Infektion. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich Granulozyten die anfängliche Immunabwehr während der bakteriellen Meningitis einleiten und entscheidend zur Eindämmung des Erregers beitragen (Abb. 5). Eine denkbare zelluläre Immuntherapie wäre daher die Erhöhung der Granulozyten-Zellzahl im peripheren Blut. Der *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) ist ein von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziertes, hämatopoetisches Zytokin, welches multiple Funktionen spezifisch auf Granulozyten ausübt (DEMETRI und GRIFFIN, 1991). Die Interaktion des G-CSF mit seinem Rezeptor reguliert die Granulozytenproliferation und Differenzierung sowie den funktionellen Aktivierungsstatus der Zelle (ZSEBO et al., 1986). G-CSF führt bei subkutaner Injektion in gesunde Probanden zu einer 10fachen Erhöhung der Granulozyten-Zellzahl (BENSINGER et al., 1993). Aufgrund der geringen Nebenwirkungen wird die G-CSF Behandlung vor allem bei Transplantationsexperimenten angewendet (ZHANG et al., 2007). Ob eine G-CSF-Therapie auch bei der bakteriellen Meningitis wirkt, müssen weitere Tierexperimente zeigen, bei denen mit der Therapie nach Einsetzen der ersten klinischen Symptome begonnen wird.

## 4. ZUSAMMENFASSUNG

Das Zentralnervensystem (ZNS) unterscheidet sich von anderen Organen des Körpers durch seinen immunprivilegierten Status. Um die spezifischen neuronalen Milieubedingungen des ZNS aufrechtzuerhalten, ist es durch die Blut-Hirn-Schranke vom Blutkreislauf getrennt. Dennoch muss es in der Lage sein, auf Pathogene, die in das ZNS eindringen, angemessen reagieren zu können und eine Immunantwort einzuleiten. Die spezialisierten Gewebemakrophagen des ZNS, die Mikroglia, sind bei der Erkennung von Pathogenen und Gewebsschädigungen involviert. Mikroglia wandern während der embryonalen Entwicklung in das ZNS ein. Durch Knochenmarkstransplantationen konnte neben der pränatalen auch eine postnatale Entwicklung der Mikroglia nachgewiesen werden. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Vorläuferzelle identifiziert werden, aus denen sich die postnatale Mikroglia differenziert. Weiterhin sollte die Bedingungen definiert werden, die eine postnatale Entwicklung ermöglicht.

Mit Knochenmarkstransplantations- und adoptiven Zelltransferexperimenten konnte gezeigt werden, dass entgegen der bisher angenommenen Theorien die CCR2<sup>+</sup> inflammatorischen Monozyten in das adulte, bestrahlte ZNS migrieren und somit die direkte Vorläuferzelle der postnatalen Mikroglia darstellen. Dieser Prozess war aber strikt abhängig von der Bestrahlung des ZNS: Wurde das Gehirn vor der Bestrahlung ausgeschlossen, konnte keine Mikrogliaentwicklung aus hämatopoetischen Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse belegen erstmals, dass die Bestrahlung eine artifizielle Mikroglia-genese hervorruft. Weder unter physiologischen noch unter pathologischen Konditionen, bei denen die Blut-Hirn-Schranke nicht geschädigt wird, kommt es zu einer postnatalen Mikrogliaentwicklung. Die Ergebnisse unterstreichen die funktionelle Bedeutung der Mikroglia in ZNS-Pathologien und zeigen außerdem, dass Experimente, in denen KM-Transplantationen eingesetzt werden, durch die Ganzkörperbestrahlung zu artifiziellen Ergebnissen führen können.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Phagozytenpopulation identifiziert werden, die entscheidend an der Eindämmung des Erregers der bakteriellen Meningitis beteiligt ist. Die bakterielle Meningitis ist mit einer Mortalitätsrate von 30% und einer Prävalenz von 1,5:100.000 eine der zehn häufigsten Infektionserkrankungen weltweit. Die medizinische Intervention beschränkt sich auf die Behandlung mit Antibiotika, deren Wirkung allerdings aufgrund des immunprivilegierten Status des ZNS sowie durch das Auftreten von Antibiotika-resistenten Pathogenen eingeschränkt ist. Daher könnte eine zelluläre Immuntherapie eine neue Behandlungsstrategie darstellen.

Nach der Infektion von Mäusen mit *S. pneumoniae* konnte in den Meningen die Infiltration von inflammatorischen Monozyten sowie Granulozyten nachgewiesen werden. Um die myeloische Zellpopulation zu identifizieren, die an der Eindämmung des Bakteriums *S. pneumoniae* während der bakteriellen Meningitis beteiligt ist, wurden spezifische Zelldepletionsexperimente in den infizierten Mäusen durchgeführt. Die Depletion der zirkulierenden Monozyten hatte dabei keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf, wohingegen die Verminderung der Granulozyten in einer erhöhten Mortalitätsrate und schwereren klinischen Symptomen resultierte. Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass nur eine Phagozytenpopulation, die Granulozyten, einen protektiven Effekt auf den Verlauf der bakteriellen Meningitis ausüben und dass eine Manipulation dieser Zellpopulation eine neue Behandlungsmöglichkeit darstellt.

---

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Adam R., Russing D., Adams O., Ailyati A., Sik K.K., Schroten H., and Daubener W. (2005) Role of human brain microvascular endothelial cells during central nervous system infection. Significance of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immunoregulation. *Thromb. Haemost.* 94, 341-346.
- Aderem A. and Underhill D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol* 17, 593-623.
- Alliot F., Godin I., and Pessac B. (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 117, 145-152.
- Andersson P.B., Perry V.H., and Gordon S. (1992) Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. *J. Exp. Med.* 176, 255-259.
- Anthony R.M., Rutitzky L.I., Urban J.F. jr., Stadecker M.F., Grause W.C. (2007) Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (12), 975-987.
- Aratani Y., Kura F., Watanabe H., Akagawa H., Takano Y., Ishida-Okawara A., Suzuki K., Maeda N., and Koyama H. (2006) Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defence against *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Microbiol.* 55, 1291-1299.
- Asahina A., Tamaki K. (2006) Role of Langerhans cells in cutaneous protective immunity: is the reappraisal necessary? *J. Dermatol. Sci.* 44(1), 1-9.
- Baba Y., Pelayo R., Kincade P.W. (2004) Relationships between hematopoietic cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol.* 25(12), 645-649.
- Baggiolini M. (1993) Chemotactic and inflammatory cytokines--CXC and CC proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 351, 1-11.
- Banchereau J., Paczesny S., Blanco P., Bennett L., Pascual V., Fay J., and Palucka A.K. (2003) Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987, 180-187.
- Banchereau J., Steinman R.M.. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392, 245-252.
- Ben Abdallah N.M., Slomianka L., and Lipp H.P. (2007) Reversible effect of X-irradiation on proliferation, neurogenesis, and cell death in the dentate gyrus of adult mice. *Hippocampus* 17, 1230-1240.
- Bensinger W.I., Price T.H., Dale D.C., Appelbaum F.R., Clift R., Lilleby K., Williams B., Storb R., Thomas E.D., and Buckner C.D. (1993) The effects of daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on normal granulocyte donors undergoing leukapheresis. *Blood* 81, 1883-1888.
- Beutler B. and Cerami A. (1987) Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 316, 379-385.



- Billingham R.E. and Boswell T. (1953) Studies on the problem of corneal homografts. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 141, 392-406.
- Blease K., Mehrad B., Standiford T.J., Lukacs N.W., Gosling J., Boring L., Charo I.F., Kunkel S.L., and Hogaboam C.M. (2000) Enhanced pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR2<sup>-/-</sup> mice. *J. Immunol* 165, 2603-2611.
- Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., and Blau H.M. (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-1779.
- Bruhl H., Cihak J., Plachy J., Kunz-Schughart L., Niedermeier M., Denzel A., Rodriguez G.M., Talke Y., Luckow B., Stangassinger M., and Mack M. (2007) Targeting of Gr-1<sup>+</sup>, CCR2<sup>+</sup> monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 2975-2985.
- Cassatella M.A. (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol* 73, 369-509.
- Castro R.F., Jackson K.A., Goodell M.A., Robertson C.S., Liu H., and Shine H.D. (2002) Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 297, 1299.
- Cauwels A., Frei K., Sansano S., Fearn C., Ulevitch R., Zimmerli W., and Landmann R. (1999) The origin and function of soluble CD14 in experimental bacterial meningitis. *J. Immunol* 162, 4762-4772.
- Chan W.Y., Kohsaka S., and Rezaie P. (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res. Rev.* 53, 344-354.
- Cuadros M.A. and Navascues J. (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog. Neurobiol.* 56, 173-189.
- D'Souza M.J., Oettinger C.W., Shah A., Tipping P.G., Huang X.R., and Milton G.V. (1999) Macrophage depletion by albumin microencapsulated clodronate: attenuation of cytokine release in macrophage-dependent glomerulonephritis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25, 591-596.
- Demetri G.D. and Griffin J.D. (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78, 2791-2808.
- Diab A., Abdalla H., Li H.L., Shi F.D., Zhu J., Hojberg B., Lindquist L., Wretling B., Bakhiet M., and Link H. (1999) Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1alpha attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. *Infect. Immun.* 67, 2590-2601.
- Diserbo M., Agin A., Lamproglou I., Mauris J., Staali F., Multon E., and Amourette C. (2002) Blood-brain barrier permeability after gamma whole-body irradiation: an in vivo microdialysis study. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 80, 670-678.
- Dobrogowska D.H. and Vorbrodt A.W. (2004) Immunogold localization of tight junctional proteins in normal and osmotically-affected rat blood-brain barrier. *J. Mol. Histol.* 35, 529-539.

- Dowling H.F., Sweet L.K., Robinson J.A., Zellers W.W., Hirsch H.L. (1949) The treatment of pneumococcal meningitis with massive doses of systemic penicillin. *Am. J. Med. Sci.* 217, 149-56.
- Dzenko K.A., Song L., Ge S., Kuziel W.A., and Pachter J.S. (2005) CCR2 expression by brain microvascular endothelial cells is critical for macrophage transendothelial migration in response to CCL2. *Microvasc. Res.* 70, 53-64.
- Echchannaoui H., Frei K., Letiembre M., Strieter R.M., Adachi Y., and Landmann R. (2005) CD14 deficiency leads to increased MIP-2 production, CXCR2 expression, neutrophil transmigration, and early death in pneumococcal infection. *J. Leukoc. Biol.* 78, 705-715.
- Ehrlich P. (1885) Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Verlag von August Hirschwald, Berlin.
- Fadok V.A., Bratton D.L., Konowal A., Freed P.W., Westcott J.Y., and Henson P.M. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest* 101, 890-898.
- Farina C., Aloisi F., and Meinel E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28, 138-145.
- Fauci A.S. (2001) Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* 32, 675-685.
- Faustmann P.M., Krause D., Dux R., and Dermietzel R. (1995) Morphological study in the early stages of complement C5a fragment-induced experimental meningitis: activation of macrophages and astrocytes. *Acta Neuropathol.* 89, 239-247.
- Fleming A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *Br J Exp Pathol* 10 (31): 226-36.
- Fleming T.J., Fleming M.L., and Malek T.R. (1993) Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol* 151, 2399-2408.
- Frenette P.S. and Wagner D.D. (1997) Insights into selectin function from knockout mice. *Thromb. Haemost.* 78, 60-64.
- Fuentes M.E., Durham S.K., Swerdel M.R., Lewin A.C., Barton D.S., Megill J.R., Bravo R., and Lira S.A. (1995) Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J. Immunol* 155, 5769-5776.
- Gardner P. (2006) Clinical practice. Prevention of meningococcal disease. *N. Engl. J. Med.* 355, 1466-1473.
- Geissmann F., Jung S., and Littman D.R. (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19, 71-82.

- 
- Ginhoux F., Tacke F., Angeli V., Bogunovic M., Loubeau M., Dai X., Stanley E.R., Randolph G.J., Merad M. (2006) Langerhans cells arise from monocytes *in vivo*. *Nat. Immunol.* 7(3):265-73.
- Gleich G.J., Loefering D.A. (1984) Immunobiology of eosinophils. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 429-459.
- Goldstein I.M., Roos D., Kaplan H.B., and Weissmann G. (1975) Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. *J. Clin. Invest* 56, 1155-1163.
- Grimwood K., Anderson P., Anderson V., Tan L., and Nolan T. (2000) Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch. Dis. Child* 83, 111-116.
- Gu H., Marth J.D., Orban P.C., Mossmann H., and Rajewsky K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
- Gudmundsson G.H. and Agerberth B. (1999) Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J. Immunol Methods* 232, 45-54.
- Hallahan D.E. and Virudachalam S. (1997) Ionizing radiation mediates expression of cell adhesion molecules in distinct histological patterns within the lung. *Cancer Res.* 57, 2096-2099.
- Hanisch U.K. and Kettenmann H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 10, 1387-1394.
- Hayashi Y., Nomura M., Yamagishi S., Harada S., Yamashita J., and Yamamoto H. (1997) Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19, 13-26.
- Henson P.M. and Johnston R.B., Jr. (1987) Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J. Clin. Invest* 79, 669-674.
- Hickey W.F. and Kimura H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science* 239, 290-292.
- Hirase T., Staddon J.M., Saitou M., Ando-Akatsuka Y., Itoh M., Furuse M., Fujimoto K., Tsukita S., and Rubin L.L. (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 110 ( Pt 14), 1603-1613.
- Hoffman J.A., Wass C., Stins M.F., and Kim K.S. (1999) The capsule supports survival but not traversal of *Escherichia coli* K1 across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* 67, 3566-3570.
- Huang D., Tani M., Wang J., Han Y., He T.T., Weaver J., Charo I.F., Tuohy V.K., Rollins B.J., and Ransohoff R.M. (2002) Pertussis toxin-induced reversible encephalopathy dependent on monocyte chemoattractant protein-1 overexpression in mice. *J. Neurosci.* 22, 10633-10642.
- Hwang P.M., Zhou N., Shan X., Arrowsmith C.H., and Vogel H.J. (1998) Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry* 37, 4288-4298.

- Jeremy J.Y., Jones R.A., Koupparis A.J., Hotston M., Persad R., Angelini G.D., and Shukla N. (2007) Reactive oxygen species and erectile dysfunction: possible role of NADPH oxidase. *Int. J. Impot. Res.* 19, 265-280.
- Kapetanovic R. and Cavaillon J.M. (2007) Early events in innate immunity in the recognition of microbial pathogens. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 7, 907-918.
- Kaur C., Hao A.J., Wu C.H., and Ling E.A. (2001) Origin of microglia. *Microsc. Res. Tech.* 54, 2-9.
- Kaya M., Palanduz A., Kalayci R., Kemikler G., Simsek G., Bilgic B., Ahishali B., Arican N., Kocyildiz Z.C., Elmas I., Kucuk M., and Karadeniz A. (2004) Effects of lipopolysaccharide on the radiation-induced changes in the blood-brain barrier and the astrocytes. *Brain Res.* 1019, 105-112.
- Kielian T., Barry B., and Hickey W.F. (2001) CXC chemokine receptor-2 ligands are required for neutrophil-mediated host defense in experimental brain abscesses. *J. Immunol* 166, 4634-4643.
- Kim K.S. (2003) Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev. Neurosci.* 4, 376-385.
- Kim K.S., Wass C.A., and Cross A.S. (1997) Blood-brain barrier permeability during the development of experimental bacterial meningitis in the rat. *Exp. Neurol.* 145, 253-257.
- Klebanoff S.J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598-625.
- Kugler S., Bocker K., Heusipp G., Greune L., Kim K.S., and Schmidt M.A. (2007) Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. *Cell Microbiol.* 9, 619-632.
- Kurihara T., Warr G., Loy J., and Bravo R. (1997) Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* 186, 1757-1762.
- Kuziel W.A., Morgan S.J., Dawson T.C., Griffin S., Smithies O., Ley K., and Maeda N. (1997) Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12053-12058.
- Landsman L. and Jung S. (2007) Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol* 179, 3488-3494.
- Leib S.L., Kim Y.S., Chow L.L., Sheldon R.A., and Tauber M.G. (1996) Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J. Clin. Invest* 98, 2632-2639.
- Li Q., Zhang Q., Wang M., Zhao S., Ma J., Luo N., Li N., Li Y., Xu G., and Li J. (2007) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clin. Immunol.*

- 
- Li Y.Q., Chen P., Jain V., Reilly R.M., and Wong C.S. (2004) Early radiation-induced endothelial cell loss and blood-spinal cord barrier breakdown in the rat spinal cord. *Radiat. Res.* 161, 143-152.
- Linard C., Marquette C., Mathieu J., Pennequin A., Clarencon D., and Mathe D. (2004) Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58, 427-434.
- Lucas A.D., Chadwick N., Warren B.F., Jewell D.P., Gordon S., Powrie F., and Greaves D.R. (2001) The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *Am. J. Pathol.* 158, 855-866.
- Mack M., Cihak J., Simonis C., Luckow B., Proudfoot A.E., Plachy J., Bruhl H., Frink M., Anders H.J., Vielhauer V., Pfirstinger J., Stangassinger M., and Schlondorff D. (2001) Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J. Immunol* 166, 4697-4704.
- Massengale M., Wagers A.J., Vogel H., and Weissman I.L. (2005) Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J. Exp. Med.* 201, 1579-1589.
- Matsushima G.K. and Morell P. (2001) The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol.* 11, 107-116.
- Maus U., von Grote K., Kuziel W.A., Mack M., Miller E.J., Cihak J., Stangassinger M., Maus R., Schlondorff D., Seeger W., and Lohmeyer J. (2002) The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 166, 268-273.
- McDonald P.P., Fadok V.A., Bratton D., and Henson P.M. (1999) Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J. Immunol* 163, 6164-6172.
- McMahon E.J., Suzuki K., and Matsushima G.K. (2002) Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 130, 32-45.
- Mehrad B., Strieter R.M., Moore T.A., Tsai W.C., Lira S.A., and Standiford T.J. (1999) CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. *J. Immunol* 163, 6086-6094.
- Meszaros A.J., Reichner J.S., and Albina J.E. (2000) Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J. Immunol* 165, 435-441.
- Moore T.A., Newstead M.W., Strieter R.M., Mehrad B., Beaman B.L., and Standiford T.J. (2000) Bacterial clearance and survival are dependent on CXC chemokine receptor-2 ligands in a murine model of pulmonary *Nocardia asteroides* infection. *J. Immunol* 164, 908-915.
- Nathan C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev. Immunol* 6, 173-182.

- Newman S.L., Henson J.E., and Henson P.M. (1982) Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J. Exp. Med.* 156, 430-442.
- Nimmerjahn A., Kirchhoff F., and Helmchen F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
- O'Keefe M., Hochrein H., Vremec D., Caminschi I., Miller J.L., Anders E.M., Wu L., Lahoud M.H., Henri S., Scott B., Hertzog P., Tatarczuch L., Shortman K. (2002) Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* 196(10), 1307-1319.
- Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., and Aderem A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13766-13771.
- Parker L.C., Whyte M.K., Dower S.K., and Sabroe I. (2005) The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J. Leukoc. Biol.* 77, 886-892.
- Peters W., Scott H.M., Chambers H.F., Flynn J.L., Charo I.F., and Ernst J.D. (2001) Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 7958-7963.
- Polfliet M.M., Zwijnenburg P.J., van Furth A.M., van der P.T., Dopp E.A., Renardel d.L., Kesteren-Hendriks E.M., van Rooijen N., Dijkstra C.D., and van den Berg T.K. (2001) Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J. Immunol* 167, 4644-4650.
- Priller J., Flugel A., Wehner T., Boentert M., Haas C.A., Prinz M., Fernandez-Klett F., Prass K., Bechmann I., de Boer B.A., Frotscher M., Kreutzberg G.W., Persons D.A., and Dirnagl U. (2001a) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med.* 7, 1356-1361.
- Priller J., Persons D.A., Klett F.F., Kempermann G., Kreutzberg G.W., and Dirnagl U. (2001b) Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 155, 733-738.
- Rammelkamp C.H. and Keefer C.S. (1943) The absorption, excretion, and distribution of penicillin. *J. Clin. Invest* 22, 425-437.
- Rezaie P., Dean A., Male D., and Ulfing N. (2005) Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cereb. Cortex* 15, 938-949.
- Rezaie P. and Male D. (2002) Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J. Hist Neurosci.* 11, 325-374.
- Rudrabhatla R.S., Selvaraj S.K., and Prasadarao N.V. (2006) Role of Rac1 in *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Microbes. Infect.* 8, 460-469.

- Sansonetti P.J. (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev. Immunol* 4, 953-964.
- Sato N., Ahuja S.K., Quinones M., KostECKI V., Reddick R.L., Melby P.C., Kuziel W.A., and Ahuja S.S. (2000) CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania* major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J. Exp. Med.* 192, 205-218.
- Saukkonen K., Sande S., Cioffe C., Wolpe S., Sherry B., Cerami A., and Tuomanen E. (1990) The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J. Exp. Med.* 171, 439-448.
- Savina A. and Amigorena S. (2007) Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev.* 219, 143-156.
- Serbina N.V. and Pamer E.G. (2006) Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7, 311-317.
- Serbina N.V., Salazar-Mathar T.P., Biron C.A., Kuziel W.A., Pamer E.G. (2003) TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19(1), 59-70.
- Siegal F.P., Kadowaki N., Shodell M., Fitzgerald-Bocarsly P.A., Shah K., Ho S., Antonenko S., Liu Y.J. (1999) The nature of the principal type I interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Shiloh M.U., MacMicking J.D., Nicholson S., Brause J.E., Potter S., Marino M., Fang F., Dinauer M., and Nathan C. (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity.* 10, 29-38.
- Shirai Y. (1921) On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals. *Jap. Med. World* 1, 14-15.
- Song L. and Pachter J.S. (2004) Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* 67, 78-89.
- Sprenger H., Lloyd A.R., Lautens L.L., Bonner T.I., and Kelvin D.J. (1994) Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene. *J. Biol. Chem.* 269, 11065-11072.
- Streit W.J. (2001) Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology* 22, 619-624.
- Swartz M.N. (2004) Bacterial meningitis--a view of the past 90 years. *N. Engl. J. Med.* 351, 1826-1828.
- Tacke F., Ginhoux F., Jakubzick C., van Rooijen N., Merad M., and Randolph G.J. (2006) Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J. Exp. Med.* 203, 583-597.

- Tappel A.L. and Dillard C.J. (1981) In vivo lipid peroxidation: measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *Fed. Proc.* 40, 174-178.
- Trostdorf F., Bruck W., Schmitz-Salue M., Stuert K., Hopkins S.J., van Rooijen N., Huitinga I., and Nau R. (1999) Reduction of meningeal macrophages does not decrease migration of granulocytes into the CSF and brain parenchyma in experimental pneumococcal meningitis. *J. Neuroimmunol.* 99, 205-210.
- Tsai W.C., Strieter R.M., Mehrad B., Newstead M.W., Zeng X., and Standiford T.J. (2000) CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* 68, 4289-4296.
- Tuomanen E., Liu H., Hengstler B., Zak O., and Tomasz A. (1985) The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J. Infect. Dis.* 151, 859-868.
- Ulevitch R.J. (1999) Toll gates for pathogen selection. *Nature* 401, 755-756.
- van Furth R. and Cohn Z.A. (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128, 415-435.
- Van Rooijen N., Claassen E. (1988) In vivo elimination of macrophages in spleen and liver, using liposome encapsulated drugs: Methods and applications. In: *Liposomes as drug carriers: Trends and progress.* Ed. G. Gregoriadis. John Wiley and Sons, Chichester, U.K. 131-143.
- Vieira A.C., Gomes M.C., Rolo F.M., Eudes F.J., Bello E.J., and de Figueiredo R.B. (2007) *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. *J. Pediatr. (Rio J.)* 83, 71-78.
- Visser J.W., Bauman J.G., Mulder A.H., Eliason J.F., and de Leeuw A.M. (1984) Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 159, 1576-1590.
- Wang G., Woo C.W., Sung F.L., Siow Y.L., and O K (2002) Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1777-1783.
- Weitzman S.A., Weitberg A.B., Clark E.P., and Stossel T.P. (1985) Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 227, 1231-1233.
- Yamashiro S., Kamohara H., Wang J.M., Yang D., Gong W.H., and Yoshimura T. (2001) Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J. Leukoc. Biol.* 69, 698-704.
- Yoshimura T. and Leonard E.J. (1991) Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv. Exp. Med. Biol.* 305, 47-56.
- Yuan H., Gaber M.W., McColgan T., Naimark M.D., Kiani M.F., and Merchant T.E. (2003) Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies. *Brain Res.* 969, 59-69.



- 
- Zhang W., Zhou D.B., Zhao Y., Zhuang J.L., Leng X.M., Wang S.J., Jiao L., Tang F.L., Zhang J.P., Wang X., and Shen T. (2007) Peripheral blood CD34+ cell mobilization in 42 patients with severe autoimmune disease. *Chin Med. Sci. J.* 22, 108-112.
- Zsebo K.M., Cohen A.M., Murdock D.C., Boone T.C., Inoue H., Chazin V.R., Hines D., and Souza L.M. (1986) Recombinant human granulocyte colony stimulating factor: molecular and biological characterization. *Immunobiology* 172, 175-184.
- Zysk G., Bruck W., Huitinga I., Fischer F.R., Flachsbarth F., van Rooijen N., and Nau R. (1997) Elimination of blood-derived macrophages inhibits the release of interleukin-1 and the entry of leukocytes into the cerebrospinal fluid in experimental pneumococcal meningitis. *J. Neuroimmunol.* 73, 77-80.

---

## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich ganz besonders Herrn PD Dr. M. Prinz danken, ohne dessen Hilfe und freundschaftliche Unterstützung die Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Sein wissenschaftlicher Enthusiasmus war ansteckend und hat maßgeblich an der Entstehung der Arbeit beigetragen.

Zu großem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. D. Doenecke für die Betreuung dieser Arbeit und ihre Fachvertretung an der Fakultät für Biologie der Georg-August-Universität Göttingen verpflichtet

Gleiches gilt auch für Herrn Prof. Dr. U. Groß, der bereitwillig das Korreferat übernommen hat.

Prof. Dr. W. Brück möchte ich für die vorbehaltlose und viel Freiraum gewährende Unterstützung während dieser Arbeit danken.

Weiterhin gebührt mein Dank ganz besonders Hauke und Mariann, ohne die ein erheblicher Teil des Spaßes im Labor gefehlt hätte.

Bei all jenen Wissenschaftlern, die durch ihre Kooperationsbereitschaft nicht nur den Fortgang der Arbeit gesichert, sondern auch dazu beigetragen haben, dass wir das Projekt abschließen konnten, möchte ich danken. Namentlich sind das Mirko, Doron, Jenni, Olga und Karina

Auch meinen Eltern möchte ich für ihre immerwährende Unterstützung danken. Wenige Worte, doch sie wissen was gemeint ist.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Alexander Mildner  
Geburtsdatum: 08.12.1976  
Geburtsort: Hannover  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1983 – 1987 Grundsschule Wettbergen  
1987 – 1989 Orientierungsstufe Hemmingen  
1989 – 1997 Carl Friedrich Gauß Schule Hemmingen  
kooperative Gesamtschule  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung

1997 – 2003 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen mit den Fächern: Mikrobiologie, Immunologie und physikalische Chemie  
1999 Vordiplomsprüfung mit den Fächern Mikrobiologie, physikalische Chemie, anorganische Chemie und Zoologie  
2002 – 2003 Diplomarbeit im Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Abteilung Entwicklungsbiologie.  
Titel „Funktionelle Charakterisierung des *Drosophila* Genes *brummer* und seiner humanen Homologen“  
Abschlussnote: Sehr gut  
Publikation  
  
Gronke S., Mildner A., Fellert S., Tennagels N., Petry S., Muller G., Jackle H., and Kuhnlein R.P. (2005) Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab* 1, 323-330.  
2004 – 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Neuropathologie, Göttingen  
Publikationen

Prinz M., Garbe F., Schmidt H., Mildner A., Gutcher I., Wolter K., Piesche M., Schroers R., Weiss E., Kirschning C.J., Rochford C.D., Bruck W., and Becher B. (2006) Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest* 116, 456-464.

Herrmann I., Kellert M., Schmidt H., Mildner A., Hanisch U.K., Bruck W., Prinz M., and Nau R. (2006) Streptococcus pneumoniae Infection aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis via Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* 74, 4841-4848.

Djukic M., Mildner A., Schmidt H., Czesnik D., Bruck W., Priller J., Nau R., and Prinz M. (2006) Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 129, 2394-2403.

van Loo G., De Lorenzi R., Schmidt H., Huth M., Mildner A., Schmidt-Suppran M., Lassmann H., Prinz M.R., and Pasparakis M. (2006) Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat Immunol* 7, 954-961.

## Dissertation

Okt 2006

Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im Zentrum Pathologie, Abteilung für Neuropathologie in Göttingen unter der Leitung von PD Dr. M. Prinz

Jan 2007 – Dez 2007

Stipendium der Gertrud Reemtsma Stiftung  
Publikationen

Kassmann C.M., Lappe-Siefke C., Baes M., Brugger B., Mildner A., Werner H.B., Natt O., Michaelis T., Prinz M., Frahm J., and Nave K.A. (2007) Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet.* 39, 969-976.

Mildner A., Schmidt H., Nitsche M., Merkler D., Hanisch U.K., Mack M., Heikenwalder M., Bruck W., Priller J., and Prinz M. (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6C(hi)CCR2(+) monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 10 (12); 1544-1553

Dez 2007

Abgabe der vorliegenden Dissertation