Aus dem Institut für Neuropathologie (Prof. Dr. med. W. Brück) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Vergleich primärer Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen von jungen und alten Mäusen bezüglich ihrer Bakterienphagozytose und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren *in vitro*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Annika Kaufmann

aus Nordhausen

Göttingen 2016

Dekan:Prof. Dr. rer. nat. H. K. KroemerI.Berichterstatterin:PD Dr. med. S. SchützeII.Berichterstatter:PD Dr. rer. nat. F. Lühder

Tag der mündlichen Prüfung:23.11.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Infektionen im Alter	1
1.2 Veränderungen des Immunsystems im Alter	3
1.3 Infektionen des zentralen Nervensystems im Alter	6
1.4 Makrophagen	
1.5 Mikrogliazellen	14
1.6 Ziele der Arbeit	
2 Material und Methoden	
2.1 Materialien	
2.1.1 Geräte	
2.1.2 Verbrauchsmaterial und spezielles Material	
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	20
2.1.4 Mäuse	21
2.1.5 Escherichia coli (E. coli) K1	22
2.1.6 Medien, Lösungen und Antikörper	22
2.1.6.1 Zellkultur	22
2.1.6.2 ELISA	23
2.2 Primäre murine Peritonealmakrophagen-Kultur	
2.3 Primäre murine Mikroglia-Kultur aus adulten Mäusen	
2.3.1 Anlegen eines Astrozytenrasens aus Gehirnen neugeborener Mäuse	25
2.3.2 Anlegen von Mikroglia-Kulturen junger und alter adulter Mäuse	26
2.3.3 Gewinnung der adulten Mikrogliazellen	27
2.4 Stimulation von Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen	
2.5 Färbung der Zellkulturen und Bewertung ihrer Dichte	
2.6 Phagozytose-Assay	
2.7 NO-Assay	
2.8 WST-Zellvitalitätstest	
2.9 ELISAs	
2.10 Statistik	
3 Ergebnisse	
3.1 Unterschiede zwischen Peritonealmakrophagen junger und alter Mäuse	34

3.1.1 Anzahl peritonealer Makrophagen bei jungen und alten Mäusen	34
3.1.2 Morphologie junger und alter Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem und ak Zustand	tiviertem
3.1.3 Zellvitalität junger und alter Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit versc Konzentrationen von TLR-Agonisten	hiedenen 37
3.1.4 Phagozytose von <i>E. coli</i> K1 durch junge und alte Peritonealmakrophagen aktiviertem Zustand und nach Behandlung mit verschiedenen TLR-Agonisten	in nicht- 39
3.1.5 Freisetzung von NO durch Peritonealmakrophagen junger und alter Mäuse aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten	in nicht- 41
3.1.6 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch junge und alte Peritonealmakt in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten	rophagen 43
3.1.6.1 TNF-α	43
3.1.6.2 IL-6	45
3.1.6.3 KC	47
3.2 Unterschiede zwischen Mikrogliazellen junger und alter Mäuse	49
3.2.1 Morphologie junger und alter Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem und aktiviertem	n Zustand
	49
3.2.2 Phagozytose von <i>E. coli</i> K1 durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-ak Zustand und nach Behandlung mit verschiedenen TLR-Agonisten	tiviertem
3.2.3 Freisetzung von NO durch Mikrogliazellen junger und alter Mäuse in nicht-ak Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten	tiviertem
3.2.4 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch junge und alte Mikrogliazellen aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten	in nicht-
3.2.4.1 TNF-α	53
3.2.4.2 IL-6	54
3.2.4.3 KC	56
3.3 Einfluss des Glykoproteins IFN-γ auf die Phagozytoseleistung und die Freisetz Zytokinen/Chemokinen durch Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen	ung von 58
3.3.1 Makrophagen	58
3.3.1.1 Einfluss von IFN-γ auf die Phagozytose von <i>E. coli</i> K1 durch Peritonealmakrop in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten	phagen 58
3.3.1.2 Einfluss von IFN-γ auf die Zytokin-/Chemkinausschüttung durch Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschi TLR-Agonisten	iedenen 60
3.3.1.2.1 TNF-α	60
3.3.1.2.2 IL-6	61
	63
3.3.1.2.3 KC	

	3.3.2.1 Phagozytose von <i>E. coli</i> K1 durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-al Zustand und nach Behandlung mit verschiedenen TLR-Agonisten ohne Zusatz des Z	ctiviertem Zytokins
	3.3.2.2 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch junge und alte Mikroglia nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten Zusatz von IFN-γ	zellen in ohne 67
	3.3.2.2.1 TNF-α	67
	3.3.2.2.2 IL-6	68
	3.3.2.2.3 КС	70
4 D	Diskussion	72
5 Z	Zusammenfassung	
6 P	Publikationen	
7 L	Literaturverzeichnis	
8 A	Anhang	109
8.	8.1 Abbildungsverzeichnis	109
8.	8.2 Tabellenverzeichnis	110
8.	8.3 Abkürzungsverzeichnis	110

1 Einleitung

1.1 Infektionen im Alter

Seit einigen Jahrzehnten kommt ein deutlicher Wandel der weltweiten Gesellschaft zu Vorschein: Die Menschen werden immer älter. Um die demographische Alterung einer Gesellschaft zu objektivieren, wurde der sogenannte "Altenquotient" eingeführt. Dieser gibt die Anzahl der über 65-Jährigen an, die auf 100 Menschen im Erwerbsalter kommen. Im Jahr 2008 lag der Altenquotient in Deutschland bei 34. Nach der 12. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung des Statistischen Bundesamtes kann er unter den dort genannten Bedingungen bis zum Jahr 2060 einen Wert von 67 erreichen (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2009). Welche Gründe sind für diese Entwicklung hauptanteilig verantwortlich? In erster Linie trägt der medizinische Fortschritt dazu bei. Die heutigen Menschen, vor allem in den entwickelten Ländern, üben zudem seltener Berufe mit extremer physischer Belastung aus und leben gesundheitsbewusster. Dies spiegelt sich auch in der Zunahme der durchschnittlichen Lebenserwartung wider. Im Jahr 2010 lag diese für einen neugeborenen Jungen bei 77 Jahren und 4 Monaten, für ein neugeborenes Mädchen bei 82 Jahren und 6 Monaten (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2009). Künftig ist mit einer weiteren kontinuierlichen Zunahme der Lebenserwartung zu rechnen (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2009). Das bedeutet für die deutsche Bevölkerungsentwicklung, dass die Anzahl der über 80-Jährigen zunimmt. Schätzungsweise wird in 50 Jahren 14 % der Bevölkerung, d. h. jeder Siebte, ein Alter von 80 oder älter aufweisen (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2009). Den Prognosen der Vereinten Nationen zufolge werden bis zum Jahr 2050 weltweit 2 Milliarden alte Menschen (60 Jahre oder älter) auf der Erde leben, mit der Aussicht, dass sich ihre Anzahl in den weiteren 50 Jahren noch einmal verdreifachen wird (United Nations 2009). Auch in den weniger entwickelten Ländern lässt sich die Bevölkerungsalterung allmählich beobachten. Der Anteil der über 60-Jährigen liegt in den Entwicklungsländern derzeit noch bei etwa 8 %, jedoch bestehen Tendenzen, dass ihr Anteil bis 2050 bis auf ein Fünftel ansteigen wird (United Nations 2009). Der demographische Wandel ist demnach nicht nur in Deutschland zu erkennen, sondern es ist weltweit mit einer Veränderung der Gesellschaftsstruktur zu rechnen.

Alte Menschen weisen im Vergleich zu jüngeren Personen eine höhere Anfälligkeit für Krankheiten auf. Anfang des 20. Jahrhunderts stellten Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache dar (Yoshikawa 2000). Obwohl inzwischen Herzinfarkt, Tumorerkrankungen und Schlaganfall an der Spitze der Mortalitätsstatistiken stehen (Yoshikawa 2000), stellen trotz Einführung von antibiotischen, antiseptischen Therapien und Impfstoffen Infektionskrankheiten in der Geriatrie wieder ein zunehmendes Problem dar (Werner und Kuntsche 2000). Etwa ein Drittel der über 65-Jährigen sterben an einer Infektionskrankheit (Mouton et al. 2001). Besonders Infektionen des Urogenitaltraktes, der Lungen, der Haut- und Weichteile, des Abdomens sowie bakterielle Endokarditis, bakterielle Meningitis, Tuberkulose und Herpes zoster zeigen bei älteren Personen eine hohe Prävalenz (Yoshikawa 2000). Zudem ist die Mortalität dieser Infektionen bei Älteren etwa dreimal höher als bei jungen Patienten, die dieselbe Krankheit aufweisen (Yoshikawa 2000). Mögliche Gründe dieser erhöhten Mortalität im Alter sind die altersassoziierte Verminderung der Funktionsreserven und der Abwehrmechanismen, die vielfältigen Begleitmorbiditäten, die Verzögerungen von Diagnose und Therapiebeginn, eine geringe Toleranzbreite bei Therapien und höhere Raten unerwünschter Arzneimittelnebenwirkungen (Yoshikawa 2000, Werner und Kuntsche 2000). Zudem weisen ältere Patienten ein mit jedem Lebensjahrzehnt zunehmendes Risiko auf, nosokomiale Infektionen zu entwickeln (Saviteer et al. 1988).

Die Diagnosefindung einer Infektion stellt sich bei alten Menschen schwieriger dar als bei jungen Personen (Mouton et al. 2001). Das Problem ist, dass die klassischen Symptome von Infektionen, insbesondere Fieber und Leukozytose, die bei jüngeren Patienten geläufig sind, bei der alten Altersgruppe weniger oder gar nicht in Erscheinung treten (Crossley und Peterson 1996, Norman 1999). Fieber fehlt bei etwa 20-30 % der alten Menschen mit einer ernsthaften Infektion (Norman und Yoshikawa 1996). Wenn Fieber vorliegt, ist das häufig ein Zeichen für eine schwerwiegende Infektion, meist bakteriellen Ursprunges (Keating et al. 1984, Wassermann et al. 1989). Zudem präsentieren sich infektiöse Erkrankungen bei Menschen im hohen Alter häufig atypisch, z. B. können ein akuter Verwirrtheitszustand oder Delirium erste klinische Anzeichen darstellen (Rockwood 1989). Umgekehrt sind Infektionen eine der häufigsten Ursachen eines Delirs in der älteren Generation (Yoshikawa 1997). Außerdem können subakute Symptome wie Schwäche, Anorexie, Gewichtsabnahme, Stürze, Inkontinenz, fokalneurologische oder allgemein funktionelle Defizite bei älteren Patienten Zeichen einer Infektion sein (Yoshikawa 2000, Werner und Kuntsche 2000).

1.2 Veränderungen des Immunsystems im Alter

Die Veränderungen des Immunsystems im Alter scheinen eine wichtige Rolle für die mit dem Alter steigende Inzidenz von Infektionskrankheiten zu spielen (Effros 2005). Der Alterungsprozess des Immunsystems wurde erstmals von dem amerikanischen Gerontologen Roy Walford als "Immunseneszenz" bezeichnet (Effros 2005). Er betrifft sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem (Allman und Miller 2005, Gomez et al. 2005, Weng 2006). Einen Überblick über den Aufbau und die einzelnen Funktionen des Immunsystems verschafft Tabelle 1.

	Angeborene/Innate Immunität	Erworbene/Adaptive Immunität			
Eigen- schaften	Aktivierung in Stundenkeine Gedächtnisfunktion	 Aktivierung in Gedächtniszell antwort bei Re 	Tagen len gewährleisten schnellere Immun- infektion mit gleichem Erreger		
Zelluläre Bestandteile	 Monozyten/Makrophagen neutrophile Granulozyten natürliche Killerzellen (NK) dendritische Zellen 	T-Zellen (zelluläre Immunität) ✓ CD4 ⁺ ✓ CD8 ⁺	• B-Zellen (humorale Immunität)		
Haupt- funktionen	 zu 1. Phagozytose von Antigenen, Mikroorganismen und zellulä- rem Abfall; direkte Eliminie- rung eingedrungener Erreger und von Tumorzellen; Produk- tion von Zytokinen; Beteiligung an Wundheilung zu 2. frühe Phagozytose und Elimi- nierung von Mikroorganismen zu 3. Lyse von infizierten Zellen; Aktivierung von Makrophagen zu 4. Antigenpräsentation; Aktivie- rung von NK-, T- und B-Zellen 	CD4 ⁺ : T-Helferzellen Unterstützung von B- Zellen zur Antikörper- produktion und ande- ren zytokinproduzie- renden Zellen (z. B. Makrophagen, zytoto- xische T-Zellen) CD8 ⁺ : zytotoxische T- Zellen Abtöten von infizier- ten Zellen	Antikörperproduktion: IgM: Aktivierung des Komplement- systems; Bildung bei Erstkontakt mit Antigen; Antigenrezeptor von naiven B-Lymphozyten IgG: Nachweis einer durchgemachten Infektion bzw. Impfung; durch Fc- Rezeptor vermittelte Phagozytose; Aktivierung des Komplementsystems; neonatale Immunität IgE: Abwehr gegen Parasiten; Mast- zelldegranulation IgA: mukosale Immunität (Vorkom- men auf Schleimhäuten und in Mut- termilch) IgD: wirkt als Antigenrezeptor bei der vom Antigen stimulierten Vermeh- rung und bei der Differenzierung von B-Zellen		

Tabelle	1: Auf	bau und	Funktion	des]	Immunsystems	(Kwetkat 2010,	Kumar	und Burns	2008,	Abbas et al	. 2010))
---------	--------	---------	----------	-------	--------------	----------------	-------	-----------	-------	-------------	---------	---

Neben der vermehrten Anfälligkeit für virale und bakterielle Infektionskrankheiten kommt es im Rahmen der Immunseneszenz zunehmend zu einer Reaktivierung latenter Viruserkrankungen sowie zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Neoplasien (Effros 2003, Murasko und Jiang 2005, Pawelec et al. 2005, Prelog 2006). Des Weiteren kann sie die Wirksamkeit von Impfungen reduzieren (Weinberger et al. 2008).

Neben altersassoziierten Veränderungen des adaptiven Immunsystems (Franceschi et al. 2000a) konnten auch wesentliche Veränderungen in allen Zellreihen der innaten Immunität

gezeigt werden (Agrawal et al. 2008, Gomez et al. 2005, Plackett et al. 2004, Plowden et al. 2004, Sebastián et al. 2005, Solana et al. 2006).

Eine eindrückliche Erscheinung im Alterungsprozess stellt die Involution des Thymus dar. Diese Drüse übernimmt als Hauptaufgabe die Reifung und Differenzierung der T-Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark abstammen. Erste histologische Veränderungen dieses Organs zeigen sich bereits im 1. Lebensjahr und enden mit der Involution im 4.-5. Lebensjahrzehnt (George und Ritter 1996). Das funktionelle aktive Gewebe von Kortex und Medulla wird zunehmend durch Fettgewebe ersetzt. Im Alter von etwa 70 Jahren liegen nur noch weniger als 10 % des funktionellen Gewebes vor (George und Ritter 1996). Folglich ist die Anzahl der naiven T-Zellen im Alter dramatisch herabgesetzt (Fagnoni et al. 2000). Zudem lassen sich funktionelle Defekte bei den verbleibenden naiven T-Zellen feststellen: verkürzte Telomere mit entsprechend eingeschränkter Proliferationskapazität, reduzierte Vielfalt an T-Zell-Rezeptoren, verminderte Ausschüttung des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin (IL)-2 und beeinträchtigte Umwandlung und Differenzierung in Effektorzellen (Pfister et al. 2006, Kohler et al. 2005, Haynes et al. 2003). Daraus resultiert eine gestörte Immunabwehr gegen neue Antigene (Weiskopf et al. 2009). Ein weiterer Grund, der die Erschöpfung des naiven T-Zell-Pools mitbedingt, ist ein Mangel an IL-7-Bildung. IL-7 stimuliert das Wachstum der Vorläuferzellen der T-Lymphozyten und auch der B-Lymphozyten. Nach einer IL-7-Behandlung ließ sich ein Rückgang der Thymusatrophie und eine Steigerung der Drüsenaktivität in alten Mäusen (Andrew und Aspinall 2001, Henson et al. 2005) sowie eine Zunahme an naiven CD4- und CD8-positiven T-Zellen bei älteren Rhesusaffen (Aspinall et al. 2007) beobachten. Weiterhin bestehen Hinweise, dass naive T-Zellen im Alter anfälliger für apoptotische Abbauprozesse sind (Aggarwal und Gupta 1998/1999, Tsukamoto et al. 2010). Dieser Verlust an naiven T-Zellen wird bei älteren Menschen zum Teil durch eine vermehrte Bildung von T-Gedächtniszellen kompensiert (Reber et al. 2012). Ein weiterer Aspekt ist, dass chronische Infektionen, wie z. B. Zytomegalie (CMV)-Infektionen, die Immunseneszenz beschleunigen und zu einem chronischen subklinischen Entzündungsstatus beitragen können (Almanzar et al. 2005). CMV-Infektionen bewirken Veränderungen im CD8-positiven T-Zell-Repertoire und eine Akkumulation von CD8-positiven Effektor-T-Zellen (Gillespie et al. 2000, Khan et al. 2002). Diese hoch differenzierten T-Effektorzellen zeigen jedoch einige altersassoziierte Defekte auf: verkürzte Telomere. ein sehr begrenztes Т-Zellrezeptorrepertoire, eingeschränkte Wanderung zu Lymphknoten und abnehmende Stimulierbarkeit durch Antigenpräsentierende Zellen bedingt durch einen Mangel an costimulierenden Molekülen wie CD28 und CD27 (Appay et al. 2002). Die Akkumulation von CD28negativen T-Effektorzellen konnte mit einer verminderten humoralen Antwort auf Influenza-Impfungen in Verbindung gebracht werden (Saurwein-Teissl et al. 2002, Goronzy et al. 2001).

Einen ähnlichen Alterungsprozess durchlaufen auch die B-Zellen. Während die Anzahl naiver B-Zellen sinkt, akkumulieren B-Effektorzellen. Dies hat zur Folge, dass die Variabilität der humoralen Immunantwort verloren geht (Allman und Miller 2005). Normalerweise werden hochaffine Antikörper nach somatischer Rekombination und Isotypenwechsel in IgG-Isotypen umgewandelt. Mit zunehmendem Alter kommt es bei diesen beiden Zwischenschritten vermehrt zu Defiziten, was eine schwächere und weniger affine Antikörper-Antwort zur Folge hat (Frasca et al. 2005). Auch die Interaktion zwischen B-Zellen und T-Helferzellen ist im Alter abgeschwächt, da das für die Stimulation von B-Zellen benötigte Oberflächenmerkmal CD154 (=CD40/L) von CD4-positiven T-Helferzellen reduziert ausgeprägt wird (Haynes und Eaton 2005). Zudem sezernieren aktivierte T-Zellen weniger IL-2, das dazu beisteuern kann, dass die von T-Helferzellen vermittelte Antikörperproduktion vermindert ist. In vitro konnte beobachtet werden, dass die Gabe von IL-2 eine Verbesserung der Antikörperproduktion herbeiführt (Ginaldi et al. 1999a, Ginaldi et al. 1999b). Ähnlich wie bei den T-Zellen zeigt sich im höheren Alter eine klonale Ausbreitung von B-Gedächtniszellen (Weksler und Szabo 2000), die eine abnehmende Anfälligkeit für Apoptose aufweisen (Chong et al. 2005). Diese Expansion kann die Repertoire-Vielfältigkeit der B-Zellen einschränken und daher auch den Impferfolg bei älteren Menschen beeinflussen (Weiskopf et al. 2009).

Lange Zeit wurden die Alterserscheinungen des innaten Immunsystems unterschätzt (Solana et al. 2006). Das innate Immunsystem stellt das erste Abwehrsystem gegen Krankheitserreger dar und umfasst neben mechanischen Barrieren wie Epithelien, phagozytischen Zellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) und natürlichen Killerzellen (NK) auch lösliche Mediatoren wie Zytokine, Chemokine, Hormone und Radikale. Eine wichtige Funktion des angeborenen Immunsystems ist die Phagozytose zur Eliminierung pathogener Erreger. Es gibt Hinweise, dass neben den neutrophilen Granulozyten auch Makrophagen mit zunehmenden Alter eine reduzierte Phagozytoseleistung und Superoxidproduktion aufweisen (Gomez et al. 2005). Es konnte eine geringere Anzahl an Alveolarmakrophagen in alten Mäusen im Vergleich zu Jüngeren nachgewiesen werden. Diese Beobachtung könnte mit der zunehmenden Inzidenz von Pneumonien im Alter in Zusammenhang stehen (Khanna und Markan 1999). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die absolute Anzahl an NK-Zellen mit zunehmendem Alter ansteigt (Miyaji et al. 2000, Borrego et al. 1999). NK-Zellen stellen zytotoxische Zellen dar, die insbesondere bei der Abwehr von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen. Es besteht die Hypothese, dass eine hohe NK-Zytotoxizitätsaktivität mit einem gesundem Altersverlauf und einer längeren Lebensdauer assoziiert ist, während eine abnehmende NK-Funktion einen Prädiktor für Morbidität und Mortalität darstellt (Franceschi et al. 1995, Cossarizza et al. 1997, Solana und Mariani 2000, Ogata et al. 2001, Bruunsgaard et al. 2001, Molling et al. 2005).

Trotz der beschriebenen funktionellen Einschränkungen des innaten Immunsystems auf Pro-Zell-Basis konnte eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Rahmen der Alterung festgestellt werden. Dieser chronische subklinische inflammatorische Prozess ist auch unter dem Begriff Entzündungsaltern (engl. *inflammaging*) bekannt (Franceschi et al. 2000b). Erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-6, IL-1beta (β) und Tumornekrosefaktoralpha (TNF- α) wurden in der älteren Population beschrieben und als prädiktiver Marker für funktionelle Beeinträchtigungen, Gebrechlichkeit und Mortalität postuliert (Ershler und Keller 2000, Bruunsgaard et al. 2003, O'Mahony et al. 1998). Es besteht die Hypothese, dass *inflammaging* durch chronische Stimulation des innaten Immunsystems, bedingt durch Abbauprodukte und/oder durch vom geschwächten Immunsystem nicht effektiv eliminierte Pathogene, begründet ist (Weinberger et al. 2008). Der chronische subklinische Entzündungsprozess unterstützt vermutlich die Entwicklung und Progredienz von altersassoziierten Erkrankungen wie z. B. Osteoporose, Neurodegeneration, Atherosklerose, Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom und Autoimmunerkrankungen (Libby 2002, Gao und Hong 2008, Ginaldi et al. 2005, Franceschi et al. 2000b).

1.3 Infektionen des zentralen Nervensystems im Alter

Trotz der Entwicklung effektiver antibiotischer Therapien und der generellen Verbesserung der Hygienemaßnahmen und des Gesundheitssystems ist die Inzidenz von Infektionen des zentralen Nervensystems (ZNS) weltweit signifikant in den letzten 15 Jahren gestiegen (Karampekios und Hesselink 2005). Zerebrale Infektionen können diffuse Enzephalitiden, fokal liegende Abszesse und Zysten, regional vorkommende Meningitiden und Ependymitiden sowie epi- und subdurale Empyeme umfassen (Rajnik und Ottolini 2000, Karampekios und Hesselink 2005). Auslöser dieser lebensbedrohlichen Erkrankungen können neben Bakterien auch Viren, Pilze und Parasiten sein. Insbesondere bakterielle Infektionen gehen häufig mit Komplikationen wie Tod in der Akutphase oder neurologischen und neuropsychologischen Spätfolgen einher.

Seit der weitverbreiteten Einführung der Impfung gegen Haemophilus influenzae Typ b, ein häufiger Erreger der bakteriellen Meningitis im Kleinkindalter, lässt sich eine merkliche Veränderung der Altersverteilung dieser bakteriellen Meningitis erkennen (Choi 2001). Schuchat und Kollegen konnten in ihrer 1995 durchgeführten Studie in den Vereinigten Staaten einen deutlichen Rückgang der Inzidenz der Haemophilus influenzae-Meningitis und eine Verschiebung des durchschnittlichen Alters der Patienten von 15 Monaten auf 25 Jahre aufzeigen. Erstaunlicherweise waren in fast 20 % der Fälle Patienten, die ein Alter über 60 Jahren aufwiesen, mitbeteiligt. Eine ähnliche Studie im Jahr 1986 zeigte noch eine Beteiligung von nur 8,6 % der älteren Altersgruppe auf (Schuchat et al. 1997). Es erscheint zunehmend, dass die bakterielle Meningitis sich als eine Erkrankung der Erwachsenen, insbesondere der älteren Altersgruppe, entwickelt (Choi 2001, Miller und Choi 1997, Rubach et al. 2011). Verschiedene epidemiologische Studien konnten belegen, dass eine größere Vielfalt an Erregern für die Entstehung einer Meningitis bei älteren Personen verantwortlich gemacht werden kann und die virale Atiologie dabei eher eine untergeordnete Rolle spielt (Wenger et al. 1990, Schlech et al. 1985, Behrman et al. 1989, Gorse 1984). Potentielle bakterielle Pathogene umfassen Streptococcus pneumoniae, Listeria monozytogenes, Gram-negative Bakterien wie Escherichia coli und Klebsiella pneumoniae, Streptococcus agalactiae und seltener Neisseria meningitidis und Haemophilus influenzae (Choi 1992). Das breite Spektrum an Erregern ist zum einen durch die erhöhte Frequenz an Komorbiditäten und zum anderen durch die Immunseneszenz zu begründen (Choi 2001). Verschiedene Studien offenbarten, dass Pneumonie, Diabetes mellitus, Nieren- oder Leberinsuffizienz und andere chronische Grunderkrankungen das Entstehen von bakteriellen Meningitiden, insbesondere bedingt durch die Erreger S. pneumoniae, L. monozytogenes und S. agalactiae, bei älteren Erwachsenen begünstigen kann (Behrman et al. 1989, Gorse et al. 1984, Domingo et al. 1997, Nieman und Lorber 1980, Cabellos et al. 1999). Die Inzidenz der Pneumokokken-Meningitis zeigt sich zum Beispiel bei Personen im Alter über 60 Jahren viermal höher als bei Personen im Alter zwischen 2-29 Jahren. Für die Listerien-Meningitis ist dieser Unterschied noch ausgeprägter: Personen im Alter über 60 Jahren erkranken 15 Mal häufiger an einer Listerien bedingten Meningitis als Personen im Alter zwischen 2-29 Jahren (Schuchat et al. 1997). Auch die Komplikationsrate bei einer bakteriellen Meningitis liegt mit 85 % bei älteren Patienten signifikant höher als bei jüngeren Erwachsenen mit 41 % (Gorse et al. 1984). Dass die Mortalitätsrate der bakteriellen Meningitis bei älteren Menschen weiterhin durchschnittlich über 20 % liegt, ist teilweise auf die variable atypische klinische Präsentation mit seltenerem Vorkommen von Fieber, Meningismus und Kopfschmerzen im Vergleich zu jüngeren Altersgruppen und die damit verzögerte Diagnosefindung zurückzuführen (Choi 2001).

Die Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke dienen dem Gehirn zum Schutz gegen mikrobielle Pathogene (Gerber und Nau 2010), indem sie die unselektive Diffusion von vaskulären und zellulären Komponenten verhindern (De Chiara et al. 2012). Insbesondere bei Beeinträchtigungen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) können Pathogene über den Blutstrom in das Gehirn einwandern. Zudem sind einige Pathogene in der Lage, die BHS durch direktes Schädigen zu überwinden, über die fenestrierten Kapillaren des Plexus choroideus in den Liquor zu gelangen und nach Infiltration des Gehirns schwere Infektionen auszulösen (De Chiara et al. 2012). Im Rahmen des Alterungsprozesses steigt die Angreifbarkeit des ZNS durch Infektionserreger deutlich an (Mattson 2004). Es zeigen sich Veränderungen der BHS. Obwohl die Barrierenfunktion der BHS in älteren Tieren überwiegend intakt erscheint, stellt sich die Anfälligkeit auf Disruptionen durch äußere Faktoren verstärkt dar (Shah und Mooradian 1997). Zudem liegen Hinweise vor, dass in älteren Tieren und Menschen gehäuft Störungen im selektiven Carrier-vermittelten-Transportsystem auftreten können (Shah und Mooradian 1997).

Das innate Immunsystem bildet das erste Abwehrsystem gegenüber Infektionen und spielt dabei eine entscheidende Rolle in der frühen Erkennung eingedrungener Pathogene und in der anschließenden Auslösung von inflammatorischen Antworten (Medzhitov und Janeway 2000). Das adaptive Immunsystem ist vielmehr für die Erregereliminierung in der späten Phase einer Infektion und für die Schaffung des immunologischen Gedächtnisses verantwortlich (Mogensen 2009). Neben den residenten Mikrogliazellen als Hauptvertreter des innaten Immunsystem des ZNS spielen auch Makrophagen der Meningen, des Plexus choroideus, der perivaskulären und zirkumventrikulären Bereiche eine entscheidende Rolle für die Immunabwehr. Die innate Immunantwort stützt sich auf die Erkennung von evolutionär erhaltenen Strukturen von Pathogenen, die sogenannten Pathogen-assoziierten-molekularen Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), bei der eine begrenzte Anzahl an *Pattern Recognition*-Rezeptoren (PRR) zur Anwendung kommen (Akira et al. 2006, Medzhitov und Janeway 2000). Eine der bedeutendsten und die bisher am intensivsten erforschte Familie der PRR stellen die *Toll-like* Rezeptoren (TLR) dar (Kaisho und Akira 2002). Die wichtigsten

Zelltypen, die TLR exprimieren, sind Antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten (Iwasaki und Medzhitov 2004). Im Gehirn sind sie hauptsächlich in Gliazellen, vorzüglich in den Mikrogliazellen, zu finden. Ein kleiner Teil dieser Rezeptorfamilie zeigt sich auch auf der Oberfläche von Neuronen (Aravalli et al. 2007, Carpentier et al. 2008, Hanisch et al. 2008, Konat et al. 2006, Okun et al. 2009). Bisher konnten 10 humane und 12 murine TLR identifiziert werden (Kawasaki und Kawai 2014), die jeweils verschiedene PAMPs von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen erkennen können (Akira et al. 2006). Einen Überblick über wichtige TLR und ihre Liganden verschafft Tabelle 2.

Tabelle 2: Wichtige TLR und ihre Liganden (Mogensen 2009) 1000			
TLR-Familie	Liganden (Ursprung)		
TLR1/TLR2	• Triacyl-Lipoproteine (Bakterien)		
TLR2/TLR6	Diacyl-Lipoproteine (Mykoplasmen)		
	Lipoteichonsäure (Gram-positive Bakterien)		
TLR2	Lipoproteine (verschiedene Pathogene)		
	• Peptidoglykane (Gram-positive und -negative Bakterien)		
	• Lipoarabinomannan (Mykobakterien)		
	• Porine (Neisseria)		
	• behüllte Glykoproteine (Viren, z. B. Masern-Virus, Herpes-simplex-Virus, Zytomega- lievirus)		
	• GPI-Mucin (Protozoen)		
	Phospholipomannan (Candida)		
	• Zymosan (Pilze)		
	• β-Glykane (Pilze)		
TLR3	• doppelsträngige RNA (Viren)		
TLR4	• Lipopolysaccharide (LPS, Gram-negative Bakterien)		
	• behüllte Glykoproteine (Viren, z. B. Respiratorische-Synzytial-Viren)		
	Glykoinositolphospholipide (Protozoen)		
	• Mannan (Candida)		
	Hitzeschockprotein 70 (Wirt)		
TLR5	• Flagellin (flagellierte Bakterien)		
TLR7/TLR8	• einzelsträngige RNA (RNA-Viren)		
TLR9	• unmethylierte CpG-DNA (Bakterien, Viren, Protozoen)		
TLR10	• bisher unbekannt		
TLR11	• scheint uropathogene Bakterien (Zhang et al. 2004) und Profilin-ähnliche Proteine ab- stammend von Toxoplasma gondii (Lauw et al. 2005) zu erkennen		

Im Rahmen bakterieller Infektionen sind insbesondere die TLR2, 4 und 9 beteiligt: TLR2 erkennt dabei unter anderem bakterielle Lipopeptide, TLR4 detektiert Endotoxine (LPS) und TLR9 ist durch bakterielle DNA stimulierbar (Akira et al. 2001, Mogensen 2009). Als Typ 1 Transmembran-Glykoproteine kommen die meisten TLR (TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10) an der

Zelloberfläche vor und erkennen vorwiegend bakterielle Produkte. Die übrigen TLR (TLR3, 7, 8 und 9) sind fast ausschließlich in intrazellulären Kompartimenten, einschließlich Endosomen und Lysosomen, zu finden und sind überwiegend auf die Erkennung von Nukleinsäuren spezialisiert (Iwasaki und Medzhitov 2004).

Ein gemeinsames Merkmal aller TLR sind die Leucin-reichen Sequenzen (leucine rich repeats, LRR), die extrazellulär zur Erkennung von PAMPs dienen, und die im Zytoplasma liegende TIR (Toll/IL-1 receptor)-Domäne, über die intrazelluläre Signalwege ausgelöst werden (Kawasaki und Kawai 2014). Nach Ligandenbindung an der Ektodomäne werden Adapterproteine der TIR-Domäne rekrutiert, die unterschiedliche Signalwege induzieren können. Es werden folgende TIR-Domäne enthaltende Adaptermoleküle unterschieden: MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), TRIF (TIR domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β), TIRAP (TIR-associated protein)/MAL (MyD88 adaptor like protein) und TRAM (TRIF-related adaptor molecule). Abhängig von der Beteiligung der Adaptermoleküle werden TLR-Signalketten grob in MyD88- und TRIF-abhängige Reaktionsketten unterteilt. Der MyD88-abhängige Signalweg wird von fast allen TLR in Anspruch genommen, außer von TLR3. TLR3 löst einen MyD88-unabhängigen Signalweg durch das Adapterprotein TRIF aus. TIRAP/MAL ist an der TIR-Domäne von TLR2 und 9 gekoppelt. Eine Besonderheit stellt die Auslösung der Signalkaskade durch TLR4 dar, die neben MyD88 auch durch die Adaptermoleküle TIRAP/MAL, TRIF und TRAM induziert werden kann (Kawasaki und Kawai 2014). Bei dem MyD88-abhängigen Signalweg kommt es nach Ligandenbindung an dem TLR zu einer Komplexbildung zwischen dem rekrutierten MyD88 und den Enzymen IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase)-1 und 4. Nach Autophosphorylierung binden die aktivierten Kinasen an TRAF (TNF receptor-associated factor)-6. Über weitere Einzelschritte kommt es zur Aktivierung von der Proteinkinase TAK (transforming growth factor activated kinase)-1 und zur anschließenden Phosphorylierung von der Kinase IkB (inhibitor of kappa B), das schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) führt. NF-kB transloziert in den Zellkern und triggert die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. TNF- α , IL-1 und 12. Nebenbei können über TAK1 auch Mitglieder der MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen, wie z. B. p38-mitogenaktivierte Proteinkinase und c-Jun N-terminale Kinase (JNK), aktiviert werden. Nach Erreichen des Zellkernes aktivieren diese phosphorylierten Kinasen unter anderem Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 (activator protein 1), das z. B. an apoptotischen Prozessen beteiligt ist. Bei dem TRIF-abhängigen Signalweg, der nur von TLR3 und 4 in Anspruch genommen wird, kommt es unter anderem zur Aktivierung von TRAF3, das über weitere Einzelschritte die Phosphorylierung von IRF (*interferon regulatory factor*)-3 auslöst. IRF3 transloziert daraufhin in den Zellkern und bewirkt die Freisetzung von Typ I-Interferonen (Kawasaki und Kawai 2014), die immunstimulierende, insbesondere antivirale und -tumorale, Wirkungen entfalten können.

Im Rahmen einer Infektion können Makrophagen und Mikrogliazellen mithilfe der TLR Pathogenbestandteile erkennen. Aktivierte Makrophagen und Mikrogliazellen setzen unter anderem proinflammatorische Zytokine frei, mit denen sie weitere Abwehrzellen an den Ort des immunologischen Geschehens anlocken und aktivieren können, und bilden unter anderem Stickstoffmetabolite wie z. B. Stickstoffmonoxid (NO), mit denen sie direkt Pathogene abtöten können.

1.4 Makrophagen

Als "große Fresszellen" wurden die Makrophagen erstmals von dem russischen Zoologen Ilja Metchnikoff beschrieben (van Furth et al. 1972), der im Jahr 1882 das Prinzip der Phagozytose entdeckte (Lasser 1983). Auf der Basis seiner phylogenetischen Studien beschrieb er ihre Existenz in allen Invertebraten und Vertebraten und erkannte dabei ihre Bedeutung für das Immunsystem (Takahashi 2000, van Furth et al. 1972). Als professionelle Phagozyten fungieren Makrophagen als "Pathogen-Sensor" und spielen eine entscheidende Rolle bei der Initiation von Immunantworten, Eliminierung von Erregern, Regulation der adaptiven Immunantwort und Wiederherstellung geschädigter Gewebsabschnitte (Weiskopf et al. 2009). Als reife Makrophagen sind sie in nahezu allen Geweben des Körpers präsent und überprüfen konstant ihre direkte Umgebung auf Zeichen von Gewebsschaden oder eingedrungener Organismen (Murray und Wynn 2011). Sie migrieren angelockt durch Chemokine zu Entzündungsorten (Jones 2000) und können unter anderem mit Rezeptoren, die den Fc-Bereich von Antikörpern der Klasse IgG und Fragmente von Komplementkomponenten erkennen, effizient entsprechende Mikroorganismen an sich heften und phagozytieren. Mit Pseudopodien werden Partikel aktiv umgeben und in einem Phagosom eingehüllt. Zur Auflösung des ingestierten Materials stehen diesen Phagozyten Sauerstoff-abhängige und -unabhängige Mechanismen zur Verfügung. Die Sauerstoff-abhängigen Mechanismen umfassen Sauerstoffmetabolite wie Wasserstoffperoxide, Superoxide und Hydroxylradikale. Die Sauerstoff-unabhängigen Prozesse scheinen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen: Sie beinhalten die Ansäuerung der zu phagozytierenden Vakuole nach lysosomaler Verschmelzung. Die Lysosome enthalten dabei verschiedene Enzyme und Metabolite, wie z. B. saure Hydrolasen, Lysozyme, Komplementkomponenten und Immunglobuline (Lasser 1983). Als Antwort auf mikrobielle Stimuli setzen Makrophagen proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie TNF-α, IL-1β, IL-12, CXCL (CXC Motiv-Chemokin)-10 und CCL (CC-Chemokin-Ligand)-2 frei, die weitere Immunzellen aus dem Blutstrom rekrutieren können (Biswas et al. 2012). Durch die an der Oberfläche befindlichen MHC (*major histocompatibility complex*)-II-Moleküle können Makrophagen des Weiteren als Antigenpräsentierende Zellen agieren und auf diese Weise Zellen der erworbenen Immunabwehr aktivieren (Weiskopf et al. 2009). Neben ihrer immunologischen Funktion sind sie zudem an der Gewebshomöostase beteiligt. Sie beseitigen abgestorbene oder gealterte Zellen sowie toxines Material (Murray und Wynn 2011) und tragen zur Behebung von Gewebsschaden und zum Gewebsumbau bei, indem sie verschiedene Faktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), CSF (*colony stimulating factor*)-1, IL-8, MMP (*matrix metallopeptidase*)-9 und Polyamine bilden, die wiederum die Angiogenese, Lymphangiogenese und Fibrose fördern können (Biswas und Mantovani 2010, Ji 2012).

Phagozytische Zellen können in polymorphonukleäre (Granulozyten) und mononukleäre Phagozyten kategorisiert werden (van Furth et al. 1972). Makrophagen, die zu den mononukleären Phagozyten gehören, differenzieren sich aus zirkulierenden peripheren mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), die sowohl bei Entzündung als auch im stabilen Zustand in Gewebe migrieren können (Gordon und Taylor 2005). Die PBMCs entwickeln sich aus myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark, die gleichzeitig Vorläufer von mehreren Zelltypen darstellen, einschließlich neutrophile-, eosinophile- und basophile Granulozyten, Makrophagen, dentritische Zellen und Mastzellen. Über Monoblasten und Promonozyten entstehen schließlich Monozyten, die aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf ausgeschüttet werden und sich nach Einwanderung ins Gewebe in gewebsspezifische Makrophagen von Knochen (Osteoklasten), Alveolen, ZNS (Mikroglia), Bindegewebe (Histiozyten), Gastrointestinaltrakt, Leber (Kupffer-Sternzellen), Milz und Peritoneum umwandeln können (Gordon und Taylor 2005).

Die Monozyten-Makrophagen-Zelllinie stellt eine heterogene Population dar. Diese Heterogenität spiegelt sich nicht nur in ihrer Funktion, sondern schon in ihrem Ursprung wider. Geissmann und Kollegen zeigten auf, dass sowohl murine als auch humane Monozyten anhand ihrer Chemokin-Rezeptor-Expression in zwei Subtypen unterschieden werden können. Die erste Untergruppe der murinen Monozyten bildet vermehrt CCR (CC-Chemokin-Rezeptor)-2 aus, besitzt eine kurze Halbwertszeit und kommt besonders an Entzündungsorten vor. Da sie aktiv in das entzündete Gewebe migrieren und die Immunantwort triggern können, werden CCR2-positive Monozyten auch als "inflammatorische Monozyten" bezeichnet. Die zweite Untergruppe ist durch hohe Expression von CX₃CR (CX₃-Chemokin-Rezeptor)-1 und niedrige Levels an inflammatorischen Chemokin-Rezeptoren (CCR1 und CCR2) charakterisiert. Diese langlebigen Zellen, auch bekannt als "residente Monozyten", werden besonders in nicht-entzündetem Gewebe vorgefunden und fungieren wahrscheinlich als Vorläufer für die residenten Gewebsmakrophagen. Anhand der CX₃CR1-Ausprägung und der Oberflächenmarker konnten auch im Menschen zwei Hauptgruppen definiert werden: CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten, die oft auch "klassische Monozyten" genannt werden, und CD14⁺CD16⁺ Monozyten, die reifen Gewebsmakrophagen ähneln. Sie zeigen in ihrem Phänotyp und Vorkommen ähnliche Charakteristika wie die murinen Subtypen auf (Geissmann et al. 2003). Des Weiteren bestehen Hinweise, dass residente Gewebsmakrophagen zum Teil von primitiven Makrophagen abstammen, die sich aus dem embryonalen Dottersack entwickelt haben. Es wird angenommen, dass sie als fetale Makrophagen in das Gewebe eingewandert sind und nach der Geburt in loco verbleiben (Naito 1993). Weiterhin können residente Gewebsmakrophagen die Fähigkeit besitzen, zu proliferieren und ihren Bestand als Population durch Selbsterneuerung aufrecht zu halten (Naito 1993, Mosser und Edwards 2008). Ein gutes Beispiel für die Fähigkeit zur lokalen Proliferation sind die Mikrogliazellen des ZNS (Ajami et al. 2007).

Als Reaktion auf Zytokine und bakterielle Produkte können basierend auf der Th1/Th2-Nomenklatur von CD4-positiven T-Lymphozyten klassisch aktivierte (M1-Makrophagen) und alternativ aktivierte Makrophagen (M2-Makrophagen) unterschieden werden (Gordon und Martinez 2010, Mantovani et al. 2002). Die klassische Aktivierung kann entweder allein durch das Glykoprotein Interferon- γ (IFN- γ), das insbesondere durch Typ 1 T-Helferzellen und NK-Zellen gebildet wird, oder in Kombination mit Bakterienbestandteilen wie Lipopolysaccharide (LPS) oder durch Zytokine (z. B. TNF-α) ausgelöst werden (Mantovani et al. 2005). M1-Zellen sezernieren vermehrt entzündungsfördernde Zytokine wie IL-1β, TNF-α, IL-6 und bilden Sauerstoff- und Stickstoffradikale, die u. a. zum direkten Abtöten von Bakterien, Protozoen, Viren und Tumorzellen dienen (Mantovani et al. 2005, Murray und Wynn 2011). Die Differenzierung in den M2-Subtyp kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Die über Th2 freigesetzten Zytokine IL-4 und IL-13 bewirken, dass Makrophagen zur Wundheilung beitragen können (Mantovani et al. 2005). Des Weiteren können alternativ aktivierte Makrophagen an der Einkapselung und Eliminierung von Parasiten beteiligt sein (Noel et al. 2004), als Tumor-assoziierte Makrophagen die Tumorprogression fördern und über immunregulatorische Funktionen verfügen (Mantovani et al. 2004). Der immunsuppressive Phänotyp der M2-Makrophagen kann z. B. durch IL-10, Glukokortikoide, apoptische Zellen oder Immunkomplexe induziert werden (Biswas und Mantovani 2010). Anhand verschiedener Studien konnte eine Flexibilität in den Prozessabläufen der Makrophagen festgestellt werden. So können sie abhängig von den Signalen aus ihren verschiedenen Mikromilieus von einem funktionellen Phänotyp in den anderen wechseln (Kawanishi et al. 2010, Mylonas et al. 2009, Stout et al. 2005, Stout und Suttles 2004).

1.5 Mikrogliazellen

Im ZNS befinden sich drei Hauptzelltypen: Neuronen, Gliazellen und vaskuläre Zellen (Ransohoff und Cardona 2010). Die erstmals von dem spanischen Mediziner und Neuroanatomen Del Rio Hortega (1932) entdeckten Mikrogliazellen (Stoll und Jander 1999) stellen eine Zellart des ZNS-Parenchyms dar, bei der es sich weder um neuronale noch vaskuläre Zellen handelt (Ransohoff und Cardona 2010). Vielmehr stellen diese Zellen die residenten inflammatorischen Zellen des ZNS dar. Besonders bedeutungsvoll erscheint ihre Zugehörigkeit sowohl zu den Gliazellen als auch zu den mononukleären Phagozyten (Ransohoff und Cardona 2010).

Mikrogliazellen stellen etwa 16 % der Zellpopulation im menschlichen ZNS dar und zeigen dabei eine starke Variation abhängig von der Gehirnregion (Norden und Godbout 2013). So treten sie im menschlichen Gehirn in einer höheren Dichte in der weißen als in der grauen Substanz auf (Mittelbronn et al. 2001). In der grauen Substanz liegen sie direkt in der Nähe zu Neuronen und in der weißen Substanz zwischen den Nervensträngen (Lawson et al. 1990). Da die BHS als immunologische Barriere unter physiologischen Bedingungen für Antikörper und Leukozyten kaum durchlässig ist, nehmen die Mikrogliazellen als einzigartige Untergruppe von Gehirn-residenten Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr des ZNS ein (Davoust et al. 2008, Kreutzberg 1996). Basierend auf Studien unter physiologischen und pathologischen Bedingungen konnten drei wichtige Differenzierungszustände der parenchymalen Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Benveniste 1997). Sie können wie die Makrophagen einen ruhenden und aktivierten Zustand einnehmen. Mikroglia in einem gesunden reifen ZNS weisen eine verzweigte Morphologie mit einem kleinen Soma und feinen zellulären Fortsätzen auf (Kettenmann et al. 2011). Diese Eigenschaften werden mit dem ruhenden Zustand der Mikrogliazellen (auch im Englischen bezeichnet als resting/ramified microg*lia*) verbunden (Kettenmann et al. 2011). Das heißt nicht, dass diese Zellen inaktiv sind: Sie

induzieren apoptotische Prozesse in spezifischen Subpopulationen unreifer Neurone (Marín-Teva et al. 2004), kontrollieren die Synaptogenese (Roumier et al. 2004), bilden neurotrophe Faktoren (Elkabes et al. 1996) und sind an der Regulierung synaptischer Übertragungen beteiligt (Coull et al. 2005). Mit ihren freibeweglichen Fortsätzen sind sie zudem in der Lage, kontinuierlich ihr lokales Umfeld zu überwachen und schnell auf Störfaktoren zu antworten (Davalos et al. 2005, Nimmerjahn et al. 2005). Nach Stimulation, z. B. bei Vorliegen einer Infektion oder eines Traumas, gehen die Mikrogliazellen in einen aktiven Zustand über. Sie erscheinen dabei wie geschwollene, ramifizierte Mikrogliazellen und lassen sich anhand eines größeren Zellkörpers und kleinerer, breiterer Fortsätze von diesen gut abgrenzen (Graeber et al. 1988, Streit und Kreutzberg 1987). Bleibt der Reiz erhalten, nehmen sie einen amöben Makrophagen-ähnlichen Phänotyp mit einer ovalen bis stabförmigen, fortsatzlosen Morphologie an (Tambuyzer et al. 2009, Thomas 1992). Als dann sogenannte reaktive Mikrogliazellen besitzen sie über die ausreichende Ausprägung des Komplement-Rezeptor 3 und der MHC-Klassen I und II die Fähigkeit, als professionelle Phagozyten zu agieren (Tambuyzer et al. 2009, Davis et al. 1994). Angelockt durch endogene und exogene chemotaktische Faktoren können sie zu entzündeten oder geschädigten Arealen im ZNS übersiedeln und zusätzlich durch Proliferation eine angemessene Zellzahl erreichen (Hanisch 2002, Häusler et al. 2002, van Rossum und Hanisch 2004). Unter inflammatorischen Bedingungen üben reaktive Mikrogliazellen wie alle residenten Gewebsmakrophagen Phagozytose (Bauer et al. 1994), Antigenpräsentation (Perry 1998) und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. IL-6, IL-1 und TNF-α (Banati et al. 1993) aus. Abhängig von der Spezies produzieren sie verschiedene Arten von freien Radikalen, um effektiv ingestierte Antigene, abgestorbene Zellen und Zelltrümmer abzubauen (Tambuyzer et al. 2009). Während Mikrogliazellen von Schweinen und Menschen hauptsächlich Superoxid-Radikale bilden, setzen murine Mikrogliazellen eher NO frei (Hu et al. 1996). Neben ihrer Funktion in der Immunabwehr spielen sie gleichzeitig eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und Narbenbildung und reinigen extrazelluläre Flüssigkeiten (Thomas 1992).

Wie bereits im Kapitel 1.3 erwähnt, umfasst das ZNS neben den parenchymalen Mikrogliazellen auch eine heterogene Population von Makrophagen bestehend aus perivaskulären, meningealen, zirkumventrikulären und Plexus choroideus-Makrophagen (Davoust et al. 2008, Ransohoff und Perry 2009), die die Immunabwehr außerhalb des ZNS-Parenchyms absichern. Es wird davon ausgegangen, dass sie in ihrem Umfeld an der Überwachung und Entfernung von Partikeln oder Pathogenen beteiligt sind (Boche et al. 2013). Beispielsweise ließ sich nachweisen, dass perivaskuläre und leptomeningeale Makrophagen eine wichtige Rolle in der Beseitigung von Blutabbauprodukten nach einem subarachnoidalen hämorrhagischen Prozess spielen (Galea et al. 2012).

Eines der umstrittensten Themen in der Glia-Forschung stellt der Ursprung der Mikrogliazellen dar (Kaur et al. 2001, Theele und Streit 1993, Cuadros und Navascues 1998). Es wird inzwischen davon ausgegangen, dass in Ratten und Menschen Mikrogliazellen aus zwei verschiedenen Pools von myeloiden Zellen entstehen, die sukzessiv in das sich entwickelnde Gehirn einwandern (Davoust et al. 2008). Der erste Pool von Mikroglia-Vorläuferzellen kolonisiert das embryonale und fetale ZNS und weist hauptsächlich einen extramedullären, hämatopoetischen Herkunftsort auf, einschließlich des Dottersacks (Rezaie und Male 1999, Kaur et al. 2001). Der zweite Pool von Vorläufern der Mikrogliazellen bildet sich aus Knochenmarkabstammenden Monozyten, die das ZNS bei Ratten während der frühen postnatalen Periode und bei Menschen vor der Geburt besiedeln (Rezaie und Male 1999, Kaur et al. 2001, Cuadros und Navascues 1998). Im reifen Gehirn liegen Mikrogliazellen als relativ stabile Population im ZNS vor (Norden und Godbout 2013). Die Erhaltung dieser ortsständigen Population wird überwiegend durch Proliferation gewährleistet (Vilhardt 2005). Es liegen jedoch Hinweise vor, dass parenchymale Mikrogliazellen auch langsam und in begrenzter Form durch Monozyten, deren Ursprung im Knochenmark liegt, ersetzt werden (Carson et al. 2006, Davoust et al. 2008). In Mäusen konnte eine Untergruppe von zirkulierenden Monozyten mit dem Phänotyp CCR2⁻CX₃CR1^{high}Ly6C⁻ (siehe auch Kapitel 1.4) nachgewiesen werden, die wahrscheinlich vorzugsweise dem Ersatz residenter Gewebsmakrophagen dient (Gordon und Taylor 2005). Unter pathologischen Bedingungen kann sowohl die intrinsische Proliferation der parenchymalen Mikrogliazellen als auch die Rekrutierung von Monozyten gesteigert werden (Flugel et al. 2001, Ladeby et al. 2005, Djukic et al. 2006, Ajami et al. 2007).

Eine kontinuierliche und schnelle Zellauffrischung zeigt sich wiederum bei perivaskulären und meningealen Makrophagen, die alle 3-4 Wochen durch zirkulierende aus dem Knochenmark hervorgegangene Monozyten ausgetauscht werden (Bechmann et al. 2001, Hickey und Kimura 1988). Da im Menschen der Umsatz der ramifizierten Mikrogliazellen noch langsamer als bei den Mäusen erscheint und sie somit jahrzehntelang im ZNS verharren können, nehmen die Altersveränderungen dieser Population eine wichtige Rolle ein. Insbesondere veränderte Schutzkapazitäten und verringerte Kontrollmechanismen stellen potentielle Gefahren für die Gesundheit im Alter dar (Streit 2006, Sierra et al. 2007). Mittels der Stimulation von TLR können verschiedene Aktivierungsprozesse der Mikrogliazellen ausgelöst und beeinflusst werden. Es gibt Belege, dass Mikrogliazellen neuroprotektive, aber auch neurotoxische Effekte haben können (Kim und de Vellis 2005, Block et al. 2007). Aktive Makrophagen und Mikrogliazellen produzieren reaktive Sauerstoff- und Stickstoffzwischenprodukte, die zwar hochtoxisch auf Mikroorganismen wirken, jedoch auch Schaden an benachbarten Geweben und aberrierende Entzündungsabläufe herbeiführen können (Nathan und Ding 2010). So können neurotoxische, proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 β , TNF- α und NO Neuronen, Oligodendrozyten, die insbesondere für die Myelinbildung zuständig sind, aber auch extrazelluläre Matrixstrukturen angreifen (Hanisch und Kettenmann 2007). Beispielhaft zeigte sich unter der Behandlung mit Agonisten von TLR1/2, 4 und 9, dass Mikrogliazellen in einen aktivierten Zustand versetzt werden und vermehrt Bakterien phagozytieren konnten (Ebert et al. 2005, Ribes et al. 2010). Im Gegensatz zu dieser Schutzfunktion ließ sich jedoch auch nachweisen, dass die Stimulation von Mikrogliazellen via TLR9 und die damit verbundene Ausschüttung von NO und TNF-α einen Neuronenschaden in Kokulturen mit Neuronen hervorrufen kann (Iliev et al. 2004). Eine Schädigung der Neurone ließ sich auch nach Verwendung des TLR2-Agonisten Pam₃CSK₄ und des TLR4-Agonisten LPS in Neuron/Mikroglia-Kokulturen nachweisen (Schütze et al. 2012).

1.6 Ziele der Arbeit

Im Vergleich zu jüngeren Altersgruppen treten Infektionen bei alten Menschen häufiger auf und verlaufen oft schwerer und komplizierter. In Anbetracht der zunehmenden Alterung der Weltbevölkerung werden altersassoziierte Infektionskrankheiten ansteigen und im klinischen Alltag eine zunehmend wichtige Rolle spielen.

Insbesondere bakterielle Infektionen des ZNS weisen mit zunehmendem Alter eine erhöhte Inzidenz und einen schlechteren klinischen Ausgang im Vergleich zu jüngeren Patienten auf. Eine Ursache der erhöhten Anfälligkeit für Infektionen im hohen Alter stellt unter anderem die Alterung des Immunsystems dar. Mikrogliazellen und Makrophagen der Meningen, des Plexus choroideus, der perivaskulären und zirkumventrikulären Bereiche spielen als Bestandteile des innaten Immunsystems eine entscheidende Rolle in der Gewährleistung der Immunabwehr des ZNS. Diese Arbeit stützt sich auf die Hypothese, dass die erhöhte Inzidenz und die erhöhte Schwere von bakteriellen ZNS-Infektionen im Alter zum Teil auf altersbedingte Veränderungen in den Funktionen von Mikrogliazellen und Makrophagen zurückzuführen sind.

Zur Erhebung der Daten werden Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen von jungen (2 Monate) und alten (18 Monate) Mäusen gewonnen und kultiviert. Hauptziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von Unterschieden zwischen jungen und alten Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen bezüglich ihrer Phagozytoseleistung und ihrer Fähigkeit, NO sowie Zytokine und Chemokine freizusetzen. Zudem soll lichtmikroskopisch überprüft werden, ob in nicht-aktiviertem und aktiviertem Zustand altersbedingte Unterschiede in der Morphologie zwischen jungen und alten Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen nachzuweisen sind.

Mit einem erweiterten Wissen, welchen Einfluss das Alter auf die Funktionen dieser innaten Immunzellen ausübt, könnten neue Strategien für die Prävention und Therapie von bakteriellen ZNS-Infektionen im Alter entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte Autoklav Systec (Wettenberg, D) Bunsenbrenner Schütt (Göttingen, D) Eismaschine Scotsman-Enodis (Sprockhövel, D) **ELISA-Reader** Bio-Rad (München, D) Inkubator Heraeus (Hannover, D) Kaltlichtlampe Schott (Mainz, D) Mikroskop (biokulares) Olympus (Hamburg, D) Motor-Pipettierhelfer Brand (Wertheim, D) Neubauer Zählkammer Schütt (Göttingen, D) Ofen Heraeus (Hannover, D) Reagenzglasschüttler-Reax Top® Heidolph (Schwabach, D) Schüttelplatte "rotomix" Zeipel (Bovenden, D) Sterilbank-Laminair® Heraeus (Hannover, D) Wasserbad GFL (Burgwedel, D) Zentrifuge Heraeus (Hannover, D)

2.1.2 Verbrauchsmaterial und spezielles Material

10 ml-Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
24-, 96-Well-Gewebekulturplatten	Greiner (Frickenhausen, D)
Blutagar-Platten	Institut für Mikrobiologie (Göttingen, D)
Eppendorf-Cups	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Gewebekulturflaschen	Greiner (Frickenhausen, D)
13 mm-Glasplättchen/Coverslips	Menzel (Braunschweig, D)
Deckgläser (24 x 32 mm)	Menzel (Braunschweig, D)

Indicator-tape	3M (Minnesota, USA)
Objektträger	Menzel (Braunschweig, D)
Parafilm	American National Can (Menasha, USA)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen, D)
Pinzetten	Rettberg (Göttingen, D)
Schraubenbecher (100 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Skalpell	Dahlhausen (Köln, D)
Tips	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zellsieb (40 µm)	VWR (Darmstadt, D)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Aqua, destilliert	Braun (Melsungen, D)
Avidin	Vector (Burlingame, Ca)
Biotin	Vector (Burlingame, Ca)
bovines Serumalbumin (BSA)	Serva (Heidelberg, D)
Clodronat	Merck (Darmstadt, D)
CpG (Oligodesoxynukleotide)	TIB Molbiol (Berlin, D)
Desoxyribonuklease I	Worthington (Lakewood, USA)
DePeX	Merck (Darmstadt, D)
Diaminobenzidin	Roche (Mannheim, D)
Diethylether	Roth (Karlsruhe, D)
DMEM	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, D)
Endotoxin (LPS)	Sigma (Taufkirchen, D)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
FCS	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, D)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt, D)
Gentamycin	Sigma (Steinheim, D)
Hämalaun	Merck (Darmstadt, D)

Hank's Salt Solution	Biochrom (Berlin, D)
Interferon-γ	Sigma (Steinheim, D)
Isolectin-B4	Sigma (Steinheim, D)
Natriumchlorid	Diaco (Triesk, I)
Natrium-Nitrit	Merck (Darmstadt, D)
N-Naphtyl-Ethylendiamin	Sigma (Deisenhofen, D)
PBS	Biochrom (Berlin, D)
Penicillin/Streptomycin	Sigma (Deisenhofen, D)
Schwefelsäure	Merck (Darmstadt, D)
Streptavidin-Peroxidase-Komplex	Vector (Burlingame, Ca)
Sucrose	Merck (Darmstadt, D)
Sulfonamid	Sigma (Deisenhofen, D)
Tetramethylbenzidin (TMB)	Roth (Karlsruhe, D)
Tripalmitoyl-S-glyceryl-cysteine (Pam ₃ CSK ₄)	EMC Microcollections (Tübingen, D)
Triton X-100	Sigma (Steinheim, D)
Trypan-Blau	Sigma (Deisenhofen, D)
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma (Deisenhofen, D)
Tween-20	Roth (Karlsruhe, D)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt, D)
WST 1-Reagenz	Roche (Mannheim, D)

2.1.4 Mäuse

Die C57BL/6-Mäuse (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einheit der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen untergebracht, gezüchtet und verpflegt. Für die Gewinnung des Astrozytenrasens wurden maximal 2 Tage alte C57BL/6-Mäuse verwendet. Zum Anlegen der Mikroglia- und Makrophagen-Zellkultur wurden C57BL/6-Mäuse im Alter von 2 und 18 Monaten präpariert. Die Tötung der Mäuse wurde den Tierschutzbeauftragten der Fakultät und dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit gemeldet.

2.1.5 Escherichia coli (E. coli) K1

Ein von einem Kind mit Meningitis isolierter bekapselter pathogener *E. coli* K1-Stamm (Dr. G. Zysk, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Düsseldorf) wurde in Dulbecco`s Minimal Essential Medium (DMEM) mit 10 % Hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) vermehrt, gewaschen und bei -80 °C eingefroren (Spreer et al. 2006).

2.1.6 Medien, Lösungen und Antikörper

2.1.6.1 Zellkultur

Zellkultur-Medium

Das DMEM wurde mit 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin unter sterilen Bedingungen vermischt und vor Benutzung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Lagerung des Mediums erfolgte bei 4 °C. Für den Phagozytose-Assay wurde Zellkultur-Medium ohne Penicillin/Streptomycin verwendet.

PBS (phosphate buffered saline)-Lösung

Zum Herstellen dieser Lösung wurden 9,55 g PBS-Pulver (Biochrom, Berlin, D) in 1 l doppelt destilliertem Wasser auf einem Magnetrührer gelöst. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

Trypsin-Lösung

Trypsin/EDTA-Lösung (0,5%/0,2% w/v), in 10 x PBS gelöst, wurde weiter in einem Verhältnis von 1:10 mit doppelt destilliertem Aqua verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Desoxyribonuklease (DNAse)-I-Lösung

Zum Herstellen dieser Lösung wurden 100 mg Desoxyribonuklease I in 20 ml Hank's Salt Solution gelöst (entspricht einer Konzentration von 5 mg/l). Anschließend wurden die Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Clodronat-Stocklösung

10 mg Clodronat-Pulver wurde in 10 ml DMEM aufgelöst und anschließend in Eppendorf-Cups (je 1 mg/ml) bei -20 °C gelagert.

WST (water soluble tetrazolium)-Mischung

Für den Zellvitalitäts-Test wurde das WST-1-Zell-Proliferation-Reagenz in einem Verhältnis von 1:10 mit Zellkultur-Medium (siehe oben) verdünnt.

Gentamicin-Lösung

Die Antibiotikalösung wurde für den Phagozytose-Assay in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 mit Gentamicin und Phagozytose-Medium (siehe oben) angefertigt.

Griess-Lösung

Für die Griess`sche Reaktion wurden eine 1 % Lösung von Sulfonamid in 30 % Essigsäure und eine 0,1 % Lösung von N-(1-naphthyl)ethylenediamin in 60 % Essigsäure zu gleichen Teilen vermischt.

2.1.6.2 ELISA

Wasch-Puffer

Der Wasch-Puffer besteht aus 0,5 g Tween-20 und 1 l PBS (siehe oben).

Reagent-Diluent 1

Der Reagent-Diluent setzt sich zusammen aus 1 g bovines Serumalbumin (BSA) und 100 ml PBS.

HRP (horseradish peroxidase)-Diluent

Für die Herstellung des HRP-Diluentes wurden 40 ml Wasch-Puffer (siehe oben), 40 mg BSA und 1 µl Streptavidin-HRP-Konjugat verwendet. Anschließend wurde die Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Stopplösung

Die Stopplösung besteht aus 1 N Schwefelsäure.

Antikörper

TNF-α-Konzentrationen wurden mittels Antikörper der Firma BioLegend (Biozol, München, D) bestimmt und für die Messung von IL-6 und KC verwendeten wir DuoSet ELISA Development Kits der Firma R & D Systems (Wiesbaden, D).

2.2 Primäre murine Peritonealmakrophagen-Kultur

Peritonealmakrophagen wurden von C57Bl/6-Mäusen im Alter von 2 und 18 Monaten präpariert. An einem Präparationstag wurden Makrophagen und Mikrogliazellen je einer jungen und einer alten Maus gewonnen. Zunächst wurde die jeweilige Maus mit Diethylether narkotisiert und anschließend mit einem Genickbruch getötet. Zum späteren Anlegen einer murinen Mikroglia-Kultur wurde der Kopf der Maus mit einer Schere abgetrennt und auf Eis bis zur Präparation des Gehirnes, die anschließend nach der Makrophagenpräparation durchgeführt wurde, aufbewahrt. Für die Makrophagenpräparation musste die Maus zunächst am Arbeitsplatz mit kleinen Nadeln fixiert und das Bauchfell mit 70 % Ethanol desinfiziert werden. Das Präparierbesteck wurde unter sterilen Bedingungen gehalten und vor jeder Nutzung in einem mit 70 % Ethanol gefüllten Becher eingetaucht und mit sterilem PBS (siehe 2.1.6.1) gespült. Der erste Schritt bestand darin, mit einer spitzen Pinzette das Bauchfell vom Peritoneum abzuheben und mit einer scharfen kleinen Schere Stück für Stück zu entfernen. Dies wurde ausgeführt, bis der größte Teil des Peritoneums freilag. Dann wurde mit einer spitzen Pinzette ein kleiner Teil des Peritoneums fixiert und vorsichtig ein kleines Loch gesetzt. Wichtig war darauf zu achten, möglichst eine Peritoneumstelle ohne Blutgefäße zu wählen, um Verunreinigungen durch Blut zu verhindern.

Diese Öffnung wurde nun dafür genutzt, je 1 ml sterile PBS-Lösung mittels einer 1 ml-Pipette in den Bauchraum zu überführen. Um die PBS-Lösung im Bauchraum gut zu verteilen, war es notwendig, von außen den Bauch der Maus vorsichtig zu massieren. Anschließend wurde mit einer 1 ml-Pipette versucht, so viel wie möglich von der PBS-Lösung wieder aus dem Bauchraum abzusaugen und in einem 15 ml-Röhrchen aufzubewahren. Dieser Vorgang wurde sechsmal wiederholt bis ca. 6 ml Zellsuspension in dem Röhrchen gesammelt waren.

Um die gewonnenen Makrophagen von der PBS-Lösung zu trennen, erfolgte die Zentrifugation der Suspension mit 1000 x g bei 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 3 ml Zellkultur-Medium (siehe 2.1.6.1) resuspendiert. Für die Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der vorher gut gemischten zellhaltigen Suspension entnommen und mit 90 µl Trypan-Blau vermischt. Unter einem Mikroskop wurde dann die Zellkonzentration durch Auszählen der Makrophagen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die gewünschte Endkonzentration wurde auf 500.000 Zellen/ml festgelegt. Zur Verdünnung wurde Zellkultur-Medium verwendet. Anschließend wurde die zellhaltige Flüssigkeit in 96-WellZellkulturplatten ausgesät (100 µl pro Well, entsprechend 50.000 Zellen pro Well). Die Zellkulturplatten wurden in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) aufbewahrt. Zwei Stunden nach der Präparation erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel mit dem Zellkultur-Medium. Abhängig von der Verunreinigung mit Blutzellen wurde ein zweiter Mediumwechsel am selben Tag durchgeführt. Nach jeder Präparationsarbeit wurde das Besteck in einem Ofen bei 200 °C für zwei Stunden sterilisiert und die Kadaver vorschriftsmäßig entsorgt.

2.3 Primäre murine Mikroglia-Kultur aus adulten Mäusen

2.3.1 Anlegen eines Astrozytenrasens aus Gehirnen neugeborener Mäuse

Für die Gewinnung des Astrozytenrasens wurden neugeborene Mäuse vom Typ C57BL/6 verwendet, die maximal zwei Tage alt waren (Ebert et al. 2005). Die Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das Besteck wurde vor jeder Benutzung mit 70 % Ethanol desinfiziert und in sterile PBS-Lösung eingetaucht. Zunächst wurden die Köpfe aller Mäuse mit einer scharfen Schere abgetrennt, kurz mit 70 % Ethanol besprüht und auf Eis in einer Petrischale gesammelt. Dann wurden hintereinander die Gehirne freipräpariert. Dafür musste der Kopf mit einer spitzen Pinzette fixiert und mit einer leicht hakigen Pinzette die Kopfhaut abgezogen werden. Anschließend wurde die noch weiche Schädelkalotte entfernt und das Gehirn vorsichtig entnommen. Alle gewonnenen Gehirne wurden in einer mit PBS gefüllten Petrischale auf Eis aufbewahrt. Bevor die Meningen und Blutgefäße unter einem Mikroskop entfernt wurden, wurde jedes Gehirn in 4 Teile zerlegt: in Kleinhirn, Hirnstamm, linke und rechte Hemisphäre. Für die Präparation wurde jeder Gehirnteil einzeln in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt, mit einer leicht hakigen Pinzette fixiert und mithilfe einer sehr feinen spitzen Pinzette wurden die Hirnhäute und Blutgefäße abgezogen. Die fertig präparierten Gehirne erschienen als weißes, formloses Gewebe und zeigten keine rötlichen, strähnigen Strukturen mehr auf. Nachdem die Gehirnteile in einem mit PBS gefüllten Röhrchen gesammelt und mittels einer 1 ml-Pipette vorsichtig trituiert worden waren, erfolgte die Zentrifugation mit 900 x g bei einer Temperatur von 4 °C für 10 Minuten. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Gehirne mit Zellkultur-Medium (0,5 ml Medium pro Gehirn) resuspendiert und je 1 ml dieser Suspension auf die bereits mit je 11 ml Zellkultur-Medium gefüllten Kulturflaschen verteilt. Somit wurden zwei Gehirne in jede Kulturflasche gegeben. Beim Pipettieren war darauf zu achten, dass der Flaschenhals nicht berührt wurde, da dieser als unsteril zu betrachten ist. Die Zellkulturflaschen wurden anschließend leicht geschwenkt, um die Zellen auf der Wachstumsfläche zu verteilen, und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein vollständiger Mediumwechsel fand alle 2-4 Tage statt. Das Präparierbesteck wurde anschließend in einem Ofen bei 200 °C für zwei Stunden sterilisiert. Nach 10-14 Tagen hatte sich ein konfluenter Astrozytenrasen gebildet, der für die Anlage der Mikroglia-Kulturen junger und alter adulter Mäuse (siehe 2.3.2) verwendet werden konnte. Nachdem der Astrozytenrasen mikroskopisch dicht erschien, wurden nach Entfernen des Überstandes je 5 ml einer Clodronat-Zellkultur-Medium-Mischung (siehe 2.1.6.1) in die Kulturflaschen gegeben. Die Kulturflaschen wurden für drei Tage in einem Inkubator bei 37 °C und bei einer 5 % CO₂-Atmosphäre gelagert. Bei Clodronat handelt es sich um ein Bisphosphonat, das in der Lage ist, die Funktion von Mitochondrien einzuschränken und auf diese Weise eine Apoptose von proliferierenden Zellen herbeiführen kann. Bei dieser Methode führte Clodronat zum Absterben der neonatalen Mikrogliazellen, so dass nur noch der dichte Astrozytenrasen zurückblieb. Nach dreitägiger Einwirkzeit wurden die Zellkulturflaschen zweimal mit steriler PBS-Lösung gewaschen und anschließend wieder mit 12 ml Zellkultur-Medium aufgefüllt.

2.3.2 Anlegen von Mikroglia-Kulturen junger und alter adulter Mäuse

Die Kultivierung von Mikrogliazellen adulter Mäuse beruht auf einer Methode, die von Scheffel et al. etabliert wurde (Scheffel et al. 2012). Bevor mit der eigentlichen Mikrogliapräparation der jungen und alten adulten Mäuse begonnen werden konnte, mussten zunächst Zellkulturflaschen mit dichten Astrozytenrasen aus neugeborenen Mäusen angelegt werden (siehe 2.3.1). Insgesamt waren zwei Kulturflaschen mit Astrozytenrasen pro Gehirn einer adulten Maus notwendig. Für das Anlegen der adulten Mikroglia-Kulturen wurden die Gehirne der 2 und 18 Monate alten Mäuse, die vorher schon für die Makrophagenpräparation verwendet wurden, präpariert. Die Köpfe der Mäuse wurden jeweils vor der Makrophagenpräparation mithilfe einer Schere abgetrennt und nach kurzer Desinfektion mit 70 % Ethanol in einer Petrischale auf Eis aufbewahrt. Nach Fertigstellung der Makrophagenpräparation wurde dann jeweils unter sterilen Bedingungen die Präparation des Gehirnes begonnen. Um das Gehirn vorsichtig herauslösen zu können, mussten zunächst die Kopfhaut und die Schädelkalotte mithilfe einer kleinen Schere und Pinzetten entfernt werden. Danach wurde das Gehirn in 4 Teile zerlegt: in Kleinhirn, Hirnstamm, linke und rechte Hemisphäre. Die einzelnen Hirnteile wurden in einer mit Zellkultur-Medium gefüllten Petrischale auf Eis gelagert und anschließend wie bei den neugeborenen Mäusen unter einem Mikroskop sorgfältig von den Meningen und Blutgefäßen befreit. Dann wurden die von Meningen befreiten Hirnteile auf einer neuen Petrischale mit einem kleinen Skalpell zerkleinert und insgesamt dreimal in mit DMEM immer wieder neu gefüllten 50 ml-Röhrchen gewaschen. Nach dem dritten Waschvorgang wurde der Überstand entfernt und 200 µl Trypsinlösung (siehe 2.1.6.1) dazugegeben. Für die Trypsinverdauung wurde das Röhrchen für insgesamt 10 Minuten bei 37 °C in ein Wasserbad gestellt. Als Peptidase dient Trypsin der Spaltung von Proteinen und bewirkt, dass sich die Zellen vereinzeln. Es wurden bei dieser kurzen Einwirkzeit nur die extrazellulären Proteine entfernt, die Mikrogliazellen blieben intakt. Nachdem die Trypsinlösung mit einer 1 ml-Pipette gründlich abgesaugt wurde, wurde die Verdauungsreaktion mit 5 ml FCS-haltigem Medium gestoppt und das Gewebe trituiert. Für die Spaltung von DNA-Bestandteilen wurden anschließend 200 µl einer Desoxyribonuklease I-Lösung (siehe 2.1.6.1) dazu pipettiert. Als nächster Schritt wurde die Gewebesuspension mit 250 x g für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes in 12 ml Zellkultur-Medium resuspendiert. Das Zellhomogenat wurde anschließend über ein 40 µm-Zellsieb in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt und auf zwei mit 6 ml Zellkultur-Medium gefüllte Kulturflaschen mit konfluenten Astrozytenrasen verteilt. Ein vollständiger Mediumwechsel wurde zunächst täglich und später alle 2-3 Tage durchgeführt.

2.3.3 Gewinnung der adulten Mikrogliazellen

Nachdem die angelegten Mischkulturen regelmäßig mit neuem Zellkultur-Medium versorgt und auf Keimfreiheit überprüft worden waren, konnten die adulten Mikrogliazellen nach frühestens 14 Tagen Wachstum von dem Astrozytenrasen getrennt werden. Mithilfe eines Mikroskops wurden die Dichte der Mikrogliazellen, die Unversehrtheit des Astrozytenrasens und die Keimfreiheit beurteilt.

Zur Trennung der Mikrogliazellen vom Astrozytenrasen wurden die Kulturflaschen zunächst 200 x/min für 20-30 Minuten auf dem Schüttler geschwenkt und zusätzlich an den Flaschenseiten beklopft. Dann wurde das Medium von vier Kulturflaschen in einem 50 ml-Röhrchen gesammelt. Die Mikrogliazellen von alten und jungen Mäusen wurden immer getrennt voneinander gesammelt. Die Kulturflaschen wurden anschließend mit neuem Zellkultur-Medium versetzt und wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Währenddessen wurden die 50 ml-Röhrchen mit 250 x g für 10 Minuten bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer 10 ml-Pipette abgesaugt und das Pellet in 1-2 ml verbliebenen Überstand resuspendiert. Bei mehreren gewonnenen Röhrchen wurden die Bodensätze zusammengeführt. Dann wurden 10 μ l der zellhaltigen Flüssigkeit mit 90 μ l Trypan-Blau in einem Well vermischt und in der Neubauer-Zählkammer die Konzentration der Zellen bestimmt.

Die Mikrogliazellen wurden auf die gewünschte Endkonzentration von 500.000 Zellen/ml mit Zellkultur-Medium verdünnt. Danach wurde die zellhaltige Flüssigkeit auf einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät (100 μ l pro Well, entsprechend 50.000 Zellen pro Well) und anschließend in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 12 Stunden inkubiert.

2.4 Stimulation von Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen

Für die Stimulation der Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen wurden synthetisch hergestellte Agonisten der *Toll-like* Rezeptoren (TLR) verwendet, die Bakterienbestandteile nachahmen. Es handelte sich dabei um Tripalmitoyl-S-glyceryl-cysteine (Pam₃CSK₄; EMC Microcollections, Tübingen, Deutschland) als spezifischer Agonist von TLR2, Endotoxin (LPS von *E. coli* Serotype 026:B6; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) als Agonist von TLR4 und CpG Oligodesoxynukleotide (ODN) 1668 (TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT) von TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) als spezifischer Ligand von TLR9.

Die Stimulation der Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen erfolgte jeweils nach dem gleichen Schema. Nachdem die Zellen auf 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert wurden, konnte nach ca. 24 Stunden mit der Stimulation begonnen werden. Die Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der TLR-Agonisten in Anwesenheit mit IFN- γ (100 U/ml) für 24 Stunden stimuliert. Die Kontroll-Zellkultur wurde nur mit Zellkultur-Medium, angereichert mit 100 U/ml IFN- γ , inkubiert.

Die Überstände wurden auf eine neue 96-Well-Zellkulturplatte übertragen und bei -20 °C eingefroren. Die Zellkulturüberstände wurden für den NO-Assay (siehe 2.7) und für die Messungen der Zytokine und Chemokine verwendet (siehe 2.9). Mit den Zellen in den Wells der 96-Well-Zellkulturplatte wurden anschließend der Phagozytose-Assay (siehe 2.6) oder der WST-Test (2.8) durchgeführt. Zur Anfertigung der Färbungen wurden Zellkultur-Wells verwendet (siehe 2.5).

2.5 Färbung der Zellkulturen und Bewertung ihrer Dichte

Für die Färbung der Mikrogliazellen und Peritonealmakrophagen wurden Isolectin B4 und Hämalaun verwendet. Das biotinylierte Isolectin B4 stellt ein pflanzliches Zellmembranprotein der Schwarzbohne Griffonia simplicifolia dar, das wie ein Antikörper zum Einsatz kommt und die Makrophagen und Mikrogliazellen braun färbt. Hämalaun diente zur zusätzlichen blauen Färbung des Zellkernes. Die Zellen wurden vorher entweder direkt in einem Well einer 96-Well-Zellkulturplatte oder auf Coverslips in einer 24-Well-Zellkulturplatte mit 4 % Formaldehyd für 30 Minuten an Wellboden bzw. Coverslip fixiert und nach einmaliger Spülung mit PBS in 250 µl PBS aufbewahrt. Die Färbungsarbeit erfolgte bei Raumtemperatur.

Die in PBS aufbewahrten Zellen wurden zunächst für 30 Minuten in 0,1 % Triton, verdünnt in PBS, inkubiert und dann dreimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 3 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂), verdünnt in PBS, für 10 Minuten und anschließend ein erneuter dreimaliger Waschvorgang mit PBS. Dann wurden die Zellen für 30 Minuten in 10 % FCS in PBS eingelegt. Bis zu diesem Schritt konnte die Behandlung der Zellen in den Wells durchgeführt werden. Nachdem die Coverslips herausgenommen wurden, wurden sie mit 50 µl Isolectin B4 (Stammlösung 200 µg/ml), 1:40 verdünnt in PBS, bedeckt und nach 90 Minuten durch dreimaliges Eintauchen in PBS gewaschen. Dann wurden die Coverslips mit dem 30 Minuten vor Gebrauch nach Herstellerangaben angesetzten Avidin-Biotin-Komplex für 30-45 Minuten zusammengeführt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Coverslips für 15 Minuten in einer mit PBS gefüllten Petrischale eingelegt. Danach wurde die Farbentwicklung mit Diaminobenzidin für ca. 1-3 Minuten durchgeführt. Nach einer Spülung mit destilliertem Wasser erfolgte die dreiminütige Gegenfärbung mit Hämalaun (unverdünnte Herstellerlösung). Nach Entfernen der Hämalaunlösung wurden die Zellen unter Leitungswasser gewaschen und für ca. 15 Minuten zum Trocknen liegen gelassen. Zum Schluss wurde das Glasplättchen mithilfe von DePeX mit der zellbedeckten Seite zum Objektträger hin eigedeckelt. Diese Färbungsschritte waren auch ohne Coverslips durchführbar, wobei die Zellen dabei direkt am Wellboden angefärbt wurden.

Entscheidend für die Auswertung der Ergebnisse war, dass die Zellen der jungen und alten Maus gleich dicht ausgesät wurden. Die Zählung erfolgte mithilfe eines Mikroskops, wobei zur optimalen Beurteilung und Erkennen der Zellen eine 1:20 Vergrößerung verwendet wurde. Da bei dieser Vergrößerung nicht die Gesamtfläche des Wellbodens bzw. Coverslips darstellbar war, wurde ein Gesichtsfeld in der Mitte des Coverslips bzw. Wells der Zellkultur bei junger und alter Maus ausgewählt. Unter Mikroskop-Sicht wurden dann unter Verwendung eines Handzählers die Zellen gezählt.

2.6 Phagozytose-Assay

Der Phagozytose-Assay wurde entsprechend der Beschreibung von Ribes et al. 2009 durchgeführt. Für die Phagozytose wurden die vorher für maximal 24 Stunden mit unterschiedlichen TLR-Agonisten stimulierten Makrophagen bzw. Mikrogliazellen verwendet. Direkt nach der Abnahme des Überstandes wurde den jeweiligen Wells 250 µl sterile PBS-Lösung zugeführt, um die Zellen zu waschen. Für die Bakterienlösung wurde eine E.coli K1-Stocklösung (siehe 2.1.5), die vorher bei -80 °C gelagert wurde, aufgetaut und mit Phagozytose-Medium ohne Penicillin/Streptomycin (siehe 2.1.6.1) auf die gewünschte Zielkonzentration von 2 x 10^7 CFU/ml verdünnt. Nachdem aus den Wells vollständig die vorher zugegebene PBS-Lösung entfernt worden war, wurden 250 µl der Bakterienlösung pro Well hinzugegeben (5 x 10⁶ CFU/Well pro 5 x 10⁴ Zellen/Well, entspricht 100 x so viele Bakterien wie Zellen). Danach wurden die 96-Well-Zellkulturplatten für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. In dieser Zeit konnte die Bestimmung der Keimzahl im Inokulum vorbereitet werden. Es wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe in 0,9 % Natriumchlorid (NaCl)-Lösung mit insgesamt vier Verdünnungsstufen durchgeführt. Für das Ausplattieren wurden je 10 µl direkt von der Bakterienlösung und 10 µl von jeder Verdünnung auf eine Blutagar-Platte pipettiert und für ca. 20 Stunden bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Die Auswertung erfolgte zusammen mit den anderen Blutagar-Platten (siehe Ende dieses Kapitels).

Nach Verwerfen des Bakterienüberstandes wurden die an den Wellboden adhärierenden Zellen einmal mit steriler PBS-Lösung gewaschen, um möglichst viele nicht-phagozytierte Erreger zu entfernen. Um die weiterhin vorhandenen extrazellulären *E. coli*-Bakterien zu erfassen, wurde anschließend ein gegen diese Erreger wirkendes Antibiotikum, in dem Fall Gentamicin, verdünnt mit Zellkultur-Medium ohne Penicillin/Streptomycin, hinzugefügt (Endkonzentration 200 µg/ml). Gentamicin penetriert dabei nicht bzw. nur in einem geringen Umfang die Zellmembran der Zellen. Die Zellkulturplatten wurden für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem der Überstand wieder verworfen und die einzelnen Wells zweimal mit je 250 µl steriler PBS-Lösung gewaschen worden waren, wurden nun die Zellen mithilfe von 100 µl/Well destilliertem Aqua lysiert. Dabei war es wichtig, mit einer Pipette das Wasser in den einzelnen Wells kräftig zu mischen. Nach reihenweiser Lyse der am Wellboden befindlichen Zellen wurden die auf diese Weise freigesetzten phagozytierten Bakterien sequentiell verdünnt (1:10 Verdünnungen) und auf den vorher beschrifteten Blutagar-Platten ausplattiert. Für die Verdünnungen mussten vorher Cups mit je 90 µl 0,9 % NaCl-Lösung vorbereitet werden. Es wurde auf jeder Blutagar-Platte einmal direkt 50 µl und 10 µl des Lysats sowie vier Verdünnungsstufen aufgetragen. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C für mindestens 12 Stunden im Inkubator gelagert. Für die Auswertung wurde die Zahl der Koloniebildenden-Einheiten für jede Platte gezählt und die Keimkonzentration pro Well berechnet. Die keimbesetzten Blutagar-Platten wurden anschließend vorschriftsmäßig entsorgt.

2.7 NO-Assay

Die Aktivierung der Mikrogliazellen und Makrophagen nach Behandlung mit den TLR-Agonisten wurde unter anderem anhand der Freisetzung von NO quantifiziert. Unter Anwendung der sogenannten Griess-Reaktion wurde die Konzentration von Nitrit, einem stabilen Oxidationsprodukt von NO, in den Zellkulturüberständen bestimmt (Ebert et al. 2005). Nachdem je 50 μ l des Zellkulturüberstandes mit 50 μ l der vorher angefertigten Griess-Lösung (siehe 2.1.6.1) auf einer neuen Zellkulturplatte zusammengeführt worden war, konnte bei Vorhandensein von Nitrit eine Rosafärbung des Überstandes beobachtet werden. Nach einer Wartezeit von 5-10 Minuten wurden mittels eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 570 nm die Absorptionen der einzelnen Proben gemessen. Gleichzeitig wurde eine Doppelbestimmung einer vorher angelegten Natrium-Nitrit-Standardreihe (100- 50- 25- 12,5- 6,25-3,125- 1,56- 0 μ g/ml) durchgeführt, anhand derer die Nitrit-Konzentrationen der Proben bestimmt wurden.

2.8 WST-Zellvitalitätstest

Mithilfe des WST-1-Tests kann eine intakte Atmungskette von Zellen nachgewiesen werden. Vitale Zellen können mit einer intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase enzymatisch das dazugegebene Tetrazoliumsalz WST-1 umsetzen. Dabei erscheint ein Farbumschlag des vorher leicht rot gefärbten Tetrazoliumsalz in das dunkelrote Formazan.

Nach Entfernen der Zellkulturüberstände wurden in jedes Well 100 μ l der WST-Mischung (siehe 2.1.6.1) pipettiert und anschließend für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels eines ELISA-Readers bei 490 nm. Die Absorptionen korrelierten dabei direkt mit der Anzahl der metabolisch vitalen Zellen.
2.9 ELISAs

Für die Bestimmung der Zytokine TNF- α und IL-6 sowie des Chemokins KC (*keratinocyte chemoattractant*/CXCL1) wurde die sogenannte Sandwich-ELISA (*enzyme linked immuno-sorbent assay*)-Technik verwendet. Dabei werden zwei Antikörper eingesetzt, die sich beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen anheften können. Entscheidend dabei ist, dass sie sich an unterschiedlichen Epitopen des Antigens binden, um sich nicht gegenseitig zu hemmen. Der erste nach Vorschrift angesetzte und mit PBS verdünnte Capture-Antikörper wurde auf einer 96-Well-Zellkulturplatte aufgetragen (je 50 μ l pro Well) und die fertig beschichteten Platten über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit Wasch-Puffer (siehe 2.1.6.2) wurde durch Zugabe einer Blocklösung eine Absättigung der noch freien Bindungsstellen der Oberfläche erzielt. Zum Blocken wurde Re-

Absättigung der noch freien Bindungsstellen der Oberfläche erzielt. Zum Blocken wurde Reagent-Diluent 1 (siehe 2.1.6.2) verwendet. Nach Zugabe der Blocklösung erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation auf dem Schüttler. Nachdem die Kulturplatten erneut dreimal gewaschen worden waren, wurden die Proben und die jeweilige Standardreihe aufgetragen (je 50 μ l pro Well) und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die vorher über Nacht langsam aufgetauten Zellkulturüberstände (=Proben) wurden zunächst für die jeweilige Zytokin-/Chemokinmessung mit Reagent-Diluent 1 verdünnt. Die Probeverdünnungen beruhen dabei auf Ergebnissen aus Vorversuchen, z. B. für IL-6 und TNF- α 1:10, für KC 1:20. Der jeweilige Standard war im Kit enthalten und wurde ebenfalls mit Reagent-Diluent 1 verdünnt.

Während der Inkubationsphase banden nun die an der Platte adhärierenden Antikörper die Antigene, in diesem Fall die Zytokine/Chemokine. Die ungebundenen Bestandteile der Probe wurden durch einen erneuten Waschvorgang entfernt. Im weiteren Schritt wurde nun ein zweiter biotinylierter Antikörper zur Detektion (50 µl pro Well) dazugegeben. In der anschließenden zweistündigen Inkubationszeit band sich dieser an ein anderes Epitop des Antigens als der Capture-Antikörper. Es entstand der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Daher stammt auch die Bezeichnung "Sandwich-ELISA", da sich das Antigen wie bei einem Sandwich zwischen den beiden Antikörpern befindet. Durch erneutes dreimaliges Waschen wurde der überschüssige Detektionsantikörper entfernt. Im nächsten Schritt wurde dem Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex ein Enzymkonjugat (Meerrettichperoxidase, engl. *horseradish peroxidase*, HRP, siehe 2.1.6.2) zugeführt, das sich während einer 20-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur an den Sekundärantiköper anheftet. Nach dreimaligem Waschen wurden dann zum Schluss 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung pro Well hinzugefügt. TMB stellt ein passendes chromogenes Substrat für die Meerrettichperoxidase dar, die für dieses ELISA als Enzym diente. Das Enzym setzte dabei das Substrat zu einem Reaktionsprodukt um, dessen Nachweis durch einen Farbumschlag zu erkennen war. TMB bildet ein blaues Endprodukt. Wenn die ersten blauen Präzipitate im höchsten Standard (Extinktion im höchsten Standard sollte 1 sein) zu beobachten waren, wurde mit dem Reaktionsstopp begonnen. Dafür wurden 50 µl der Stopplösung (siehe 2.1.6.2) pro Well dazugegeben, was einen gelben Farbumschlag zur Folge hatte. Anschließend erfolgte die Messung der Zytokinextinktion mithilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten (Referenzfilter 540 nm). Gleichzeitig wurden die Absorptionen der Standardreihen vierfach gemessen, anhand derer die Zytokin-/Chemokinkonzentrationen der Proben bestimmt werden konnten.

2.10 Statistik

Die statistischen Auswertungen und graphischen Darstellungen wurden mithilfe der *Graph Pad Prism Software* 5.0 (San Diego, California, USA) erstellt. Parametrische Daten werden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt, nicht-parametrische Daten als Mediane mit 25./75. Perzentile. Für den Vergleich von zwei Gruppen parametrischer Daten wurde der *Student*`s *t*-Test verwendet. Zwei Gruppen nicht-parametrischer Daten wurden mittels des *Mann-Whitney U*-Test verglichen. Bei Durchführung mehrerer statistischer Signifikanztests an einem Datensatz wurde zur Fehlerkorrektur die Bonferroni-Methode angewendet. Bei Werten von p<0,05 wird von einem statistisch signifikanten Ergebnis gesprochen (*p<0,05; **p<0,01;***p<0,001).

3 Ergebnisse

3.1 Unterschiede zwischen Peritonealmakrophagen junger und alter Mäuse

Um die altersassoziierten Veränderungen der Funktionen von Makrophagen genauer beleuchten zu können, wurden peritoneale Makrophagen von jungen (2 Monate) und alten (18 Monate) Mäusen gewonnen und bezüglich ihrer Funktionen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschieden TLR-Agonisten miteinander verglichen. Die in unseren *in vitro*-Versuchen erfassten Makrophagenfunktionen beinhalteten die Fähigkeit, lebende *E. coli*-Bakterien zu phagozytieren, NO freizusetzen sowie die Zytokine TNF- α , IL-6 und das Chemokin KC auszuschütten. Die Wahl dieser Zytokine/Chemokine erfolgte, weil sie insbesondere während Entzündungsprozessen und Infektionen ausgeschüttet werden und bereits im Rahmen vorangegangener Studien untersucht wurden.

3.1.1 Anzahl peritonealer Makrophagen bei jungen und alten Mäusen

Die Anzahl der Makrophagen, die aus dem Peritonealraum gewonnen werden konnten, war bei den alten Mäusen signifikant höher als bei den jungen Mäusen [alt vs. jung: 158,80 x $10^5 \pm 105,00 \times 10^5$ Zellen (n=9) vs. 33,11 x $10^5 \pm 17,52 \times 10^5$ Zellen (n=9), p=0,003; Abbildung 1].



Abbildung 1: Zahl der gewonnenen peritonealen Makrophagen von jungen (n=9 Wells) und alten (n=9 Wells) Mäusen. Die Daten sind als Einzelwerte dargestellt und die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte; **: p<0,01; *Student`s t*-Test.

3.1.2 Morphologie junger und alter Peritonealmakrophagen in nichtaktiviertem und aktiviertem Zustand

Im Rahmen der *in vitro*-Untersuchungen der jungen und alten Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem und aktiviertem Zustand fertigten wir Isolectin B4-Färbungen an. Anhand der Abbildungen 2A-D zeigt sich, dass junge und alte Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand gleiche morphologische Eigenschaften aufweisen. Insbesondere in der 1:40-Vergrößerung lässt sich gut erkennen, dass sowohl die jungen (2C) als auch die alten (2D) nicht-aktivierten Peritonealmakrophagen einen schmalen Zellkörper aufweisen und längliche Zellausläufer ausbilden. Mittels der Stimulation mit den TLR-Agonisten LPS, Pam₃CSK₄ und CpG wurden die Peritonealmakrophagen in einen aktiviertem Zustand versetzt. Die Abbildungen 2E-H stellen beispielhaft die aktivierten jungen und alten Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit LPS dar. Sowohl bei den jungen (2E und -G) als auch bei den alten (2F und -H) Peritonealmakrophagen kommt es nach Aktivierung durch LPS zur Abrundung des Somas sowie zur Verkürzung bzw. Verlust der Zellausläufer.

Zusammenfassend lassen sich lichtmikroskopisch keine morphologischen Unterschiede zwischen jungen und alten Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem und aktiviertem Zustand nachweisen.

Ergänzend lässt sich anhand der Abbildungen 2A-D, die die ruhenden Peritonealmakrophagen ohne Zugabe von TLR-Agonisten darstellen, nachweisen, dass die Behandlung mit 100 U/ml IFN-γ die Zellen nicht in einen morphologisch aktivierten Zustand überführt.



Abbildung 2: Morphologie von Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand (junge Maus: A + C und alte Maus: B + D in 20-facher (A + B) bzw. 40-facher (C + D) Vergrößerung) und nach Stimulation mit 1 μ g/ml LPS (junge Maus: E + G und alte Maus: F + H in 20-facher (E + F) bzw. 40-facher (G + H) Vergrößerung) nach Färbung mit Isolectin B4 und Hämalaun.

3.1.3 Zellvitalität junger und alter Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von TLR-Agonisten

Sowohl für junge als auch für alte Peritonealmakrophagen konnte mithilfe des WST-1-Tests nachgewiesen werden, dass die maximal in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen der TLR-Agonisten keinen zytotoxischen Effekt auf diese Immunzellen hatten. Nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ fielen die Werte des WST-Tests für die jungen und alten Makrophagen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen nicht erniedrigt aus [junge Makrophagen: Kontrolle vs. Pam₃CSK₄ 1 μ g/ml: 0,62 \pm 0,22 (n=8) vs. 0,88 \pm 0,37 (n=8), p=0,12; alte Makrophagen: Kontrolle vs. Pam₃CSK₄ 1 μ g/ml: 0,35 \pm 0,05 (n=18) vs. 0,45 \pm 0,08 (n=18), p<0,0001; Abbildung 3A]. Auch nach Zugabe von LPS als Stimulans ließen sich keine Beeinträchtigungen der Zellvitalität bei jungen und alten Makrophagen nachweisen [junge Makrophagen: Kontrolle vs. LPS 1 μ g/ml: 1,19 \pm 0,53 (n=9) vs. 1,36 \pm 0,18 (n=9), p=0,39; alte Makrophagen: Kontrolle vs. LPS 1 μ g/ml: 0,78 \pm 0,54 (n=15) vs. 0,76 \pm 0,30 (n=12), p=0,92; Abbildung 3B]. Unter Verwendung des TLR-Agonisten CpG konnte weder bei den jungen noch bei den alten Makrophagen ein zytotoxischer Effekt festgestellt werden [junge Makrophagen: Kontrolle vs. CpG 10 μ g/ml: 1,22 \pm 0,48 (n=9) vs. 1,38 \pm 0,31 (n=10), p=0,41; alte Makrophagen: Kontrolle vs. CpG 10 μ g/ml: 0,68 \pm 0,53 (n=18) vs. 0,87 \pm 0,64 (n=18), p=0,35; Abbildung 3C].



Abbildung 3: Vitalität der jungen (n=8-10 Wells aus 3 unabhängigen Versuchen) und alten (n=12-18 Wells aus 3 unabhängigen Versuchen) Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit den maximal angewendeten Konzentrationen der TLR-Agonisten Pam₃CSK₄, LPS und CpG quantifiziert mithilfe des WST-Tests. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt; ***: p<0,001; *Student`s t*-Test.

3.1.4 Phagozytose von *E. coli* K1 durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Behandlung mit verschiedenen TLR-Agonisten

In nicht-aktiviertem Zustand phagozytierten Peritonealmakrophagen der alten Mäuse signifikant weniger E. coli K1 im Vergleich zu Peritonealmakrophagen der jungen Mäuse [Phagozytoseleistung alt vs. jung: $38,64 \pm 27,18 \%$ (n=9) vs. $100,00 \pm 30,51 \%$ (n=9), p=0,0004; Abbildung 4A]. Die Phagozytoseleistung der jungen Makrophagen in nicht-aktiviertem Zustand wurde bei den Versuchen als 100 % definiert. Auch nach Stimulation mit den verschiedenen TLR-Agonisten wurden altersassoziierte Einschränkungen in der Phagozytoseleistung nachgewiesen. So nahmen nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ alte Peritonealmakrophagen deutlich weniger *E.coli* K1 auf als junge Peritonealmakrophagen, ein signifikanter Unterschied zeigte sich nach Zugabe von 0,1 und 0,01 µg/ml Pam₃CSK₄ [Phagozytoseleistung alt vs. jung, $Pam_3CSK_4 1 \mu g/ml: 28,57 \pm 14,29 \%$ (n=3) vs. 278,60 ± 115,00 % (n=3), p=0.06; 0,1 $\mu g/ml:$ $43,33 \pm 26,34$ % (n=6) vs. 107,40 \pm 39,49 % (n=6), p=0,02; 0,01 µg/ml: 51,43 \pm 61,01 % (n=6) vs. 191,70 \pm 71,20 % (n=6), p=0.01; Abbildung 4B]. Auch nach Behandlung mit den LPS-Konzentrationen 1 und 0,01 µg/ml waren alte Makrophagen signifikant weniger in der Lage, E. coli K1 zu phagozytieren als junge Makrophagen [Phagozytoseleistung alt vs. jung, LPS 1 μ g/ml: 65,23 ± 45,44 % (n=9) vs. 217,70 ± 151,30 % (n=9), p=0,03; 0,01 μ g/ml: 56,20 \pm 36,35 % (n=9) vs. 209,50 \pm 125,50 % (n=9), p=0,008; 0,0001 µg/ml: 34,96 \pm 36,62 % (n=6) vs. $73,98 \pm 32,20 \%$ (n=6), p=0,24; Abbildung 4C]. Insbesondere nach Stimulation mit CpG ließen sich deutliche altersbedingte Veränderungen in der Phagozytoseleistung feststellen: Peritonealmakrophagen alter Mäuse phagozytierten eine signifikant geringere Menge an E. coli K1 als Peritonealmakrophagen junger Mäuse [Phagozytoseleistung alt vs. jung, CpG 10 μ g/ml: 108,40 ± 108,00 % (n=6) vs. 780,30 ± 405,20 % (n=6), p=0,008; 1 μ g/ml: 133,80 ± 105,60 % (n=9) vs. 616,30 \pm 350,50 % (n=9), p=0,003; 0,1 µg/ml: 40,50 \pm 18,89 % (n=9) vs. 234,90 ± 129,40 % (n=9), p=0,001; Abbildung 4D].



Abbildung 4: Phagozytose von *E. coli* K1 durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand (junge und alte Makrophagen: n=9 Wells aus 3 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄ (junge und alte Makrophagen: n=3-6 Wells aus 1-2 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge und alte Makrophagen: n=6-9 Wells aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge und alte Makrophagen: n=6-9 Wells aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Darstellungen zeigen die Daten als Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Phagozytoseleistung der jungen Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand wurde als 100 % definiert; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; *Student`s t-*Test; Bonferroni-Korrektur in B, C und D.

3.1.5 Freisetzung von NO durch Peritonealmakrophagen junger und alter Mäuse in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten

Die Quantifizierung der NO-Freisetzung durch Peritonealmakrophagen erfolgte anhand der Messung der Nitrit-Konzentration in den Zellkulturüberständen. In nicht-aktiviertem Zustand setzten alte Peritonealmakrophagen eine signifikant geringere Menge an NO frei als junge Peritonealmakrophagen [Nitrit-Konzentration alt vs. jung: 1,71 (1,66/2,66) µM (n=39) vs. 5,32 (3,59/8,67) µM (n=23), p<0,0001; Abbildung 5A]. Noch deutlichere Unterschiede ließen sich nach Stimulation mit den verschiedenen TLR-Agonisten zwischen jungen und alten Peritonealmakrophagen erkennen. Alte Makrophagen schütteten nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ signifikant weniger NO aus als junge Makrophagen [Nitrit-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 1 µg/ml: 5,04 (3,74/9,31) µM (n=18) vs. 19,73 (12,90/45,62) µM (n=8), p=0,0005; 0,1 µg/ml: 4,31 (3,71/9,99) µM (n=18) vs. 30,86 (10,04/53,99) µM (n=6), p=0,02; 0,01 µg/ml: 4,34 (3,19/6,50) µM (n=18) vs. 14,19 (11,72/37,61) µM (n=8), p=0,0005; 0,001 μg/ml: 2,58 (2,16/3,40) μM (n=18) vs. 10,48 (8,52/11,33) μM (n=6), p=0,003; 0,0001 μg/ml: 1,77 (1,66/2,05) µM (n=18) vs. 4,76 (3,06/5,86) µM (n=8), p=0,002; Abbildung 5B]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch nach Behandlung mit dem TLR4-Agonisten LPS: Die NO-Freisetzung durch alte Makrophagen war signifikant geringer als durch junge Makrophagen [Nitrit-Konzentration alt vs. jung, LPS 1 µg/ml: 17,58 (7,01/26,70) µM (n=12) vs. 49,41 (47,44/52,19) μM (n=9), p=0,0005; 0,1 μg/ml: 13,80 (5,61/22,06) μM (n=12) vs. 44,58 (34,97/51,08) µM (n=6), p=0,005; 0,01 µg/ml: 6,77 (3,20/12,64) µM (n=12) vs. 40,25 (33,39/49,99) µM (n=9), p=0,0005; 0,001 µg/ml: 1,69 (1,66/1,94) µM (n=6) vs. 8,54 (5,50/11,07) µM (n=6), p=0,02; 0,0001 µg/ml: 1,72 (1,66/2,83) µM (n=12) vs. 3,99 (1,85/8,00) µM (n=6), p=0,14; Abbildung 5C]. Auch nach Stimulation mit CpG waren alte Peritonealmakrophagen signifikant weniger in der Lage, NO freizusetzen als junge Peritonealmakrophagen, wobei sich bei den niedrigeren CpG-Konzentrationen kein Unterschied zeigte [Nitrit-Konzentration alt vs. jung, CpG 10 µg/ml: 2,81 (2,44/9,89) µM (n=18) vs. 29,67 (23,00/37,08) µM (n=10), p=0,0005; 1 µg/ml: 3,28 (2,05/8,51) µM (n=18) vs. 33,45 (20,76/44,39) µM (n=9), p=0,0005; 0,1 µg/ml: 1,70 (1,66/2,82) µM (n=17) vs. 14,71 (3,42/20,94) µM (n=9), p=0,002; 0,01 µg/ml: 1,66 (1,66/2,14) µM (n=18) vs. 4,21 (1,86/8,64) μ M (n=6), p=0.09; 0.001 μ g/ml: 1.66 (1.66/1.66) μ M (n=6) vs. 1.66 (1.66/1.66) μ M (n=3); Abbildung 5D].



Abbildung 5: NO-Freisetzung (quantifiziert anhand der Nitrit-Konzentration in den Zellkulturüberständen) durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nichtaktiviertem Zustand (n=23 Wells aus 8 unabhängigen Versuchen bei jungen Makrophagen, n=39 Wells aus 7 unabhängigen Versuchen bei alten Makrophagen; Abbildung A) und nach Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄ (junge Makrophagen, n=6-8 Wells, und alte Makrophagen, n=18 Wells, aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge Makrophagen, n=6-9 Wells, und alte Makrophagen, n=6-12 Wells, aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge Makrophagen, n=3-10 Wells, und alte Makrophagen, n=6-18 Wells, aus 1-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; *Mann-Whitney U*-Test; Bonferroni-Korrektur in B, C und D.

3.1.6 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten

3.1.6.1 TNF-*α*

In nicht-aktiviertem Zustand zeigte sich zwischen alten und jungen Peritonealmakrophagen kein signifikanter Unterschied in der Freisetzung von TNF-α [TNF-α-Konzentration alt vs. jung: 66,10 (35,80/89,40) pg/ml (n=21) vs. 46,10 (31,30/72,35) pg/ml (n=14), p=0,40; Abbildung 6A]. Nach Zugabe von Pam₃CSK₄ gaben alte Makrophagen weniger TNF-α ab als junge Makrophagen, der Unterschied war nach Behandlung mit 1 und 0,01 µg/ml Pam₃CSK₄ signifikant [TNF-α-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 1 µg/ml: 273,30 (138,70/453,40) pg/ml (n=15) vs. 467,30 (429,50/546,80) pg/ml (n=12), p=0.05; 0,1 µg/ml: 355,20 (116,40/569,20) pg/ml (n=18) vs. 529,80 (402,80/2697,00) pg/ml (n=17), p=0,07; 0,01 µg/ml: 262,50 (141,30/324,20) pg/ml (n=18) vs. 612,10 (458,80/2467,00) pg/ml (n=17), p=0,0003; Abbildung 6B]. Auch nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS schütteten alte Makrophagen signifikantweniger TNF-a aus als junge Makrophagen, während sich keine Unterschiede in der TNF-a-Freisetzung zwischen jungen und alten Makrophagen nach Stimulation mit niedrigeren Konzentrationen von LPS zeigten [TNF-α-Konzentration alt vs. jung, LPS 1 µg/ml: 1550,00 (430,80/1800,00) pg/ml (n=15) vs. 2162,00 (1289,00/4730,00) pg/ml (n=11), p=0,05; 0,01 µg/ml: 768,00 (118,00/948,30) pg/ml (n=15) vs. 646,30 (312,50/3888,00) pg/ml (n=11), p=0,44; 0,0001 µg/ml: 44,40 (32,40/75,20) pg/ml (n=12) vs. 38,26 (15,63/84,30) pg/ml (n=6), p=0,85; Abbildung 6C]. Nach Behandlung mit dem TLR9-Agonisten CpG ließen sich die altersbedingten Differenzen der TNF- α -Freisetzung durch alte und junge Peritonealmakrophagen deutlicher nachweisen: Alte Makrophagen schütteten nach Zugabe von 10 und 1 μ g/ml CpG signifikant weniger TNF- α aus als junge Makrophagen [TNF- α -Konzentration alt vs. jung, CpG 10 µg/ml: 59,80 (27,60/82,35) pg/ml (n=12) vs. 151,70 (110,50/267,90) pg/ml (n=9), p=0,001; 1 µg/ml: 61,90 (45,40/97,30) pg/ml (n=15) vs. 254,70 (148,10/388,40) pg/ml (n=14), p=0,0003; 0,1 µg/ml: 45,40 (28,20/89,50) pg/ml (n=15) vs. 112,80 (78,23/629,90) pg/ml (n=14), p=0,09; Abbildung 6D].



Abbildung 6: TNF- α -Freisetzung durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nichtaktiviertem Zustand (n=14 Wells bei jungen Makrophagen und n=21 Wells bei alten Makrophagen aus 4 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Makrophagen, n=12-17 Wells, und alte Makrophagen, n=15-18 Wells, aus 3-4 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge Makrophagen, n=6-11 Wells, und alte Makrophagen, n=12-15 Wells, aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge Makrophagen, n=9-14 Wells, und alte Makrophagen, n=12-15 Wells, aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; *Mann-Whitney U*-Test; Bonferroni-Korrektur in B, C und D.

3.1.6.2 IL-6

In nicht-aktiviertem Zustand ließ sich bei der IL-6-Ausschüttung bei alten und jungen Peritonealmakrophagen kein Unterschied nachweisen [IL-6-Konzentration alt vs. jung: 72,20 (62,00/154,50) pg/ml (n=21) vs. 62,00 (46,60/83,03) pg/ml (n=14), p=0,09; Abbildung 7A]. Nach Stimulation mit den verschiedenen TLR-Agonisten zeigte sich eine altersassoziierte Einschränkung bezüglich der Freisetzung von IL-6. Nach Behandlung mit Pam₃CSK₄ fiel die IL-6-Ausschüttung durch alte Makrophagen signifikant geringer aus als bei jungen Makrophagen [IL-6-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 1 µg/ml: 62,00 (62,00/113,90) pg/ml (n=15) vs. 179,90 (97,28/272,30) pg/ml (n=12), p=0,01; 0,1 µg/ml: 62,00 (62,00/128,10) pg/ml (n=18) vs. 211,20 (134,70/4330,00) pg/ml (n=17), p=0,01; 0,01 µg/ml: 72,25 (62,00/174,70) pg/ml (n=18) vs. 259,30 (176,40/2310,00) pg/ml (n=17), p=0,03; Abbildung 7B]. Unter Verwendung von LPS als Stimulans gaben alte Makrophagen ebenfalls eine geringere Menge an IL-6 ab als junge Makrophagen, wobei nur nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS ein signifikanter Unterschied in der Freisetzung von IL-6 zwischen jungen und alten Peritonealmakrophagen nachzuweisen war [IL-6-Konzentration alt vs. jung, LPS 1 µg/ml: 389,50 (329,30/459,80) pg/ml (n=15) vs. 878,00 (639,50/9244,00) pg/ml (n=11), p=0,003; 0,01 µg/ml: 100,40 (77,00/127,80) pg/ml (n=15) vs. 113,90 (62,00/6236,00) pg/ml (n=11), p=0,64; 0,0001 µg/ml: 62,00 (62,00/75,73) pg/ml (n=12) vs. 62,00 (62,00/85,13) pg/ml (n=6), p=0,82; Abbildung 7C]. Ähnliche Tendenzen zeigten sich auch nach Stimulation mit dem TLR9-Agonisten CpG: Alte Makrophagen setzten auch hier weniger IL-6 frei als junge Makrophagen, wobei der Unterschied nur nach Stimulation mit 10 µg/ml CpG signifikant war [IL-6-Konzentration alt vs. jung, CpG 10 µg/ml: 62,00 (62,00/64,48) pg/ml (n=12) vs. 100,00 (62,00/148,70) pg/ml (n=9), p=0,04; 1 µg/ml: 62,00 (62,00/86,10) pg/ml (n=15) vs. 100,10 (64,48/1040,00) pg/ml (n=14), p=0,09; 0,1 µg/ml: 62,00 (62,00/86,10) pg/ml (n=15) vs. 70,60 (62,00/750,30) pg/ml (n=14), p=0,36; Abbildung 7D].



Abbildung 7: IL-6-Freisetzung durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nichtaktiviertem Zustand (n=14 Wells bei jungen Makrophagen und n=21 Wells bei alten Makrophagen aus 4 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Makrophagen, n=12-17 Wells, und alte Makrophagen, n=15-18 Wells, aus 3-4 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge Makrophagen, n=6-11 Wells, und alte Makrophagen, n=12-15 Wells, aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge Makrophagen, n=9-14 Wells, und alte Makrophagen, n=12-15 Wells, aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; *: p<0,05; **: p<0,01; *Mann-Whitney U*-Test; Bonferroni-Korrektur in B, C und D.

3.1.6.3 KC

Alte Peritonealmakrophagen setzten in nicht-aktiviertem Zustand eine signifikant geringere Menge an KC frei als junge Peritonealmakrophagen [KC-Konzentration alt vs. jung: 62,00 (62,00/95,80) pg/ml (n=21) vs. 101,50 (67,33/165,20) pg/ml (n=14), p=0,02; Abbildung 8A]. Nach Zugabe von 0,01 µg/ml Pam₃CSK₄ gaben Makrophagen alter Mäuse signifikant weniger KC ab als Makrophagen junger Mäuse, während nach Behandlung mit 1 und 0,1 µg/ml Pam₃CSK₄ keine Unterschiede in der KC-Freisetzung zwischen alten und jungen Peritonealmakrophagen festzustellen waren [KC-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 1 µg/ml: 794,30 (62,00/912,30) pg/ml (n=15) vs. 638,00 (311,90/1773,00) pg/ml (n=12), p=0,66; 0,1 µg/ml: 617,40 (62,00/814,00) pg/ml (n=18) vs. 1109,00 (280,80/3781,00) pg/ml (n=17), p=0,07; 0,01 µg/ml: 323,60 (81,27/619,30) pg/ml (n=18) vs. 970,70 (604,50/2114,00) pg/ml (n=17), p=0,0006; Abbildung 8B]. Während nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS alte Peritonealmakrophagen ebenfalls tendenziell eine geringere Menge an KC ausschütteten als junge Peritonealmakrophagen, waren keine altersbedingten Unterschiede in der KC-Freisetzung bei Verwendung niedrigerer Konzentrationen von LPS nachzuweisen [KC-Konzentration alt vs. jung, LPS 1 µg/ml: 1935,00 (142,90/2381,00) pg/ml (n=15) vs. 3100,00 (887,90/5387,00) pg/ml (n=11), p=0,10; 0,01 µg/ml: 846,80 (62,00/1096,00) pg/ml (n=15) vs. 689,50 (225,70/2651,00) pg/ml (n=11), p=0,46; 0,0001 µg/ml: 62,00 (62,00/135,50) pg/ml (n=12) vs. 152,30 (62,00/473,10) pg/ml (n=6), p=0,44; Abbildung 8C]. Nach Stimulation mit dem TLR9-Agonisten CpG ließen sich keine Unterschiede in der KC-Freisetzung zwischen alten und jungen Makrophagen feststellen [KC-Konzentration alt vs. jung, CPG 10 µg/ml: 80,75 (62,00/145,40) pg/ml (n=12) vs. 73,90 (62,00/160,90) pg/ml (n=9), p=0,76; 1 µg/ml: 129,50 (62,00/165,00) pg/ml (n=15) vs. 71,15 (62,00/132,50) pg/ml (n=14), p=0,38; 0,1 µg/ml: 112,60 (62,00/125,70) pg/ml (n=15) vs. 93,60 (62,00/207,90) pg/ml (n=14), p=0,51; Abbildung 8D].



Abbildung 8: KC-Freisetzung durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nichtaktiviertem Zustand (n=14 Wells bei jungen Makrophagen und n=21 Wells bei alten Makrophagen aus 4 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Makrophagen, n=12-17 Wells, und alte Makrophagen, n=15-18 Wells, aus 3-4 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge Makrophagen, n=6-11 Wells, und alte Makrophagen, n=12-15 Wells, aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge Makrophagen, n=9-14 Wells, und alte Makrophagen, n=12-15 Wells, aus 2-3 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; *: p<0,05; ***: p<0,001; *Mann-Whitney U*-Test; Bonferroni-Korrektur in B, C und D.

3.2 Unterschiede zwischen Mikrogliazellen junger und alter Mäuse

Mikrogliazellen stellen die residenten Makrophagen des ZNS dar. Anhand von Mikroglia-Kulturen, die aus Gehirnen junger (2 Monate) und alter (18 Monate) Mäuse gewonnen wurden, wurden altersbedingte Veränderungen der Mikrogliafunktionen untersucht. Die *in vitro*-Versuche erfolgten analog zu den Versuchen mit peritonealen Makrophagen. Da im Rahmen der Präparation und anschließenden Kultivierung im Vergleich zu den peritonealen Makrophagen nur eine geringe Anzahl an Mikrogliazellen sowohl bei jungen als auch bei alten Mäusen gewonnen werden konnte, erfolgte die Stimulation der Mikrogliazellen für die einzelnen Versuche nur mit ausgewählten Konzentrationen der TLR-Agonisten Pam₃CSK₄, LPS und CpG.

3.2.1 Morphologie junger und alter Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem und aktiviertem Zustand

Analog zu den Peritonealmakrophagen wurden auch von jungen und alten Mikrogliazellen Isolectin B4-Färbungen in nicht-aktiviertem und aktiviertem Zustand angefertigt. Auch hier ließen sich lichtmikroskopisch die typischen morphologischen Eigenschaften der Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand erkennen, die wie die Peritonealmakrophagen durch einen schmalen Zellkörper und fein-verzweigte, längliche Fortsätze charakterisiert sind. Wesentliche Unterschiede in der Morphologie zwischen jungen und alten Mikrogliazellen in nichtaktiviertem Zustand ließen sich dabei nicht erkennen. Nach Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄, CpG, und LPS kam es wie bei den aktivierten Peritonealmakrophagen sowohl bei den jungen als auch bei den alten Mikrogliazellen zur Abrundung des Zellsomas und zur Verkürzung der Fortsätze. Auch in aktiviertem Zustand zeigten sich unter dem Lichtmikroskop keine morphologischen Unterschiede zwischen jungen und alten Mikrogliazellen.

Wie bei den Peritonealmakrophagen zeigten sich lichtmikroskopisch nach Behandlung mit 100 U/ml IFN- γ weder bei den jungen noch bei den alten Mikrogliazellen morphologische Zeichen für eine Aktivierung.

3.2.2 Phagozytose von *E. coli* K1 durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Behandlung mit verschiedenen TLR-Agonisten

Vergleichbar zu den *in vitro*-Versuchen der peritonealen Makrophagen nahmen in nichtaktiviertem Zustand alte Mikrogliazellen eine signifikant geringere Anzahl an *E. coli* K1 auf als junge Mikrogliazellen [Phagozytoseleistung alt vs. jung: $39,26 \pm 31,89 \%$ (n=13) vs. $100,00 \pm 47,49 \%$ (n=15), p=0,0006; Abbildung 9A]. Die Phagozytoseleistung der jungen Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand wurde bei den Versuchen als 100 % definiert. Altersassoziierte Veränderungen in der Phagozytoseleistung von Mikrogliazellen ließen sich auch nach Stimulation mit den verschiedenen TLR-Agonisten erkennen. Alte Mikrogliazellen phagozytierten deutlich weniger *E. coli* K1 als junge Mikrogliazellen nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ [Phagozytoseleistung alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 0,1 µg/ml: $39,52 \pm 34,90 \%$ (n=6) vs. $161,70 \pm 92,92 \%$ (n=7), p=0,01; Abbildung 9B], LPS [Phagozytoseleistung alt vs. jung, LPS 0,01 µg/ml: $51,67 \pm 19,18 \%$ (n=6) vs. $262,50 \pm 246,10 \%$ (n=6), p=0,06; Abbildung 9C] und CpG [Phagozytoseleistung alt vs. jung, CpG 1 µg/ml: $65,36 \pm 19,58 \%$ (n=5) vs. $204,80 \pm 126,00 \%$ (n=5), p=0,04; Abbildung 9D].



Abbildung 9: Phagozytose von *E. coli* K1 durch junge und alte Mikrogliazellen in nichtaktiviertem Zustand (n=15 Wells bei jungen Mikrogliazellen und n=13 Wells bei alten Mikrogliazellen aus 5 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄ (junge Mikrogliazellen, n=7 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge und alte Mikrogliazellen, n=5 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Darstellungen zeigen die Daten als Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Phagozytoseleistung der jungen Mikrogliazellen in nichtaktiviertem Zustand wurde als 100 % definiert; *: p<0,05; ***: p<0,001; *Student`s t*-Test.

3.2.3 Freisetzung von NO durch Mikrogliazellen junger und alter Mäuse in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten

Im Gegensatz zu den peritonealen Makrophagen bildeten alte Mikrogliazellen in nichtaktiviertem Zustand mehr NO als junge Mikrogliazellen [Nitrit-Konzentration alt vs. jung: 8,19 (7,63/9,26) μ M (n=14) vs. 5,54 (4,20/6,15) μ M (n=15), p=0,001; Abbildung 10A]. Nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ setzten alte Mikrogliazellen signifikant weniger NO frei als junge Mikrogliazellen [Nitrit-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 0,1 µg/ml: 6,97 (5,96/8,28) µM (n=6) vs. 18,40 (8,78/20,89) µM (n=7), p=0,008; Abbildung 10B]. Auch nach Zugabe von LPS als Stimulans waren alte Mikrogliazellen signifikant weniger in der Lage, NO freizusetzen als junge Mikrogliazellen [Nitrit-Konzentration alt vs. jung, LPS 0,01 µg/ml: 4,59 (3,73/5,96) µM (n=6) vs. 6,65 (4,99/9,26) µM (n=6), p=0,04; Abbildung 10C]. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich nach Behandlung mit dem TLR9-Agonisten CpG: Alte Mikrogliazellen gaben tendenziell eine geringere Menge an NO im Vergleich zu den jungen Mikrogliazellen ab, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant [Nitrit-Konzentration alt vs. jung, CpG 1 µg/ml: 6,37 (2,37/6,99) µM (n=5) vs. 10,50 (3,34/11,23) µM (n=5), p=0,21; Abbildung 10D].



Abbildung 10: NO-Freisetzung (quantifiziert anhand der Nitrit-Konzentration in den Zellkulturüberständen) durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand (n=15 Wells bei jungen Mikrogliazellen und n=14 Wells bei alten Mikrogliazellen aus 5 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄ (junge Mikrogliazellen, n=7 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge und alte Mikrogliazellen, n=5 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge und alte Mikrogliazellen, n=5 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; *: p<0,05; **: p<0,01; *Mann-Whitney U*-Test.

3.2.4 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten

3.2.4.1 TNF-*α*

Im Gegensatz zu den peritonealen Makrophagen setzten alte Mikrogliazellen in nichtaktiviertem Zustand weniger TNF- α frei als junge Mikrogliazellen [TNF- α -Konzentration alt vs. jung: 15,63 (15,63/16,48) pg/ml (n=14) vs. 22,00 (15,63/51,40) pg/ml (n=15), p=0,01; Abbildung 11A]. Alte Mikrogliazellen schütteten auch im Vergleich zu jungen Mikrogliazellen deutlich weniger TNF- α aus, nachdem sie mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄ [TNF- α -Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 0,1 µg/ml: 1041,00 (512,50/1810,00) pg/ml (n=6) vs. 3706,00 (1561,00/4082,00) pg/ml (n=7), p=0,05; Abbildung 11B], LPS [TNF- α -Konzentration alt vs. jung, LPS 0,01 µg/ml: 284,10 (262,40/300,50) pg/ml (n=6) vs. 681,20 (468,50/1024,00) pg/ml (n=6), p=0,002; Abbildung 11C] und CpG (TNF- α -Konzentration alt vs. jung, CpG 1 µg/ml: 2687,00 (1006,00/2742,00) pg/ml (n=5) vs. 3828,00 (2582,00/4626,00) pg/ml (n=5), p=0,15; Abbildung 11D] stimuliert wurden. Ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nur nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ und LPS nachweisen.



Abbildung 11: TNF- α -Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen in nichtaktiviertem Zustand (n=15 Wells bei jungen Mikrogliazellen und n=14 Wells bei alten Mikrogliazellen aus 5 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Mikrogliazellen, n=7 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge und alte Mikrogliazellen, n=5 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) gezeigt. *:p<0,05; **: p<0,01; *Mann-Whitney U*-Test.

3.2.4.2 IL-6

In nicht-aktiviertem Zustand lag die IL-6-Freisetzung sowohl bei den alten als auch bei den jungen Mikrogliazellen unterhalb des ELISA-Detektionslimits [IL-6-Konzentration alt vs. jung: 15,63 (15,63/15,63) pg/ml (n=17) vs. 15,63 (15,63/15,63) pg/ml (n=18); Abbildung 12A]. Nach Stimulation mit den einzelnen TLR-Agonisten ließen sich jedoch Veränderungen bezüglich der Freisetzung von IL-6 zwischen den beiden Altersgruppen nachweisen. So setzten alte Mikrogliazellen nach Zugabe von Pam₃CSK₄ signifikant weniger IL-6 frei als junge Mikrogliazellen [IL-6-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 0,1 µg/ml: 85,70 (17,86/144,30) pg/ml (n=6) vs. 924,90 (82,00/937,90) pg/ml (n=7), p=0,04; Abbildung 12B]. Nach Stimula-

tion mit LPS [IL-6-Konzentration alt vs. jung, LPS 0,01 μ g/ml: 24,91 (15,63/36,23) pg/ml (n=6) vs. 87,66 (15,63/188,50) pg/ml (n=6), p=0,49; Abbildung 12C] und CpG [IL-6-Konzentration alt vs. jung, CpG 1 μ g/ml: 210,30 (119,10/310,40) pg/ml (n=5) vs. 426,10 (230,40/526,20) pg/ml (n=5), p=0,10; Abbildung 12D] schütteten alte Mikrogliazellen auch tendenziell weniger IL-6 aus als junge Mikrogliazellen, jedoch zeigte sich dabei kein statistisch signifikanter Unterschied.



Abbildung 12: IL-6-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen in nichtaktiviertem Zustand (n=15 Wells bei jungen Mikrogliazellen und n=14 Wells bei alten Mikrogliazellen aus 5 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Mikrogliazellen, n=7 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge und alte Mikrogliazellen, n=5 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; *: p<0,05; *Mann-Whitney U*-Test.

3.2.4.3 KC

Wie bei IL-6 ließ sich auch bei der KC-Freisetzung in nicht-aktiviertem Zustand kein Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen der Mikrogliazellen feststellen [KC-Konzentration alt vs. jung: 16,61 (15,63/26,58) pg/ml (n=14) vs. 17,60 (15,63/40,10) pg/ml (n=15), p=0,68; Abbildung 13A]. Nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ hingegen setzten alte Mikrogliazellen signifikant weniger KC frei als junge Mikrogliazellen [KC-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 0,1 μ g/ml: 97,10 (92,68/136,80) pg/ml (n=6) vs. 497,00 (399,80/667,10) pg/ml (n=7), p=0,003; Abbildung 13B]. Auch nach Behandlung mit LPS schütteten Mikrogliazellen alter Mäuse eine signifikant geringere Menge an KC aus als Mikrogliazellen junger Mäuse [KC-Konzentration alt vs. jung, LPS 0,01 μ g/ml: 15,63 (15,63/24,23) pg/ml (n=6) vs. 75,00 (44,10/117,40) pg/ml (n=6), p=0,007; Abbildung 13C]. Nach Behandlung mit dem Agonisten CpG ließ sich zwischen alten und jungen Mikrogliazellen kein Unterschied bezüglich der KC-Freisetzung nachweisen [KC-Konzentration alt vs. jung, CpG 1 μ g/ml: 149,20 (113,90/720,80) pg/ml (n=5) vs. 213,40 (174,90/1131,00) pg/ml (n=5), p=0,31; Abbildung 13D].



Abbildung 13: KC-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen in nichtaktiviertem Zustand (n=15 Wells bei jungen Mikrogliazellen und n=14 Wells bei alten Mikrogliazellen aus 5 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Mikrogliazellen, n=7 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung B), LPS (junge und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (junge und alte Mikrogliazellen, n=5 Wells, aus 2 unabhängigen Versuchen; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; **: p<0,01.; *Mann-Whitney U*-Test.

3.3 Einfluss des Glykoproteins IFN-γ auf die Phagozytoseleistung und die Freisetzung von Zytokinen/Chemokinen durch Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen

IFN- γ stellt einen wichtigen Stimulator von murinen Makrophagen und Mikrogliazellen dar und bewirkt unter anderem, dass diese Zellen reaktive Nitrogen- und Sauerstoffspezies zum direkten Abtöten von Pathogenen bilden können. Um eine messbare NO-Ausschüttung von Mikrogliazellen nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten zu erreichen, ist ein gewisser Basis-Spiegel an IFN- γ notwendig (Ebert et al. 2005). Da in dieser Arbeit neben der Phagozytosefähigkeit und der Zytokin-/Chemokinfreisetzung auch die NO-Ausschüttung junger und alter Makrophagen und Mikrogliazellen nach TLR-Aktivierung verglichen werden sollte, erfolgte bei den Hauptexperimenten eine Kostimulation mit IFN- γ .

Zur Untersuchung des Einflusses von IFN-γ auf die Phagozytoseleistung und Zytokin-/Chemokinfreisetzung durch Makrophagen (Alter 2-18 Monate) wurden ergänzende *in vitro*-Versuche unter Verwendung und Abstinenz dieses Zytokins durchgeführt.

In einem exemplarischen Versuch wurde zudem die Phagozytoseleistung und Zytokin-/Chemokinausschüttung zwischen jungen und alten Mikrogliazellen unter Abstinenz von IFN- γ überprüft.

3.3.1 Makrophagen

3.3.1.1 Einfluss von IFN-γ auf die Phagozytose von *E. coli* K1 durch Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten

Die Phagozytosefähigkeit der peritonealen Makrophagen, die vorher mit 100 U/ml IFN- γ behandelt wurden, unterschied sich nicht signifikant von der Phagozytosefähigkeit der Makrophagen, denen nur Zellkultur-Medium zugeführt wurde [Phagozytoseleistung mit vs. ohne IFN- γ : 100,00 ± 50,53 % (n=9) vs. 76,38 ± 53,40 % (n=9), p=0,35; Abbildung 14A]. Die Phagozytoseleistung der Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand, die mit IFN- γ behandelt wurden, wurde hierbei als 100 % definiert. Nach Zugabe von Pam₃CSK₄ phagozytierten Peritonealmakrophagen, die ohne IFN- γ behandelt wurden, tendenziell mehr *E. coli* K1-Bakterien als Peritonealmakrophagen, denen IFN- γ zugegeben wurde, jedoch war der Unterschied nicht statistisch signifikant [Phagozytoseleistung mit vs. ohne IFN- γ , Pam₃CSK₄

1 μg/ml: 35,06 ± 44,60 % (n=8) vs. 185,30 ± 283,70 % (n=8), p=0,16; Abbildung 14B]. Nach Stimulation mit LPS waren Makrophagen ohne IFN-γ signifikant stärker befähigt, *E. coli* K1 zu phagozytieren als mit Zugabe dieses Glykoproteins [Phagozytoseleistung mit vs. ohne IFN-γ, LPS 1 μg/ml: 312,90 ± 166,20 % (n=9) vs. 2070,00 ± 1638,00 % (n=9), p=0,006; Abbildung 14C]. Nach Gabe von CpG als Stimulans ließ sich in der Phagozytosefähigkeit der Makrophagen unter Abstinenz und Verwendung von IFN-γ kein deutlicher Unterschied feststellen [Phagozytoseleistung mit vs. ohne IFN-γ, CpG 10 μg/ml: 202,10 ± 194,90 % (n=8) vs. 134,20 ± 88,94 % (n=8), p=0,39; Abbildung 14D].



Abbildung 14: Phagozytose von *E. coli* K1 durch Peritonealmakrophagen (2-18 Monate) unter Verwendung und Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand (ohne und mit IFN- γ , n=9 Wells, aus 3 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (ohne und mit IFN- γ , n=8 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung B), LPS (ohne und mit IFN- γ , n=9 Wells, aus 3 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (ohne und mit IFN- γ , n=8 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung D). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die Phagozytose-leistung der Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand, die mit IFN- γ behandelt wurden, wurde als 100 % definiert; **: p<0,01; *Student`s t*-Test.

3.3.1.2 Einfluss von IFN-γ auf die Zytokin-/Chemkinausschüttung durch Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten

Parallel zu den Versuchen zur Untersuchung des Einflusses von IFN- γ auf die Phagozytoseleistung der peritonealen Makrophagen wurde unter Anwesenheit und Abstinenz von IFN- γ in den Zellkulturüberständen der Makrophagen die Zytokin- und Chemokinfreisetzung bestimmt.

3.3.1.2.1 TNF-*α*

Während in nicht-aktiviertem Zustand Peritonealmakrophagen, die vorher mit IFN- γ behandelt wurden, signifikant mehr TNF- α ausschütteten als Peritonealmakrophagen, denen nur Zellkultur-Medium zugeführt wurden [TNF- α -Konzentration mit vs. ohne IFN- γ : 64,00 (43,70/116,00) pg/ml (n=27) vs. 29,00 (16,81/37,95) pg/ml (n=21), p<0,0001; Abbildung 15A], zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der TNF- α -Freisetzung durch Peritonealmakrophagen unter Verwendung und Abstinenz von IFN- γ nach Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄ [TNF- α -Konzentration mit vs. ohne IFN- γ , Pam₃CSK₄ 1 µg/ml: 1592,00 (1383,00/1653,00) pg/ml (n=8) vs. 1374,00 (1260,00/1539,00) pg/ml (n=8), p=0,09; Abbildung 15B], LPS [TNF- α -Konzentration mit vs. ohne IFN- γ , LPS 1 µg/ml: 4974,00 (4642,00/5787,00) pg/ml (n=30) vs. 5255,00 (4579,00/6049,00) pg/ml (n=23), p=0,73; Abbildung 15C] und CpG [TNF- α -Konzentration mit vs. ohne IFN- γ , CpG 10 µg/ml: 109,20 (95,60/117,90) pg/ml (n=8) vs. 94,00 (61,23/119,50) pg/ml (n=8), p=0,33; Abbildung 15D].



Abbildung 15: TNF- α -Freisetzung durch Peritonealmakrophagen unter Verwendung und Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand (ohne IFN- γ , n=21 Wells, und mit IFN- γ , n=27 Wells, aus 6 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (ohne und mit IFN- γ , n=8 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung B), LPS (ohne IFN- γ , n=23 Wells, und mit IFN- γ , n=30 Wells, aus 6 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (ohne und mit IFN- γ , n=8 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; ***: p<0,001; *Mann-Whitney U*-Test.

3.3.1.2.2 IL-6

Ohne zusätzliche Stimulation durch TLR-Agonisten ließ sich kein Unterschied in der IL-6-Freisetzung durch Peritonealmakrophagen unter Verwendung und Abstinenz von IFN-γ feststellen [IL-6-Konzentration mit vs. ohne IFN- γ : 17,00 (15,00/49,20) pg/ml (n=27) vs. 28,50 (15,31/31,00) pg/ml (n=21), p=0,99; Abbildung 16A]. Nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ zeigte sich eine signifikant stärkere Ausschüttung von IL-6 durch Makrophagen unter Anwesenheit von IFN- γ als bei Abstinenz dieses Glykoproteins [IL-6-Konzentration mit vs. ohne IFN- γ , Pam₃CSK₄ 1 µg/ml: 1654,00 (1638,00/1684,00) pg/ml (n=8) vs. 772,00 (647,70/962,40) pg/ml (n=8), p=0,0002; Abbildung 16B]. Umgekehrt verhielt es sich nach Gabe des TLR-Agonisten LPS: Makrophagen setzten unter Abwesenheit von IFN- γ eine signifikant größere Menge an IL-6 frei als unter Verwendung dieses Glykoproteins [IL-6-Konzentration mit vs. ohne IFN- γ , LPS 1 µg/ml: 7561,00 (6748,00/10231,00) pg/ml (n=30) vs. 10084,00 (9261,00/13244,00) pg/ml (n=23), p=0,0004; Abbildung 16C]. Nach Stimulation mit CpG war die IL-6-Freisetzung wiederum unter Zugabe von IFN- γ signifikant stärker als bei Abstinenz dieses Zytokins [IL-6-Konzentration mit vs. ohne IFN- γ , CpG 10 µg/ml: 1057,00 (792,00/1255,00) pg/ml (n=8) vs. 471,40 (452,90/513,50) pg/ml (n=8), p=0,0002; Abbildung 16D].



Abbildung 16: IL-6-Freisetzung durch Peritonealmakrophagen unter Verwendung und Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand (ohne IFN- γ , n=21 Wells, und mit IFN- γ , n=27 Wells, aus 6 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (ohne und mit IFN- γ , n=8 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung B), LPS (ohne IFN- γ , n=23 Wells, und mit IFN- γ , n=30 Wells, aus 6 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (ohne und mit IFN- γ , n=8 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; ***: p<0,001; *Mann-Whitney U*-Test.

3.3.1.2.3 KC

In nicht-aktiviertem Zustand setzten Peritonealmakrophagen, die nur mit Zellkultur-Medium versetzt wurden, eine größere Menge an KC frei als Makrophagen, denen neben dem Medium IFN- γ zugeführt wurde [KC-Konzentration mit vs. ohne IFN- γ : 60,00 (22,00/150,00) pg/ml (n=27) vs. 142,00 (25,00/210,00) pg/ml (n=21), p=0,38; Abbildung 17A]. Unter Abstinenz von IFN- γ zeigte sich die KC-Freisetzung durch Peritonealmakrophagen signifikant stärker als bei Vorliegen von IFN- γ nach Behandlung mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄ [KC-Konzentration mit vs. ohne IFN- γ , Pam₃CSK₄ 1 µg/ml: 4185,00 (3606,00/4814,00) pg/ml (n=8) vs. 10258,00 (8906,00/11457,00) pg/ml (n=8), p=0,0002; Abbildung 17B], LPS [KC-Konzentration mit vs. ohne IFN- γ , LPS 1 µg/ml: 5833,00 (3614,00/7190,00) pg/ml (n=30) vs. 18107,00 (16755,00/25360,00) pg/ml (n=23), p<0,0001; Abbildung 17C] und CpG [KC-Konzentration mit vs. ohne IFN- γ , CpG 10 µg/ml: 76,10 (68,35/184,40) pg/ml (n=8) vs. 342,30 (186,00/444,50) pg/ml (n=8), p=0,01; Abbildung 17D].



Abbildung 17: KC-Freisetzung durch Peritonealmakrophagen unter Verwendung und Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand (ohne IFN- γ , n=21 Wells, und mit IFN- γ , n=27 Wells, aus 6 unabhängigen Versuchen; Abbildung A) und nach 24stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (ohne und mit IFN- γ , n=8 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung B), LPS (ohne IFN- γ , n=23 Wells, und mit IFN- γ , n=30 Wells, aus 6 unabhängigen Versuchen; Abbildung C) und CpG (ohne und mit IFN- γ , n=8 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung D). Die Darstellungen zeigen die Daten als Median (25./75. Perzentile); *: p<0,05; ***: p<0,001; *Mann-Whitney U*-Test.

3.3.2 Mikrogliazellen

3.3.2.1 Phagozytose von *E. coli* K1 durch junge und alte Mikrogliazellen in nichtaktiviertem Zustand und nach Behandlung mit verschiedenen TLR-Agonisten ohne Zusatz des Zytokins IFN- γ

Wie bei den Versuchen unter Anwesenheit von IFN- γ (siehe 3.2.2) ließen sich auch bei Abstinenz von IFN-y altersassoziierte Veränderungen in der Phagozytoseleistung zwischen Mikrogliazellen junger und alter Mäuse feststellen. In der Gegenüberstellung wiesen in nichtaktiviertem Zustand alte Mikrogliazellen eine tendenziell verminderte Phagozytoseleistung in Anwesenheit von E. coli K1-Bakterien auf als junge Mikrogliazellen [Phagozytoseleistung alt vs. jung: $63.97 \pm 31.99 \%$ (n=3) vs. $100.00 \pm 77.96 \%$ (n=5), p=0.49; Abbildung 18A]. Die Phagozytoseleistung der jungen Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand wurde hierbei als 100 % definiert. Nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ zeigten alte Mikrogliazellen eine tendenziell verminderte Phagozytose von E. coli K1 auf als junge Mikrogliazellen, der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant [Phagozytoseleistung alt vs. jung, $Pam_3CSK_4 0,1 \ \mu g/ml: 72,39 \pm 20,41 \ \% \ (n=3) \ vs. \ 161,60 \pm 80,39 \ \% \ (n=5), \ p=0,23; \ 0,01$ μ g/ml: 67,90 ± 18,00 % (n=3) vs. 202,00 ± 152,00 % (n=5), p=0,38; Abbildung 18B]. Auch nach Zugabe von 0,01 µg/ml LPS waren alte Mikrogliazellen tendenziell weniger in der Lage, E. coli K1-Bakterien aufzunehmen als junge Mikrogliazellen, jedoch war auch hier der Unterschied nicht signifikant [Phagozytoseleistung alt vs. jung, LPS 1 μ g/ml: 138,60 ± 113,90 % (n=3) vs. $161,60 \pm 115,20$ % (n=5), p=0,53; 0,01 µg/ml: $122,90 \pm 126,90$ % (n=3) vs. 279,50 ± 34,91 % (n=5), p=0,07; Abbildung 18C]. Nach Behandlung mit CpG phagozytierten Mikrogliazellen alter Mäuse signifikant weniger E. coli K1 als Mikrogliazellen junger Mäuse [Phagozytoseleistung alt vs. jung, CpG 1 μ g/ml: 51,63 \pm 11,46 % (n=3) vs. 289,60 \pm 56,34 % (n=5), p=0,0008; 0,1 μ g/ml: 49,94 ± 10,95 % (n=3) vs. 222,20 ± 69,82 % (n=5), p=0,01; Abbildung 18D].



Abbildung 18: Phagozytose von *E. coli* K1 durch junge und alte Mikrogliazellen bei Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand (junge Mikrogliazellen, n=5 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=3 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung A) und nach 24stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Mikrogliazellen, n=5 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=3 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung B), LPS (junge Mikrogliazellen, n=5 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=3 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung C) und CpG (junge Mikrogliazellen, n=5 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=3 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung D). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die Phagozytoseleistung der jungen Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand wurde als 100 % definiert; *: p<0,05; ***: p<0,001; *Student`s t*-Test; Bonferroni-Korrektur in B, C und D.

3.3.2.2 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten ohne Zusatz von IFN-γ

Auch unter Abwesenheit von IFN- γ ließen sich in den Zellkulturüberständen der jungen und alten Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand und nach 24-stündiger Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten die Zytokine TNF- α und IL-6 sowie das Chemokin KC bestimmen. Bei den Kontrollen wurde den Immunzellen nur Zellkultur-Medium zugeführt.

3.3.2.2.1 TNF-α

Bei Abstinenz von IFN-y befanden sich in nicht-aktiviertem Zustand die TNF-a-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen sowohl bei den alten und als auch bei den jungen Mikrogliazellen unterhalb des Detektionslimits des ELISAs [TNF-α-Konzentration alt vs. jung: 15,63 (15,63/15,63) pg/ml (n=6) vs. 15,63 (15,63/15,63) pg/ml (n=10); Abbildung 19A]. Nach Stimulation mit den verschiedenen TLR-Agonisten zeigten sich jedoch ohne Zusatz von IFN- γ altersbedingte Unterschiede in der TNF- α -Freisetzung durch Mikrogliazellen. Alte Mikrogliazellen schütteten signifikant weniger TNF-α aus als junge Mikrogliazellen, nachdem sie mit Pam₃CSK₄ [TNF-α-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 0,1 µg/ml: 202,90 (175,10/261,50) pg/ml (n=6) vs. 891,90 (493,50/1140,00) pg/ml (n=10), p=0,004; 0,01 µg/ml: 296,70 (186,60/353,00) pg/ml (n=6) vs. 1105,00 (978,60/1185,00) pg/ml (n=10), p=0,0004; Abbildung 19B], LPS [TNF-a-Konzentration alt vs. jung, LPS 1 µg/ml: 1631,00 (1354,00/2296,00) pg/ml (n=6) vs. 5320,00 (4574,00/5881,00) pg/ml (n=10), p=0,0004; 0,01 µg/ml: 746,60 (669,30/814,50) pg/ml (n=6) vs. 1617,00 (1286,00/2573,00) pg/ml (n=10), p=0,0004; Abbildung 19C] und mit 1 μg/ml CpG [TNF-α-Konzentration alt vs. jung, CpG 1 µg/ml: 245,10 (187,90/376,30) pg/ml (n=6) vs. 1070,00 (891,90/1439,00) pg/ml (n=10), p=0,01; 0,1 µg/ml: 15,63 (15,63/15,63) pg/ml (n=6) vs. 37,36 (15,63/75,03) pg/ml (n=10); Abbildung 19D] behandelt wurden.


Abbildung 19: TNF- α -Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen bei Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung B), LPS (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung C) und CpG (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung C) und CpG (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; *Mann-Whitney U*-Test; Bonferroni-Korrektur in B, C und D.

3.3.2.2.2 IL-6

Ähnlich wie bei TNF- α lagen bei Abstinenz von IFN- γ ohne Zugabe der TLR-Agonisten die IL-6-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen alter und junger Mikrogliazellen unterhalb des ELISA-Detektionslimits [IL-6-Konzentration alt vs. jung: 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=6) vs. 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=10); Abbildung 20A]. Auch nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ [IL-6-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 0,1 µg/ml: 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=6) vs. 62,00 (62,00/73,40) pg/ml (n=10); 0,01 µg/ml: 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=6) vs. 78,70 (62,45/90,38) pg/ml (n=10); Abbildung 20B].und CpG [IL-6-Konzentration alt vs. jung, CpG 1 µg/ml: 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=10); 0,1

 μ g/ml: 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=6) vs. 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=10); Abbildung 20D] lag sowohl bei alten als auch bei jungen Mikrogliazellen die IL-6-Ausschüttung in den meisten Fällen unterhalb des ELISA-Detektionslimits. Nach Behandlung mit LPS zeigten sich unter Abstinenz von IFN-γ deutliche altersbedingte Unterschiede in der Freisetzung von IL-6 durch Mikrogliazellen: Alte Mikrogliazellen schütteten signifikant weniger IL-6 aus als junge Mikrogliazellen [IL-6-Konzentration alt vs. jung, LPS 1 μ g/ml: 431,30 (296,20/537,20) pg/ml (n=6) vs. 1502,00 (1152,00/1838,00) pg/ml (n=10), p=0,0004; 0,01 μ g/ml: 150,30 (136,90/166,40) pg/ml (n=6) vs. 338,20 (237,10/356,10) pg/ml (n=10), p=0,004; Abbildung 20C].



Abbildung 20: IL-6-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen bei Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung B), LPS (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung C) und CpG (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung C) und CpG (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung C) und CpG (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; **: p<0,01; ***: p<0,001; Mann-Whitney U-Test; Bonferroni-Korrektur in B, C und D.

3.3.2.2.3 KC

Wie bei den Zytokinen TNF- α und IL-6 lagen bei Abstinenz von IFN- γ auch die KC-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen alter und junger Mikrogliazellen unterhalb des ELISA-Detektionslimits [KC-Konzentration alt vs. jung: 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=6) vs. 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=10), Abbildung 21A]. Nach Stimulation mit 0,01 µg/ml Pam₃CSK₄ gaben alte Mikrogliazellen signifikant weniger KC ab als junge Mikrogliazellen, während nach Zugabe von 0,1 µg/ml Pam₃CSK₄ kein Unterschied in der KC-Ausschüttung zwischen alten und jungen Mikrogliazellen feststellbar war [KC-Konzentration alt vs. jung, Pam₃CSK₄ 0,1 µg/ml: 951,30 (879,10/1016,00) pg/ml (n=6) vs. 1054,00 (794,00/3412,00) pg/ml (n=10), p=0,74; 0,01 µg/ml: 853,00 (799,10/1018,00) pg/ml (n=6) vs. 2623,00 (2240,00/3209,00) pg/ml (n=10), p=0,003; Abbildung 21B]. Während nach Behandlung mit 1 µg/ml LPS Mikrogliazellen alter Mäuse tendenziell weniger in der Lage waren, KC auszuschütten als Mikrogliazellen junger Mäuse, allerdings ohne signifikanten Unterschied, zeigte sich bei niedrigeren Konzentrationen von LPS keinerlei Unterschied [KC-Konzentration alt vs. jung, LPS 1 $\mu g/ml$: 1486,00 (1178,00/3334,00) pg/ml (n=6) vs. 3657,00 (2839,00/5395,00) pg/ml (n=10), p=0,06; 0,01 µg/ml: 1154,00 (1087,00/1236,00) pg/ml (n=6) vs. 1039,00 (796,60/3666,00) pg/ml (n=10), p=0,79; Abbildung 21C]. Nach Behandlung mit 1 µg/ml CpG setzten alte Mikrogliazellen eine signifikant geringere Menge an KC im Vergleich zu jungen Mikrogliazellen frei [KC-Konzentration alt vs. jung, CpG 1 µg/ml: 605,90 (520,80/711,50) pg/ml (n=6) vs. 1313,00 (1150,00/1878,00) pg/ml (n=10), p=0,0004; 0,1 µg/ml: 62,00 (62,00/62,00) pg/ml (n=6) vs. 90,25 (85,10/118,60) pg/ml (n=10); Abbildung 21D].



Abbildung 21: KC-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen bei Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung A) und nach 24-stündiger Stimulation mit Pam₃CSK₄ (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung B), LPS (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung C) und CpG (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung C) und CpG (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung C) und CpG (junge Mikrogliazellen, n=10 Wells, und alte Mikrogliazellen, n=6 Wells, aus 1 Versuch; Abbildung D). Die Daten sind als Median (25./75. Perzentile) dargestellt; **: p<0,01; ***: p<0,001; Mann-Whitney U-Test, Bonferroni-Korrektur in B, C und D.

4 Diskussion

Der Alterungsprozess ist mit einer Vielzahl an Einschränkungen in physiologischen Funktionen verbunden (Ginaldi et al. 2001). Altersassoziierte Veränderungen des Immunsystems können zu der erhöhten Anfälligkeit für Infektionen in der älteren Altersgruppe beitragen (Castle 2000, Ginaldi et al. 1999a). Als Vertreter des angeborenen Immunsystems fungieren Mikrogliazellen und Makrophagen als erste Abwehrlinie gegen Erreger im ZNS. Um neue Strategien für die Prävention und Therapie von bakteriellen ZNS-Infektionen bei alten Menschen entwickeln zu können, ist eine genauere Beleuchtung der Altersauswirkungen auf die Funktionen von Makrophagen und Mikrogliazellen von großer Bedeutung. Der Vergleich der Funktionen von Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen alter und junger Mäuse *in vitro* bildet den Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit.

Es gibt Hinweise, dass der Alterungsprozess neben den Funktionen auch die Zahl der innaten Immunzellen beeinflusst (Kovacs et al. 2009). Während die Zahl von Monozyten im Blut, aus denen sich die einzelnen Subpopulationen der Makrophagen differenzieren, in jungen und alten Menschen sehr ähnlich zu sein scheint, besteht im Knochenmark von Personen im Alter zwischen 80 und 100 Jahren eine signifikant reduzierte Anzahl an Makrophagen und ihrer Vorläuferzellen (Takahashi et al. 1985, Ogawa et al. 2000). Zudem ist der Anteil an Zellen, die den Makrophagen-Marker CD68 exprimieren, im Knochenmark von Erwachsenen im Vergleich zu Kindern herabgesetzt (Ogawa et al. 2000). Wang und seine Kollegen konnten wiederum in ihrem Maus-Modell einen signifikanten Anstieg der Makrophagen-Population im Knochenmark alter Tiere mittels des Makrophagen-Erkennungsmarker Mac1+ nachweisen (Wang et al. 1995). Auch in unseren Versuchen ließ sich aus dem Peritonealraum alter Mäuse eine signifikant größere Anzahl an Makrophagen gewinnen als aus dem Peritonealraum junger Mäuse. Im Gegensatz dazu zeigten Goldmann et al. auf, dass Peritonealmakrophagen von alten Mäusen in einem geringeren Umfang im Vergleich zu jungen Mäusen zu gewinnen waren (Goldmann et al. 2010). Insgesamt können diese Diskrepanzen in den Ergebnissen auf verschiedenen Faktoren beruhen, wie z. B. Stamm und Geschlecht der Versuchstiere bzw. personen, unterschiedliche Ursprünge der Makrophagen und Abweichungen in den einzelnen experimentellen Bedingungen (Dewan et al. 2012). Zudem ist zu erwähnen, dass mit zunehmenden Alter die Adhärenz von Zellen in vivo abnehmen kann und möglicherweise auch ein Grund für die erhöhte Dichte an alten Makrophagen nach Peritoneallavage in unseren Versuchen sein kann.

Mikrogliazellen stellen die spezifischen, gewebsresidenten Makrophagen des ZNS dar und sind an der Pathogenese verschiedener ZNS-Infektionen, Tumorerkrankungen sowie neuroin-flammatorischer und neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt (Greter und Merad 2013). Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass sich mit zunehmendem Alter die Anzahl an Mikrogliazellen nicht verändert (Long et al. 1998, VanGuilder et al. 2011). Unter physiologischen Bedingungen bilden sie eine relativ stabile und langlebige Zellpopulation, die durch einen langsamen und begrenzten Zellaustausch mittels Proliferation der residenten Mikrogliazellen oder Rekrutierung von Knochenmark-abstammenden Zellen über die intakte Blut-Hirn-Schranke charakterisiert ist (Lawson et al. 1992).

Einer der ersten Hinweise auf die Mikroglia-Seneszenz lässt sich anhand morphologischer Veränderungen erkennen (Streit et al. 2004). Die auch als "dystrophisch" bezeichneten Mikrogliazellen weisen Deramifikationen (Verlust von feinen Verzweigungen), zytoplasmatische perlenartige oder sphäroide Verformungen, verkürzte oder verdrehte Fortsätze sowie teilweise bzw. komplette Fragmentationen des Zytoplasmas auf (Streit et al. 2004). Diese dystrophisch veränderten Mikrogliazellen sind hauptsächlich in Gehirnen alter Menschen auffindbar (Streit et al. 2004, Wasserman et al. 2008), während die normal ramifizierte Mikroglia-Morphologie mit nur wenigen Ausnahmen in jungen Gehirnen nachzuweisen ist (Conde und Streit 2006a). Zudem fielen in alten Mikrogliazellen von Affen (Peters und Sethares 2002, Peters et al. 1991, Sandell und Peters 2002) und Ratten (Peinado et al. 1998, Vaughan und Peters 1974) heterogene, schaumartige oder dichte membrangebundene Einlagerungen auf (Conde und Streit 2006b). Auch Streit und sein Kollege stellten in Gehirnen alter Ratten eine Akkumulation von Lipofuszin, das auch als Alterspigment bezeichnet wird, fest (Streit und Xue 2010). Ein weiteres Indiz für die Alterung von Mikrogliazellen zeigt sich in der Telomerverkürzung, die neben der Reduktion der Telomeraseaktivität signifikant in Gehirnen alter Ratten festgestellt werden konnte (Flanary et al. 2007). Telomere bilden die physikalischen Enden von eukaryotischen Chromosomen und verkürzen sich während des normalen Alterungsprozess kontinuierlich. Die damit verbundene replikative Seneszenz geht unmittelbar mit Veränderungen in der Zellfunktion und Genexpression einher (Luo et al. 2010). Es besteht die Theorie, dass im gealterten Gehirn unterschiedliche Altersstadien und Funktionszustände von Mikrogliazellen vorliegen (Streit und Graeber 1993).

Über altersbedingte morphologische Veränderungen von Makrophagen liegen zum jetzigen Zeitpunkt keine genaueren Erkenntnisse vor. Jedoch sind ähnliche Alterungsprozesse aufgrund der engen Verwandtschaft zu Mikrogliazellen anzunehmen. Im Rahmen unserer *in vitro*-Versuche konnten lichtmikroskopisch keine wesentlichen Unterschiede in der Morphologie zwischen alten und jungen Peritonealmakrophagen sowohl in nicht-aktiviertem als auch in aktiviertem Zustand nach Stimulation mit den verschiedenen TLR-Agonisten nachgewiesen werden. Auch bei dem Vergleich der Morphologie der von uns präparierten Mikrogliazellen junger und alter Mäuse zeigten sich unter dem Lichtmikroskop keine altersassoziierten Veränderungen.

Es gibt zahlreiche Belege, dass das Alter Auswirkungen auf die Makrophagenfunktion hat. Als phagozytische Zellen sind sie in der Lage, nach Stimulation mit IFN-γ oder durch Komponenten der bakteriellen Zellwand eingedrungene Mikroorganismen oder Tumorzellen direkt durch reaktive Nitrogen- oder Sauerstoffspezies wie z. B. Superoxidradikale oder NO abzutöten.

IFN-y stellt das einzige Mitglied der Klasse II der Interferone dar und wurde ursprünglich auch als "Makrophagen-aktivierender-Faktor" bezeichnet (Schroder et al. 2004). Es wurde davon ausgegangen, dass dieses Glykoprotein ausschließlich von CD4-positiven Typ1-T-Helferzellen, CD8-positiven zytotoxischen Lymphozyten und natürlichen Killerzellen gebildet wird (Bach et al. 1997, Young 1996). Inzwischen liegen Hinweise vor, dass auch andere Zelltypen wie z. B. B-Zellen, natürliche Killer T-Zellen und professionelle Antigenpräsentierende Zellen in der Lage sind, IFN- γ zu sezernieren (Carnaud et al. 1999, Frucht et al. 2001, Gessani und Belardelli 1998, Yoshimoto et al. 1998, Flaishon et al. 2000, Harris et al. 2000). Die Produktion von IFN-y durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen (Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen) scheint insbesondere für die eigene Zellaktivierung und Aktivierung nahegelegener Zellen eine wichtige Rolle zu spielen (Frucht et al. 2001, Gessani und Belardelli 1998). Zudem ist es an der Anlockung von Leukozyten sowie an Wachstums-, Reifungs- und Differenzierungsprozessen von verschiedenen Zelltypen beteiligt (Perussia et al. 1983, Young und Hardy 1995, Boehm et al. 1997). Als ein wichtiger Stimulator von Makrophagen kann es antimikrobielle und -tumorale Mechanismen sowie antigenprozessive und -präsentierende Vorgänge induzieren (Schroder et al. 2004). Häusler und seine Kollegen belegten in ihrer Studie, dass unter Verwendung von IFN-y u. a. die Bildung von NO und TNF-α durch Makrophagen und Mikrogliazellen gefördert werden kann (Häusler et al. 2002). Es gibt zudem Hinweise, dass ein gewisser Basis-Spiegel an IFN-y zur messbaren NO-Ausschüttung von Mikrogliazellen nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten notwendig ist (Ebert et al. 2005). In unseren in vitro-Hauptexperimenten an alten und jungen Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen erfolgte daher eine Kostimulation mit IFN- γ , da hier neben der Phagozytosefähigkeit und Zytokin-/Chemokinfreisetzung auch die NO-Ausschüttung verglichen werden sollte. Anhand der Morphologie der jungen und alten Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen, die vorher nicht mit den verschiedenen TLR-Agonisten stimuliert wurden, zeigte sich unter dem Lichtmikroskop, dass die Zugabe von 100 U/ml IFN- γ die Zellen nicht in einem morphologisch aktivierten Zustand versetzte.

Bei unseren Makrophagen-Zellkulturen ließ sich bereits in nicht-aktiviertem Zustand ohne Zugabe der TLR-Agonisten nachweisen, dass alte Peritonealmakrophagen signifikant weniger in der Lage sind, NO zu bilden als junge Peritonealmakrophagen. Auch nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen der TLR-Agonisten LPS, Pam₃CSK₄ und CpG konnten wir zeigen, dass Peritonealmakrophagen alter Mäuse eine signifikant geringere Menge an NO produzieren als Peritonealmakrophagen junger Mäuse. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Mehrzahl vorangegangener Studien. So war mit zunehmenden Alter die Produktion an oxidativen Radikalen sowie die Expression von iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) und damit die Bildung von NO in Makrophagen von Nagetieren erniedrigt (Plackett et al. 2004, Hayakawa et al. 1995, Alvarez et al. 1996, Hoellman et al. 2001, Khare et al. 1996, Kissin et al. 1997, Ding et al. 1994). Auch die Generation reaktiver Sauerstoffspezies fiel niedriger in Peritonealmakrophagen alter Nagetiere aus als bei jungen Tieren (Plackett et al. 2004, Hayakawa et al. 1995, Alvarez et al. 1996, Ding et al. 1994, Alvarez et al. 1993, Alvarez et al. 1995). McLachlan und Kollegen zeigten zudem in ihren Studien, dass eine altersbedingte Abnahme an reaktiven Nitrogen- oder Sauerstoffspezies auch in humanen Monozyten vorliegt (McLachlan et al. 1995). Als Folge ist die Fähigkeit, Bakterien abzutöten, beeinträchtigt, das wiederum zu einer Verlängerung der Infektionsdauer führen kann (Plackett et al. 2004).

Analog zu den *in vitro*-Versuchen der Peritonealmakrophagen konnten wir nachweisen, dass nach Zugabe von den TLR-Agonisten LPS, Pam₃CSK₄ und CpG auch Mikrogliazellen alter Mäuse eine geringere Menge an NO freisetzen als Mikrogliazellen junger Mäuse.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die gestörte Produktion von NO im Alter kann sein, dass die Aktivierung der Makrophagen über IFN- γ durch verschiedene Defekte in den Signalwegen beeinträchtigt ist. Ein wichtiges Mitglied in der Signalübertragung von IFN- γ stellt der Transkriptionsfaktor STAT (signal transducer and activator of transcription)-1 dar. Als direkter Signaltransduktor vermittelt er Signale abgeleitet von den Zellmembran-Rezeptoren direkt an die Zielgene im Zellkern. Nach Stimulation mit IFN- γ werden die STAT-1-Proteine über Phosphorylierung in aktive Homo- oder Heterodimere umgewandelt, die dann im Zellkern an spezifische Promotorelemente binden und eine entsprechende Genexpression initiieren. Während keine altersassoziierten Unterschiede in der Oberflächen-Expression des IFN- γ -Rezeptors gefunden werden konnten, ließ sich eine signifikante Abschwächung in der Phosphorylierung des Tranksriptionsfaktors STAT-1 α nach IFN- γ -Stimulation in Peritonealmakrophagen alter Mäuse (18-24 Monate) im Vergleich zu jungen Mäusen (2 Monate) nachweisen (Yoon et al. 2004). Zudem fiel die absolute STAT-1 α -Expression als Antwort auf IFN- γ in Makrophagen alter Mäuse deutlich geringer aus als in Makrophagen junger Mäuse (Yoon et al. 2004). Diese Unfähigkeit alter Makrophagen, STAT-1 α optimal auszubilden und zu phosphorylieren, könnte zur Beeinträchtigung der IFN- γ -Stimulation beitragen (Yoon et al. 2004). Ding und seine Kollegen offenbarten weitere Störungen in den Signaltransduktionswegen: Sie machten die reduzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen nach IFN- γ -Stimulation für die erniedrigte Superoxid-Produktion durch Peritonealmakrophagen alter Mäuse verantwortlich (Ding et al. 1994).

Die Phagozytose nimmt eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Mikroorganismen, die die epitheliale Barriere überwunden haben, ein. Obwohl bereits Berichte über Effekte des Alters auf die Phagozytosefunktion von Makrophagen existieren, sind die genaueren Mechanismen weiterhin unklar. In unserem Zellkultur-Modell zeigte sich sowohl in nichtaktiviertem Zustand als auch nach Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄, LPS und CpG die Phagozytosekapazität für E. coli K1 der Peritonealmakrophagen alter Mäuse im Vergleich zu den Peritonealmakrophagen junger Mäuse deutlich reduziert. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis weisen mehrere Studien darauf hin, dass verschiedene Zwischenschritte des phagozytischen Prozesses wie Anhaftung, Opsonierung, Abtöten von Tumorzellen und Phagozytose durch Peritonealmakrophagen in alten Mäusen abnehmen (De La Fuente 1985, Khare et al. 1996, De La Fuente et al. 2000). Swift und seine Kollegen konnten ebenfalls mit ihrer Studie zeigen, dass alte murine Makrophagen im Wundgebiet weniger Latexkügelchen und opsonierte Schafs-Erythrozyten phagozytierten als junge murine Makrophagen (Swift et al. 2001). Entgegen dieser Erkenntnisse liegen wiederum Studien an Ratten vor, die komplett entgegengesetzte Resultate (Corsini et al. 2005, Hilmer et al. 2007) bzw. keine altersabhängigen Unterschiede (Miller et al. 2007) in der Phagozytosekapazität zwischen alten und jungen Makrophagen feststellen konnten. Diese Unstimmigkeiten in den Studien bezüglich der Phagozytoseleistung können zum einen auf die verschiedenen Aktivierungszustände und Ursprünge der Makrophagenpopulationen als auch auf abweichende experimentelle Bedingungen beruhen (Plowden et al. 2004).

Analog zu den Peritonealmakrophagen waren in unserem Zellkultur-Modell Mikrogliazellen alter Mäuse in nicht-aktiviertem Zustand und nach Zugabe der TLR-Agonisten Pam₃CSK₄, LPS und CpG deutlich weniger in der Lage, *E. coli* K1-Bakterien zu phagozytieren als Mikrogliazellen junger Mäuse. Auch bei Abstinenz von IFN-γ ließ sich in einem exemplarischen Versuch darstellen, dass in nicht-aktiviertem Zustand und nach Zugabe von Pam₃CSK₄, LPS und CpG die Phagozytoseleistung bei alten Mikrogliazellen im Vergleich zu jungen Mikrogliazellen geringer ausfällt.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit vorangegangenen *in vitro*-Untersuchungen: In mehreren Studien unter Verwendung verschiedener Methoden konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen von alten Mäusen weniger in der Lage sind, Beta-Amyloid zu phagozytieren (Hickman et al. 2008, Lee et al. 2010, Floden und Combs 2011, Njie et al. 2012).

Nach unserem jetzigen Kenntnisstand konnten erstmals mit unseren *in vitro*-Studien altersbedingte Veränderungen in der Phagozytosekapazität zwischen alten und jungen Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen unter Verwendung lebender Bakterien nachgewiesen werden.

Für den phagozytischen Prozess sind insbesondere die daran teilnehmenden Rezeptoren wie z. B. Mannose- und Scavenger-Rezeptor und die Komponenten der Signaltransduktion entscheidend. Störungen in ihrer Expression und Funktion könnten mögliche Gründe für die reduzierte Phagozytoseleistung in älteren Individuen darstellen (Plowden et al. 2004). Die weitere Untersuchung altersbedingter Schäden an diesen Rezeptoren und Signaltransduktionswegen könnte wichtige Anhaltspunkte für die Verbesserung der Phagozytosefähigkeit schaffen.

Da sich im Verlauf unserer Phagozytoseversuche andeutete, dass IFN- γ einen Einfluss auf diese Funktion der Makrophagen ausüben kann, untersuchten wir unter Verwendung und Abstinenz dieses Zytokins die Phagozytoseleistung der Makrophagen (2-18 Monate alt). Nach Behandlung mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄ und LPS ließ sich deutlich erkennen, dass die Phagozytosekapazitität für *E. coli* K1 durch Makrophagen bei Abstinenz von IFN- γ stärker ist als unter Verwendung dieses Zytokins. Entgegen dieser Ergebnisse zeigte sich in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit CpG die Phagozytoseleistung der Makrophagen bei Abstinenz von IFN- γ im Vergleich zu der Phagozytoseleistung der Makrophagen bei Abstinenz von IFN- γ nicht beeinträchtigt. Es gibt bisher nur wenige Studien, die sich mit den Wirkungen von IFN- γ auf die Phagozytoseleistung von Makrophagen beschäftigt haben.

Rollag und Degré erkannten 1981 in ihrer Studie, dass aus murinen Fibroblasten gewonnenes homologes Interferon die Phagozytose von nicht-opsonierten E. coli durch murine Peritonealmakrophagen modulieren kann (Rollag und Degré 1981). Während sich unter der Verwendung von niedrigen bis mäßigen Konzentrationen der Fibroblasten-IFN (100-1000 U/ml) eine Steigerung in der Phagozytoseleistung von murinen Peritonealmakrophagen zeigte, ließ sich bei hohen Interferonkonzentrationen eine Abschwächung in der Phagozytosefähigkeit von murinen Peritonealmakrophagen nachweisen (Rollag und Degré 1981). Unter der Verwendung von IFN- γ ließ sich eine abgeschwächte Aufnahme von nicht-opsonierten E. coli durch murine Peritonealmakrophagen feststellen (Degré et al. 1981). Bei in vitro-Behandlungen mit den murinen IFN- α und - β waren wiederum keine Veränderungen in der Phagozytose von E. coli durch murine Peritonealmakrophagen zu beobachten (Rollag et al. 1982). In einer weiteren Studie untersuchten Rollag und seine Kollegen, inwieweit Interferone die Anhaftung und Aufnahme von Partikeln durch Peritonealmakrophagen über unspezifische Rezeptoren, Fcund C3b-Rezeptoren beeinflussen können (Rollag et al. 1984). Nach Anwendung von niedrig dosiertem murinen IFN- α /- β zeigte sich eine gesteigerte Anhaftung und Aufnahme von Bakterien und Erythrozyten über die drei Rezeptoren durch murine Peritonealmakrophagen. Höhere Konzentrationen von murinen IFN- α /- β bewirkten diesen Effekt nicht. Nach Behandlung mit murinen IFN- γ stellte sich die Anhaftung und Aufnahme von Bakterien und Erythrozyten über den unspezifischen- und Fc-Rezeptor durch Peritonealmakrophagen vermindert dar. Die Partikelaufnahme über den C3b-Rezeptor wies unter IFN-y-Einfluss keine Veränderungen auf (Rollag et al. 1984). Backman und Guyre konzentrierten sich in ihrer Studie auf die über den Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose und untersuchten dabei, inwieweit IFN-y die Antikörperabhängige und -unabhängige Phagozytose von Tumorzellen durch Makrophagen beeinflussen kann (Backman und Guyre 1994). Um die Antikörperabhängige Phagozytose besser nachvollziehen zu können, wurden in dieser Studie die Fc-Rezeptoren für IgG (FcyR) genauer betrachtet. Die aus Monozyten differenzierten Makrophagen können alle 3 Klassen des Fcy-Rezeptors (FcyRI, -II, -III), die alle zur Induktion von phagozytischen Prozessen befähigt sind (Anderson et al. 1990), auf ihrer Oberfläche exprimieren (Backman und Guyre 1994). Nach Anwendung von niedrig-dosiertem IFN-y konnten hemmende Effekte auf die Antikörpergeleitete Phagozytose von humanen Tumorzellen über den Fcy-Rezeptor Typ II durch Makrophagen nachgewiesen werden. Die FcyRII-Expression und die Antikörper-unabhängige Phagozytose von Tumorzellen durch Makrophagen wiesen dabei keine IFN-y-bedingten Veränderungen auf (Backman und Guyre 1994). Auch Frausto-Del-Río und Kollegen beschäftigten sich mit dem Effekt von IFN- γ und dem Zytokin IL-10, das im Allgemeinen einen potenten Inhibitor der Makrophagenfunktionen darstellt, auf die über Fc γ R-geführte Phagozytose von IgG-opsonierten Erythrozyten und nicht-opsonierten *E. coli* durch Makrophagen (Frausto-Del-Río et al. 2012). Obwohl beide Zytokine die Expression von Fc γ RI hochregulieren konnten, kam es in Anwesenheit von IFN- γ zu einer Abdämpfung und nach Behandlung mit IL-10 zu einer Steigerung der über Fc γ R-geleiteten Phagozytose von IgG-opsonierten Erythrozyten und nicht-opsonierten *E. coli* durch von Monozyten abstammenden Makrophagen (Frausto-Del-Río et al. 2012).

In Zusammenschau dieser Studien deutet sich an, dass Interferone in der Lage sind, die Phagozytoseleistung von Makrophagen zu beeinflussen. Insbesondere IFN- γ scheint vorwiegend eine Verminderung der Phagozytose zu bewirken. Um genaue Erklärungsansätze für die IFN- γ -Wirkung auf die phagozytische Aktivität von Makrophagen entwickeln zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig. In Anbetracht der vorliegenden Daten könnte die genauere Beleuchtung von IFN- γ -bedingten Veränderungen an den bei der Phagozytose beteiligten Rezeptoren und den entsprechenden Signaltransduktionswegen von großem Interesse sein. Trotz dieser Erkenntnis, dass IFN- γ einen Einfluss auf die Phagozytoseleistung der Makrophagen ausüben kann, konnten wir anhand unserer Phagozytose-Versuche sowohl unter Verwendung als auch bei Abstinenz von IFN- γ signifikante altersbedingte Veränderungen in der Phagozytoseleistung bei Mikrogliazellen und unter IFN- γ -Zugabe bei Peritonealmakrophagen nachweisen.

Makrophagen besitzen die Fähigkeit, mit der Ausschüttung einer großen Vielzahl an Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Enzymen auf Pathogene zu antworten. Die Freisetzung dieser Faktoren hängt von der Art des Stimulus, dem Makrophagentyp und der Lokalisation ab. Das Vorliegen von Störungen in der Zytokin- und Chemokinausschüttung, Veränderungen in der Expression von Chemokin- und Zytokin-Rezeptoren oder einer gesteigerten Sezernierung von löslichen Rezeptorliganden, die die Bindung von Chemokinen und/oder Zytokinen verhindern können, kann zu einer herabgesetzten Immunantwort auf Infektionen führen (Plowden et al. 2004). Mögliche Konsequenzen können sich in einer abgeschwächten Entzündungsreaktion, reduzierten Rekrutierung und/oder gestörten Funktion von Effektorzellen, in verzögerten Reperaturprozesse oder Ausbleiben von klassischen Erkrankungssymptomen widerspiegeln. Der Mangel an Symptomen kann wiederum die Diagnosefindung und das Einleiten entsprechender therapeutischer Interventionen hinauszögern und auf diese Weise eine Zunahme an schweren und tödlichen Krankheitsverläufen in älteren Individuen begünstigen (Plowden et al. 2004). Die bisherigen Studien über altersbedingte Veränderungen in der Zytokin- und Chemokinfreisetzung durch Makrophagen weisen sehr widersprüchliche Ergebnisse insbesondere zwischen in vitro- und in vivo-Versuchen auf. Die Mehrheit der Studien an Nagetieren belegen, dass mit zunehmendem Alter die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch Makrophagen vermindert ist (Higashimoto et al. 1993). Diese Aussage deckt sich auch mit unseren Resultaten: Nach Stimulation mit den verschiedenen TLR-Agonisten LPS, Pam₃CSK₄ und CpG gaben Peritonealmakrophagen alter Mäuse hauptsächlich eine geringere Menge der Zytokine TNF-α und IL-6 sowie des Chemokins KC ab als Peritonealmakrophagen junger Mäuse. Auch Renshaw und Kollegen zeigten, dass nach Stimulation der TLR2, 3, 4, 5 und 9 mit ihren jeweiligen Agonisten (Zymosan, Poly(I:C), LPS, Flagellin und CpG DNA) Milz- und mit Thioglykolat gewonnene Peritonealmakrophagen von alten Mäusen weniger proinflammatorische Zytokine wie TNF-a und IL-6 sowie Chemokine wie MIP (macrophage inflammatory protein)-1a und CCL (CC-Chemokin-Ligand)-5 in vitro freisetzten (Renshaw et al. 2002). Kohut et al. verglichen in ihrer in vitro erfassten Studie unter anderem die Produktion der Zytokine IL-1, IL-12 und TNF-α zwischen Makrophagen von Milz, Alveolen und Peritoneum von jungen (2 Monate) und alten Mäusen (21 Monate) sowie Mäusen im mittleren Alter (12 Monate). Dabei fiel auf, dass Makrophagen von Alveolen und Milz der alten Mäuse mehr Zytokine im Vergleich zu den jüngeren Tieren ausschütteten. Vergleichbar mit unseren Versuchen bildeten Peritonealmakrophagen der alten Mäuse generell eine geringere Menge an Zytokinen als Peritonealmakrophagen der jüngeren Mäuse (Kohut et al. 2004). Ein ähnliche Beobachtung machten auch Murciano und seine Kollegen: Die in vitro-Produktion der Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α und des Chemokines MIP-2 durch Peritonealmakrophagen fiel als Antwort auf Candida albicans bei alten Mäusen signifikant geringer aus als bei jungen Mäusen (Murciano et al. 2008).

Während die Mehrzahl der Studien eine abnehmende Zytokinausschüttung durch Makrophagen von alten Nagetieren belegen, liegen bei humanen Monozyten diesbezüglich uneinige Ergebnisse vor. Nach *in vitro*-Stimulation mit LPS war die Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 (Delpedro et al. 1998) und der Chemokine IL-8 (Clark und Peterson 1994), RAN-TES (=CCL5) und MIP-1 α (Mariani et al. 2002) in peripheren Blutmonozyten von alten Menschen erhöht. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass auch *in vivo* ein proinflammatorischer Status im Serum von gesunden alten Menschen vorliegt (Ershler et al. 1993). Trotz der Mehrheit der Studien, die eine erhöhte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der älteren Altersgruppe belegen, existieren Reporte, die gegensätzliche Ergebnisse erzielten (Gon et al. 1996, Beharka et al. 2001) bzw. keine Unterschiede zwischen jungen und alten humanen Monozyten nachweisen konnten (Ahluwalia et al. 2001). Die Unstimmigkeiten in den einzelnen Studien können zum einen auf die genetische Heterogenität und variierenden Gesundheitszuständen der Testpopulationen und zum anderen auf Abweichungen in den experimentellen Bedingungen basieren (Plowden et al. 2004). Zudem ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass *in vivo* auch das lokale Umfeld eine bedeutsame Einflussgröße für die Zytokinproduktion darstellt. So können sich verschiedene lokal vorkommende Zelltypen, wie z. B. Epithel- und Endothelzellen oder andere Leukozyten an der Zytokinfreisetzung beteiligen und zum hyperinflammatorischen Zustand beitragen (Kovacs et al. 2009). Des Weiteren sind Makrophagen *in vivo* einer Vielzahl an Stimuli (einschließlich Hormone, Zytokine, Chemokine, adrenerge und cholinerge Agonisten, Fettsäuren und Immunglobuline) ausgesetzt, die sich mit zunehmenden Alter in ihrer Quantität verändern und damit einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionen und Phänotypen von Makrophagen ausüben können (Stout et al. 2005, Stout und Suttles 2005, Gomez et al. 2008).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Peritonealmakrophagen ließen sich anhand unserer *in vitro*-Versuche auch Abschwächungen in den Zytokin- und Chemokinfreisetzungen der Mikrogliazellen im Alter nachweisen. Sowohl in nicht-aktiviertem Zustand als auch nach Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄, LPS und CpG waren Mikrogliazellen der alten Mäuse weniger in der Lage, TNF-α freizusetzen als Mikrogliazellen der jungen Mäuse. Ähnlich verhielt es sich auch bei der IL-6-Ausschüttung: Nachdem alte Mikrogliazellen mit Pam₃CSK₄, LPS und CpG aktiviert wurden, bildeten sie im Vergleich zu jungen Mikrogliazellen sellen eine geringere Menge an IL-6. Bei der Freisetzung des Chemokins KC ließen sich ebenfalls Unterschiede zwischen Mikrogliazellen der alten und jungen Mäuse feststellen. So schütteten alte Mikrogliazellen nach Behandlung mit Pam₃CSK₄ und LPS weniger KC aus als junge Mikrogliazellen.

Analog zu den Phagozytoseversuchen konnten wir in einem exemplarischen Versuch zeigen, dass auch unter Abstinenz von IFN- γ altersbedingte Unterschiede in der Zytokin- und Chemokinfreisetzung zwischen alten und jungen Mikrogliazellen nachzuweisen sind. So waren nach Aktivierung durch die TLR-Agonisten LPS, Pam₃CSK₄ und CPG alte Mikrogliazellen ohne Vorbehandlung mit IFN- γ signifikant weniger in der Lage, das proinflammatorische Zytokin TNF- α auszuschütten als junge Mikrogliazellen. Ähnlich verhielt es sich auch bei der Ausschüttung von KC: Unter Abwesenheit von IFN- γ setzten nach Stimulation mit LPS, Pam₃CSK₄ und CPG alte Mikrogliazellen weniger KC frei als junge Mikrogliazellen. Auch bei der IL-6-Ausschüttung zeigte sich nach Aktivierung durch LPS eine reduzierte Zytokin-Freisetzung durch alte Mikrogliazellen im Vergleich zu den jungen Mikrogliazellen.

Zur Eruierung von Auswirkungen von IFN- γ auf die Zytokin- und Chemokinfreisetzung durch Peritonealmakrophagen (2-18 Monate alt) führten wir ebenfalls parallel zu den Phagozytoseversuchen Messungen der Zytokine TNF- α und IL-6 sowie des Chemokins KC in Anwesenheit und Abstinenz von IFN- γ durch. Während nach der Stimulation mit den TLR-Agonisten LPS, Pam₃CSK₄ und CpG keine IFN- γ bedingten Veränderungen in der TNF- α -Ausschüttung durch Peritonealmakrophagen zu erkennen waren, zeigte sich nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ und CpG eine signifikant stärkere IL-6-Bildung durch Peritonealmakrophagen unter Anwesenheit von IFN- γ . Umgekehrt stellte es sich nach Behandlung mit LPS dar: Unter Abstinenz von IFN- γ bildeten Peritonealmakrophagen signifikant mehr IL-6 als nach Zugabe von IFN- γ . Eine ähnliche Beobachtung ließ sich bei der KC-Ausschüttung erkennen: Nach Stimulation mit LPS, Pam₃CSK₄ und CpG setzten die Peritonealmakrophagen mehr KC bei IFN- γ -Abstinenz frei als bei Anwesenheit von IFN- γ .

Anhand dieser *in vitro*-Versuche scheint es, dass IFN-γ nicht nur die Phagozytose durch Peritonealmakrophagen beeinflussen kann, sondern auch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen modulieren kann. Weitere umfangreichere Versuche sind notwendig, um diese Effekte genauer zu beleuchten und mögliche Strategien zu schaffen, die Zytokin-/Chemokinfreisetzung durch Makrophagen gezielt lenken zu können.

Wir konnten anhand unserer Zellkultur-Modelle zeigen, dass gealterte Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen weniger in der Lage sind, proinflammatorische Zytokine und Chemokine freizusetzen. Für die gestörte Zytokinproduktion im Alter liegen unterschiedliche Erklärungsansätze vor. Während Renshaw und seine Kollegen eine reduzierte Expression von TLR auf Makrophagen mit zunehmenden Alter erkannten und dies als möglichen Grund für die herabgesetzte Zytokinantwort nach LPS-Stimulation nannten (Renshaw et al. 2002), berichteten Boehmer und Kollegen wiederum, dass die TLR-Ausprägung im Alter nicht beeinträchtigt erschien. Vielmehr stellten sich in ihren Studien intrazelluläre Signalwege abgeschwächt dar (Boehmer et al. 2004). Verschiedene Arbeitsgruppen befassten sich mit diesen beiden Theorien. Van Duin und Kollegen zeigten, dass die Bildung von TNF- α und IL-6 über die TLR1 und 2 in peripheren Blutmonozyten mit zunehmenden Alter eingeschränkt ist (van Duin et al. 2007). Im Gegensatz dazu schien die Zytokinproduktion über die TLR2/6, 4 und 5 weitestgehend intakt zu sein (van Duin et al. 2007). Während die Ausprägung des TLR1 auf der Oberfläche von alten humanen Monozyten niedrig ausfiel, stellte sich die Oberflächen-Expression von TLR2 unverändert und von TLR4 nur leicht abnehmend mit steigendem Alter dar (van Duin et al. 2007). Im Maus-Modell ließen sich keine altersbedingten Veränderungen in der Expression von TLR4 auf Makrophagen nachweisen (Boehmer et al. 2004, Boehmer et al. 2005, Chelvarajan et al. 2005, Chelvarajan et al. 2006). Dafür ergaben sich Hinweise, dass der Oberflächen-Level an CD14, ein Co-Rezeptor für TLR4 (Ingalls et al. 1999), in reduziertem Umfang auf Makrophagen von alten Tieren im Vergleich zu jungen Tieren ausgebildet wurde (Chelvarajan et al. 2005, Vega et al. 2004). Damit LPS den an der Oberfläche befindlichen *Pattern Recognition*-Rezeptoren wie TLR4 oder CD14 präsentiert werden kann (Muta und Takeshige 2001), muss es zunächst an ein Protein gebunden werden. Der Basal-Level dieses sogenannten LPS-bindenden Proteins (LBP) schien durch das Alter unbeeinflusst zu sein (Gomez et al. 2006). Defekte in den Signalwegen des TLR4 verbunden mit herabgesetzter Bildung von proinflammatorischen Zytokinen konnten mit der erhöhten Anfälligkeit für Infektionen und der erniedrigten adaptiven Immunantwort in der älteren Altersgruppe in Verbindung gebracht werden (Wessels et al. 2010, Mahbub et al. 2011).

Bei der genaueren Betrachtung der intrazellulären Signalwege konnten ebenfalls spezifische Defekte in alten Makrophagen im Vergleich zu jungen Makrophagen identifiziert werden. Insbesondere in den MAPK-Signalwegen waren im Maus-Modell die Gesamtlevels und die Phosphorylierungen der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase und der c-Jun-N-terminalen Kinase in alten Makrophagen im Vergleich zu jungen Makrophagen nach Aktivierung des TLR4 reduziert (Boehmer et al. 2004, Plackett et al. 2004). Eine abgeschwächte MAPK-Aktivität ließ sich auch in zirkulierenden Monozyten von alten Probanden nachweisen (Nomellini et al. 2008). Weitere Alterseffekte zeigten sich auch in der TLR-Signalkaskade. Chelvarajan und Kollegen konnten mit ihren Studien insbesondere altersassoziierte Veränderungen in den Zwischenschritten des MyD88-abhängigen Signalweges erkennen. So waren MyD88, TRAF6 und einige Mitglieder des NF-kB-Weges in Makrophagen alter Mäuse in reduziertem Umfang ausgebildet (Chelvarajan et al. 2006). Es scheint, dass die TLR-abhängigen Signalwege mit steigendem Alter signifikant an Effizienz verlieren (Chelvarajan et al. 2006) und das könnte nicht nur zur Abschwächung der Zytokin-/Chemokinfreisetzung durch Makrophagen führen, sondern auch einen möglichen Erklärungsansatz für die reduzierte Phagozytoseleistung und NO-Produktion bei alten Makrophagen und Mikrogliazellen darstellen.

Ähnlich wie bei den peripheren Makrophagen ist ergänzend anzumerken, dass die Mikroglia-Dysfunktion nicht nur durch intrinsische Faktoren zu erklären ist, sondern auch die Umgebung und die damit verbundenen extrinsischen Faktoren eine bedeutsame Rolle spielen können (Luo et al. 2010). Mögliche extrinsische Faktoren können z. B. Neurotransmitter, oxidativer Stress, neuroendokrine Faktoren (Franceschi et al. 2000b; Mosley 1996), Hormone und pathologische Faktoren wie Proteinansammlungen (Flanary und Streit 2004) sein. Es gibt Belege, dass der Alterungsprozess des Gehirns durch eine Zunahme an oxidativem Stress und Lipidperoxidationen gekennzeichnet ist und dass eine Akkumulation von Schäden durch freie Radikale im Laufe des Lebens zu steigenden Inflammationsprozessen innerhalb des Gehirns führen können (Norden und Godbout 2013). Dabei scheinen insbesondere die Mikrogliazellen eine entscheidende Rolle zu spielen. Es wird davon ausgegangen, dass während des Alterns die Mikrogliazellen in einen chronischen mäßigen Entzündungszustand versetzt sind und eine hohe Bereitschaft zur Reaktivität aufweisen (Jurgens und Johnson 2012). Zudem scheinen in gealterten Gehirnen die Regulationsmechanismen der Gliazellen beeinträchtigt zu sein (Wynne et al. 2009). Um eine ausreichende Abschwächung aktivierter Mikrogliazellen gewährleisten zu können, sind antiinflammatorische Zytokine wie z. B. IL-10, TGF β und IL-4 notwendig (Norden und Godbout 2013). In einer Studie zeigte sich, dass 24 h nach einer LPS-Injektion die Expression von TGFβ-mRNA in Gehirnen jüngerer Mäuse anstieg, jedoch nicht in Gehirnen alter Mäuse (Wynne et al. 2010). Diese defiziente Induktion von TGFβ-mRNA kann zu der verlängerten Mikroglia-Aktivierung in alten Mäusen beitragen. Weitere Altersauswirkungen zeigten sich auch im Vorkommen und in der Wirksamkeit des antiinflammatorischen Zytokins IL-4. So ließ sich in Gehirnen alter Ratten eine reduzierte Menge an IL-4 feststellen, das mit einer gesteigerten Neuroinflammation und mit Störungen in der synaptischen Übertragung in Verbindung gebracht werden konnte (Maher et al. 2005, Nolan et al. 2005). Fenn und seine Kollegen erkannten, dass ebenso die Ansprechbarkeit auf IL-4 in alten Mikrogliazellen abnimmt. Dies kann zur Folge haben, dass der Wechsel von einem M1 zu einem M2-Phänotyp durch diese Mikrogliazellen nicht vollzogen wird und sie weiterhin aktiviert bleiben (Fenn et al. 2011).

Diese extrinsischen und regulatorischen Faktoren spielten in unseren Zellkultur-Versuchen eine eher untergeordnete Rolle, sodass die von uns beobachteten altersbedingten Veränderungen vorwiegend die intrinsischen Dysfunktionen der Mikrogliazellen widerspiegeln.

Um den klinischen Verlauf bei alten Patienten während einer bakteriellen ZNS-Infektion besser nachvollziehen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein geriatrisches Maus-Modell mit einer intrazerebralen *E. coli*-Infektion entwickelt (Schütze et al. 2014). Nach der intrazerebralen Injektion von *E. coli* K1 zeigten alte Mäuse ($26 \pm 2,3$ Monate alt) im Vergleich zu jungen Mäusen ($2,2 \pm 0,3$ Monate alt) eine deutlich höhere Mortalität auf, entwickelten schneller klinische Symptome und nahmen deutlicher an Gewicht ab. Obwohl sich die Anzahl an infiltrierten Leukozyten und Mikrogliazellen im ZNS während der *E. coli*-Meningitis bei alten und jungen Mäusen nicht veränderte, kam es bei den alten Mäusen zu einer schnelleren systemischen Infektionsausbreitung und zu einer verminderten Bakterienelimination. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung können die verminderte Phagozytose von *E. coli*-Bakterien und die reduzierte NO-Ausschüttung durch alte Mikrogliazellen und Makrophagen sein, die sich in unseren *in vitro*-Versuchen nachweisen ließen. Zum Zeitpunkt der akuten Phase der *E. coli*-Meningitis zeigte sich *in vivo* eine verminderte systemische Entzündungsreaktion bei den alten Mäusen: Die Serum-Levels des Zytokins IL-6 und des Chemokins KC fielen bei alten Mäusen geringer aus als bei den jungen Mäusen. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis ließ sich auch in unseren Zellkulturüberständen eine verminderte Zytokin- und Chemokinkonzentration bei alten Mikrogliazellen und Makrophagen nachweisen.

In Zusammenschau bestätigen unsere Ergebnisse und die weitergeführte Studienrecherche die Hypothese, dass das Alter einen starken Einfluss auf die Funktionen von Makrophagen und Mikrogliazellen hat. Insbesondere die essentiellen Funktionen für die Immunabwehr wie NO-Produktion, Phagozytose von Erregern und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen scheinen mit zunehmendem Alter bei Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen eingeschränkt zu sein. Für die Etablierung neuer Therapiestrategien wäre es von Bedeutung, die genauen Mechanismen der gestörten Funktionsabläufe zu ergründen, insbesondere die altersbedingten Veränderungen der Rezeptorexpression und Signaltransduktionswege. Zudem scheint auch das externe Milieu, in dem die Zellen residieren, eine wichtige Einflussgröße im Alter zu sein.

Anhand von *in vitro*-Studien zeigt sich, dass Mikrogliazellen in Abhängigkeit von dem lokalen Umfeld, der Interaktion mit anderen Zelltypen, spezifischen Stimuli und der Schwere einer Erkrankung sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Eigenschaften besitzen können (Block und Hong 2005, Imamura et al. 2003, Kumagai et al. 2007, Rozemuller und van Muiswinkel 2000, Walter und Neumann 2009). Insbesondere die reaktiven Sauerstoffspezies, die durch aktivierte Phagozyten gebildet werden, sind nicht nur an der Abtötung von eingedrungenen Mikroorganismen beteiligt, sondern können auch einen neuronalen Schaden und eine reaktive Gliose induzieren (Walter und Neumann 2009). Demgegenüber weisen Mikrogliazellen auch protektive Funktionen auf, indem sie geschädigte Zellen entfernen, die Neurogenese fördern, geschädigte Myelinscheiden wiederherstellen und neurotrophe Faktoren sowie antiinflammatorische Moleküle freisetzen (Walter und Neumann 2009, Ziv et al. 2006, Franklin und Kotter 2008). Während Gene, die auf oxidativen Stress, Inflammation und Gliaaktivierung hinweisen, mit zunehmendem Alter vermehrt exprimiert werden, nehmen Genexpressionen, die mit synaptischer Funktion bzw. Übertragung, Wachstums- und trophischen Faktoren in Assoziation stehen, mit dem Alter ab (Jurgens und Johnson 2012, Bishop et al. 2010, Blalock et al. 2003, Lee et al. 2000). Insgesamt deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass mit steigendem Lebensalter die neurotoxischen Eigenschaften der Mikrogliazellen überwiegen und die Fähigkeit, einen protektiven Phänotyp anzunehmen, nachlässt. Vor allem die Phagozytoseleistung als wichtige Schutzfunktion stellte sich in unseren *in vitro*-Versuchen bei Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen mit zunehmendem Alter reduziert dar.

Interessant erscheinen Therapieansätze, die sich mit den externen Faktoren beschäftigen und die Möglichkeit schaffen, mittels therapeutischer Interventionen die Phänotypen der Makrophagen und Mikrogliazellen lenken und insbesondere die protektiven Funktionen fördern zu lassen. Haynes et al. zeigten z. B. in ihrer Studie, dass die Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen die Antigenpräsentation und die T-Zellantwort von alten Mäusen verbessern kann (Haynes et al. 2004). Des Weiteren konnte bei Makrophagen von alten Individuen, die vorher mit IFN- γ (Hayakawa et al. 1995) oder mit IGF (*insulin-like-growth factor*) (Burgess et al. 1999) behandelt wurden, eine signifikant verbesserte Entzündungs- und Effektorantwort auf LPS-Stimulation beobachtet werden. Unsere Arbeitsgruppe befasste sich zudem genauer mit dem endogenen Fettsäureamid Palmitoylethanolamid (PEA), das sowohl antiinflammatorische als auch neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Im Rahmen von *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit PEA die Phagozytosefähigkeit von murinen Mikrogliazellen und Peritonealmakrophagen gegenüber *E. coli* K1-Bakterien gesteigert und gleichzeitig die Zytokin- und Chemokinfreisetzung, die zur Neurotoxizität beitragen können, abgeschwächt wurden (Redlich et al. 2014, Redlich et al. 2012).

Auf der Basis dieser ersten Ansätze sind weitere Forschungen notwendig, um die Funktionsdefizite bei alten Mikrogliazellen und Makrophagen zu verbessern und somit neue Maßnahmen für Prävention und Therapie von bakteriellen ZNS-Infektionen bei alten Menschen zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Bakterielle ZNS-Infektionen stellen lebensbedrohliche Erkrankungen dar, die schwere Komplikationen wie Tod in der Akutphase oder neurologische und neuropsychologische Beeinträchtigungen zur Folge haben können. Ältere Menschen sind anfälliger für bakterielle Infektionen und zeigen im Vergleich zu jüngeren Personen häufig einen deutlich schlechteren klinischen Ausgang und eine erhöhte Komplikationsrate auf, dies gilt auch für die bakterielle Meningitis. In Anbetracht der zunehmenden Alterung der Weltbevölkerung bedeutet dies, dass die Inzidenz altersassoziierter Infektionen ansteigen und eine zunehmend wichtige Herausforderung im klinischen Alltag darstellen wird. Insbesondere im Hinblick darauf, dass sich vermehrt Resistenzen gegenüber Antibiotika entwickeln und Impferfolge im Alter nachlassen, erscheint es umso wichtiger, sich mit den Ursachen der erhöhten Infektanfälligkeit im Alter zu beschäftigen und neue Therapieansätze und Präventionsmaßnahmen gegen bakterielle Infektionen zu entwickeln.

Eine bedeutsame Rolle in der Früherkennung eingedrungener Pathogene spielt das innate Immunsystem. Die gewebsresidenten Mikrogliazellen bilden zusammen mit Makrophagen der Meningen, des Plexus choroideus, der perivaskulären und zirkumventrikulären Bereiche das erste Abwehrsystem des ZNS gegenüber Infektionen. Basierend auf der Hypothese, dass altersbedingte Veränderungen des Immunsystems zu der erhöhten Anfälligkeit für Infektionen in der älteren Altersgruppe beitragen können, wurde in dieser Promotionsarbeit der Einfluss des Alters auf die essentiellen Immunfunktionen der Makrophagen und Mikrogliazellen genauer untersucht. Hierzu wurden primäre Peritonealmakrophagen- und Mikrogliazell-Kulturen aus jungen (2 Monate alt) und alten (18 Monate alt) C57BL/6-Mäusen präpariert. In diesen Zellkultur-Modellen wurde in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten die Fähigkeit von alten und jungen Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen verglichen, NO zu bilden, lebende E. coli-Bakterien zu phagozytieren sowie die proinflammatorischen Zytokine TNF-a und IL-6 und das Chemokin KC auszuschütten. Zudem wurde lichtmikroskopisch die Morphologie der jungen und alten Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄, LPS und CpG verglichen. Während wir keine altersbedingten morphologischen Unterschiede zwischen jungen und alten peritonealen Makrophagen und Mikrogliazellen nachweisen konnten, zeigten sich deutliche altersassoziierte Einschränkungen der untersuchten Funktionen der Makrophagen und Mikrogliazellen.

In vitro ließ sich erkennen, dass alte Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen signifikant weniger lebende *E. coli* K1-Bakterien phagozytierten als junge Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen sowohl in nicht-aktiviertem Zustand als auch nach Stimulation mit den Agonisten der TLR2, 4 und 9. Auch die Freisetzung von NO und der Zytokine TNF-α und IL-6 und des Chemokins KC fiel nach Behandlung mit den TLR-Agonisten Pam₃CSK₄, LPS und CpG bei alten Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen deutlich geringer aus als bei jungen Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen.

Diese Ergebnisse bestätigen unsere Hypothese, dass das Alter Auswirkungen auf wesentliche Funktionen der Makrophagen und Mikrogliazellen hat. Die eingeschränkte Phagozytosefähigkeit, NO- und Zytokin-/Chemokinfreisetzung alter Makrophagen und Mikrogliazellen könnten wichtige Ursachen für die erhöhte Inzidenz und den schwereren Verlauf von bakteriellen ZNS-Infektionen bei alten Individuen sein.

Es gibt bereits Studien, die sich mit altersbedingten Veränderungen der Expression von TLR-Rezeptoren und Signaltranduktionswegen beschäftigen, die mögliche Erklärungsansätze für die verminderte Phagozytoseleistung und NO- und Zytokin-/Chemokinausschüttungen durch alte Makrophagen und Mikrogliazellen darstellen können. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Immunfunktionen der Makrophagen und Mikrogliazellen, insbesondere die Phagozytose von Erregern, im Alter zu verbessern und auf diese Weise neue Optionen für die Prävention und Therapie bakterieller ZNS-Infektionen bei alten Personen zu schaffen.

6 Publikationen

Originalarbeit

Schütze S, Ribes S, **Kaufmann A**, Manig A, Scheffel J, Redlich S, Bunkowski S, Hanisch UK, Brück W, Nau R (2014): Higher mortality and impaired elimination of bacteria in aged mice after intracerebral infection with *E. coli* are associated with an age-related decline of microglia and macrophage functions. Oncotarget: Gerotarget (Focus on Aging) <u>5</u>, 12573-12592

Abstracts für Vorträge und Poster

Schütze S, **Kaufmann A**, Ribes S, Scheffel S, Redlich S, Hanisch UK, Brück W, Nau R: Reduced release of nitric oxide and different cytokines/chemokines by aged microglial cells upon activation of Toll-like receptors 2 and 4. 12th International Congress of Neuroimmunology in Mainz, Germany; November 2014

Schütze S, **Kaufmann A**, Redlich S, Bunkowski S, Ribes S, Nau R: Verminderte Bakterienphagozytose, Zytokin- und NO-Freisetzung durch primäre Makrophagen alter Mäuse nach Stimulation von Toll-like-Rezeptoren. Gemeinsamer Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gerontologie und Geriatrie (DGGG) und der Deutschen Gesellschaft für Geriatrie (DGG) in Bonn, Deutschland; September 2012

Schütze S, Ribes S, **Kaufmann A**, Bunkowski S, Brück W, Nau R: Erhöhte Sterblichkeit und verminderte Erregerelimination bei bakteriellen ZNS-Infektionen im Alter: Untersuchungen im Maus-Modell der *E.coli*-Meningitis. 118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) in Wiesbaden, Deutschland; April 2012

Schütze S, Ribes S, **Kaufmann A**, Bunkowski S, Brück W, Nau R: Decreased resistance of the aged brain to infections: higher mortality and impaired elimination of bacteria in aged mice after intracerebral infection with *E. coli* K1. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) in London, Great Britain; March/April 2012

7 Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and Molecular Immunology. 6. Auflage; Saunders Elsevier, Philadelphia 2010
- Aggarwal S, Gupta S (1998): Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. J Immunol <u>160</u>, 1627-1637
- Aggarwal S, Gupta S (1999): Increased activity of caspase 3 and caspase 8 in anti-Fas-induced apoptosis in lymphocytes from ageing humans. Clin Exp Immunol <u>117</u>, 285-290
- Agrawal A, Agrawal S, Tay J, Gupta S (2008): Biology of dendritic cells in aging. J Clin Immunol 28, 14-20
- Ahluwalia N, Mastro AM, Ball R, Miles MP, Rajendra R, Handte G (2001): Cytokine production by stimulated mononuclear cells did not change with aging in apparently healthy, well-nourished women. Mech Ageing Dev <u>122</u>, 1269-1279
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007): Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. Nature Neurosci <u>10</u>, 1538-1543
- Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001): Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol <u>2</u>, 675-680
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. Cell <u>124</u>, 783-801
- Allman D, Miller JP (2005): B cell development and receptor diversity during aging. Curr Opin Immunol <u>17</u>, 463-467
- Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Würzner R, Schönitzer D, Grubeck-Loebenstein B (2005): Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. J Virol <u>79</u>, 3675-3683
- Alvarez E, Santa MC, Machado A (1993): Respiratory burst reaction changes with age in rat peritoneal macrophages. Biochim Biophys Acta <u>1179</u>, 247-252
- Alvarez E, Conde M, Machado A, Sobrino F, Santa Maria C (1995): Decrease in free-radical production with age in rat peritoneal macrophages. Biochem J <u>312</u>, 555-560
- Alvarez E, Machado A, Sobrino F, Santa MC (1996): Nitric oxide and superoxide anion production decrease with age in resident and activated rat peritoneal macrophages. Cell Immunol <u>169</u>, 152-155
- Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK (1990): Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. J Exp Med <u>171</u>, 1333-1345

- Andrew D, Aspinall R (2001): IL-7 and not stem cell factor reverses both the increase in apoptosis and the decline in thymopoiesis seen in aged mice. J Immunol <u>166</u>, 1524-1530
- Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL (2002): Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat Med <u>8</u>, 379-385
- Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR (2007): Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. J Neuroimmune Pharmacol <u>2</u>, 297-312
- Aspinall R, Pido-Lopez J, Imami N, Henson SM, Ngom PT, Morre M, Niphuis H, Remarque E, Rosenwirth B, Heeney JL (2007): Old rhesus macaques treated with interleukin-7 show increased TREC levels and respond well to influenza vaccination. Rejuvenation Res <u>10</u>, 5-17
- **Bach** EA, Aguet M, Schreiber RD (1997): The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. Annu Rev Immunol <u>15</u>, 563-591
- **Backman** KA, Guyre PM (1994): Gamma-interferon inhibits Fc receptor II-mediated phagocytosis of tumor cells by human macrophages. Cancer Res <u>54</u>, 2456-2461
- **Banati** RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993): Cytotoxicity of microglia. Glia <u>7</u>, 111-118
- **Bauer** J, Sminia T, Wouterlood FG, Dijkstra CD (1994): Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurosci Res <u>38</u>, 365-375
- **Bechmann** I, Priller J, Kovac A, Bontert M, Wehner T, Klett FF, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R (2001): Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. Eur J Neurosci <u>14</u>, 1651-1658
- **Beharka** AA, Meydani M, Wu D, Leka LS, Meydani A, Meydani SN (2001): Interleukin-6 production does not increase with age. J Gerontol A Biol Sci Med Sci <u>56</u>, B81-88
- **Behrman** RE, Meyers BR, Mendelson MH, Sacks HS, Hirschman SZ (1989): Central nervous system infections in the elderly. Arch Intern Med <u>149</u>, 1596-1599
- **Benveniste** EN (1997): Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. J Mol Med <u>75</u>, 165-173
- **Bishop** NA, Lu T, Yankner BA (2010): Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. Nature <u>464</u>, 529-535
- **Biswas** SK, Mantovani A (2010): Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol <u>11</u>, 889-896
- **Biswas** SK, Chittezhath M, Shalova IN Lim JY (2012): Macrophage polarization and plasticity in health and disease. Immunol Res <u>53</u>, 11-24

- **Blalock** EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW (2003): Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. J Neurosci <u>23</u>, 3807-3819
- **Block** ML, Hong JS (2005): Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. Prog Neurobiol <u>76</u>, 77-98
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007): Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. Nat Rev Neurosci <u>8</u>, 57-69
- **Boche** D, Perry VH, Nicoll JA (2013): Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. Neuropathol Appl Neurobiol <u>39</u>, 3-18
- **Boehm** U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997): Cellular responses to interferon-gamma. Annu Rev Immunol <u>15</u>, 749-795
- **Boehmer** ED, Goral J, Faunce DE, Kovacs EJ (2004): Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. J Leukoc Biol <u>75</u>, 342-349
- **Boehmer** ED, Meehan MJ, Cutro BT, Kovacs EJ (2005): Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. Mech Ageing Dev <u>126</u>, 1305-1313
- **Borrego** F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, Peña J, Solana R (1999): NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. Exp Gerontol <u>34</u>, 253-265
- **Bruunsgaard** H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhoj P, Pedersen BK (2001): Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans. Exp Gerontol <u>37</u>, 127-136
- **Bruunsgaard** H, Andersen-Ranberg K, Hjelmborg JB, Pedersen BK, Jeune B. (2003): Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. Am J Med <u>115</u>, 278-283
- **Burgess** W, Liu Q, Zhou J, Tang Q, Ozawa A, VanHoy R, Arkins S, Dantzer R, Kelley KW (1999): The immune-endocrine loop during aging: role of growth hormone and insulin-like growth factor-I. Neuroimmunomodulation <u>6</u>, 56-68
- **Cabellos** C, Viladrich PF, Corredoira J, Verdaguer R, Ariza J, Gudiol F (1999): Streptococcal meningitis in adult patients: current epidemiology and clinical spectrum. Clin Infect Dis <u>28</u>, 1104-1108
- **Carnaud** C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A (1999): Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. J Immunol <u>163</u>, 4647-4650
- **Carpentier** PA, Duncan DS, Miller SD (2008): Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. Brain Behav Immun <u>22</u>, 140-147
- **Carson** MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC (2006): CNS immune privilege: hiding in plain sight. Immunol Rev <u>213</u>, 48-65

- Castle SC (2000): Clinical relevance of age-related immune dysfunction. Clin Infect Dis <u>31</u>, 578-585
- **Chelvarajan** RL, Collins SM, Van Willigen JM, Bondada S (2005): The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. J Leukoc Biol <u>77</u>, 503-512
- **Chelvarajan** RL, Liu Y, Popa D, Getchell ML, Getchell TV, Stromberg AJ, Bondada S (2006): Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages. J Leukoc Biol <u>79</u>, 1314-1327
- Choi C (1992): Bacterial meningitis. Clin Geriatr Med 8, 889-902
- Choi C (2001): Bacterial meningitis in aging adults. Clin Infect Dis 33, 1380-1385
- Chong Y, Ikematsu H, Yamaji K, Nishimura M, Nabeshima S, Kashiwagi S, Hayashi J (2005): CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. Int Immunol <u>17</u>, 383-390
- **Clark** JA, Peterson TC (1994): Cytokine production and aging: overproduction of IL-8 in elderly males in response to lipopolysaccharide. Mech Ageing Dev <u>77</u>, 127-139
- **Conde** JR, Streit WJ (2006a): Effect of aging on the microglial response to peripheral nerve injury. Neurobiol Aging <u>27</u>, 1451-1461
- Conde JR, Streit WJ (2006b): Microglia in the aging brain. J Neuropathol Exp Neurol <u>65</u>, 199-203
- **Corsini** E, Di Paola R, Viviani B, Genovese T, Mazzon E, Lucchi L, Marinovich M, Galli CL, Cuzzocrea S (2005): Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats. Immunology <u>115</u>, 253-261
- Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C (1997): Cytometric analysis of immunosenescence. Cytometry <u>27</u>, 297-313
- **Coull** JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005): BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. Nature <u>438</u>, 1017-1021
- Crossley KB, Peterson PK (1996): Infections in the elderly. Clin Infect Dis 22, 209-215
- **Cuadros** MA, Navascues J (1998): The origin and differentiation of microglial cells during development. Prog Neurobiol <u>56</u>, 173-189
- **Davalos** D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005): ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci <u>8</u>, 752-758
- **Davis** EJ, Foster TD, Thomas WE (1994): Cellular forms and functions of brain microglia. Brain Res Bull <u>34</u>, 73-78
- **Davoust** N, Vuaillat C, Androdias G, Nataf S (2008): From bone marrow to microglia: barriers and avenues. Trends Immunol <u>29</u>, 227-234

- **De Chiara** G, Marcocci ME, Sgarbanti R, Civitelli L, Ripoli C, Piacentini R, Garaci E, Grassi C, Palamara AT (2012): Infectious Agents and Neurodegeneration. Mol Neurobiol <u>46</u>, 614-638
- **Degré** M, Sonnenfeld G, Rollag H, Mørland B (1981): Effect of gamma interferon preparations on in vitro phagocytosis and degradation of Escherichia coli by mouse peritoneal macrophages. J Interferon Res <u>1</u>, 505-512
- **De La Fuente** M (1985): Changes in the macrophage function with aging. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol <u>81</u>, 935-938
- **De La Fuente** M, Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A (2000): Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. Life Sci <u>67</u>, 2125-2135
- **Delpedro** AD, Barjavel MJ, Mamdouh Z, Faure S, Bakouche O (1998): Signal transduction in LPS-activated aged and young monocytes. J Interferon Cytokine Res <u>18</u>, 429-437
- **Dewan** SK, Zheng SB, Xia SJ, Bill K (2012): Senescent remodeling of the immune system and its contribution to the predisposition of the elderly to infections. Chin Med J (Engl) <u>125</u>, 3325-3331
- **Ding** A, Hwang S, Schwab R (1994): Effect of aging on murine macrophages. Diminished response to IFN gamma for enhanced oxidative metabolism. J Immunol <u>153</u>, 2146-2152
- **Djukic** M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Bruck W, Priller J, Nau R, Prinz M (2006): Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. Brain <u>129</u>, 2394-2403
- **Domingo** P, Barquet N, Alvarez M, Coll P, Nava J, Garau J (1997): Group B streptococcal meningitis in adults: report of twelve cases and review. Clin Infect Dis <u>25</u>, 1180-1187
- **Ebert** S, Gerber J, Bader S, Mühlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dosedependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. J Neuroimmunol <u>159</u>, 87-96
- Effros RB (2003): Genetic alterations in the ageing immune system: impact on infection and cancer. Mech Ageing Dev <u>124</u>, 71-77
- Effros RB (2005): Roy Walford and the immunologic theory of aging. Immun Ageing 2, 7
- **Elkabes** S, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1996): Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. J Neurosci <u>16</u>, 2508-2521
- **Ershler** WB, Keller ET (2000): Age-associated increased interleukin-6 gene expression, latelife diseases, and frailty. Annu Rev Med <u>51</u>, 245-270
- **Ershler** WB, Sun WH, Binkley N, Gravenstein S, Volk MJ, Kamoske G, Kloop RG, Roecker EB, Daynes RA, Weindruch R (1993): Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. Lymphokine Cytokine Res <u>12</u>, 225-230

- **Fagnoni** FF, Vescovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, Casti A, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P (2000): Shortage of circulating naive CD8 (+) T -cells provides new insights on immunodeficiency in aging. Blood <u>95</u>, 2860-2868
- Fenn AM, Henry CJ, Huang Y, Dugan A, Godbout JP (2011): Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor-alpha expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microgliaof aged mice. Brain Behav Immun <u>26</u>, 766-777
- **Flaishon** L, Hershkoviz R, Lantner F, Lider O, Alon R, Levo Y, Flavell RA, Shachar I (2000): Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. J Exp Med <u>192</u>, 1381-1388
- Flanary BE, Streit WJ (2004): Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. Glia <u>45</u>, 75-88
- Flanary BE, Sammons NW, Nguyen C, Walker D, Streit WJ (2007): Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. Rejuvenation Res <u>10</u>, 61-74
- **Floden** AM, Combs CK (2011): Microglia demonstrate age-dependent interaction with amyloid-β fibrils. J Alzheimers Dis <u>25</u>, 279-293
- **Flugel** A, Bradl M, Kreutzberg GW, Graeber MB (2001): Transformation of donor-derived bone marrow precursors into host microglia during autoimmune CNS inflammation and during the retrograde response to axotomy. J Neurosci Res <u>66</u>, 74-82
- **Franceschi** C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A (1995): The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenerians. Immunol Today <u>16</u>, 12-16
- **Franceschi** C, Bonafè M, Valensin S (2000a): Human immnunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. Vaccine <u>18</u>, 1717-1720
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, DE Benedictis G (2000b): Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. Ann N Y Acad Sci <u>908</u>, 244-254
- Franklin RJ, Kotter MR (2008): The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances. J Neurol <u>255 (Suppl 1)</u>, 19-25
- **Frasca** D, Riley RL, Blomberg BB (2005): Humoral immune response and B-cell functions including immunoglobulin class switch are downregulated in aged mice and humans. Semin Immunol <u>17</u>, 378-384
- Frausto-Del-Río D, Soto-Cruz I, Garay-Canales C, Ambriz X, Soldevila G, Carretero-Ortega J, Vázquez-Prado J, Ortega E (2012): Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells. Cytokine 57, 158-168
- **Frucht** DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S (2001): IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. Trends Immunol <u>22</u>, 556-560

- **Galea** J, Cruickshank G, Teeling JL, Boche D, Garland P, Perry VH, Galea I (2012): The intrathecal CD163-haptoglobinhemoglobin scavenging system in subarachnoid hemor rhage. J Neurochem <u>121</u>, 785-792
- Gao HM, Hong JS (2008): Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. Trends Immunol <u>29</u>, 357-365
- Geissmann F, Jung S, Littmann DR (2003): Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity <u>19</u>, 71-82
- George AJ, Ritter MA (1996): Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? Immunol Today <u>17</u>, 267-272
- Gerber J, Nau R (2010): Mechanism of injury in bacterial meningitis. Curr Opin Neurol <u>23</u>, 312-318
- **Gessani** S, Belardelli F (1998): IFN-gamma expression in macrophages and its possible bilogical significance. Cytokine Growth Factor Rev. <u>9</u>, 117-123
- Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O`Callaghan C, Murphy M, Smith N, Sissons P, Rowland-Jones S, Bell JI, Moss PA (2000): Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirusspecificCD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. J Virol <u>74</u>, 8140-8150
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Corsi MP, Quaglino D (1999a): The immune system in the elderly I. Specific humoral immunity. Immunol Res 20, 101-108
- **Ginaldi** L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglino D (1999b): Imunological changes in the elderly. Aging Clin Exp Res <u>11</u>, 281-286
- Ginaldi L, Loreto MF, Corsi MP, Modesti M, De Martinis M (2001): Immunosenescence and infectious diseases. Microbes Infect <u>3</u>, 851-857
- Ginaldi L, Di Benedetto MC, De Martinis M (2005): Osteoporosis, inflammation and ageing. Immun Ageing <u>2</u>, 14
- **Goldmann** O, Lehne S, Medina E (2010): Age-related susceptibility to Streptococcus pyogenes infection in mice: underlying immune dysfunction and strategy to enhance immunity. J Pathol <u>220</u>, 521-529
- **Gomez** CR, Boehmer ED, Kovacs EJ (2005): The aging innate immune system. Curr Opin Immunol <u>17</u>, 457-462
- **Gomez** CR, Goral J, Ramirez L, Kopf M, Kovacs EJ (2006): Aberrant acute-phase response in aged interleukin-6 knockout mice. Shock <u>25</u>, 581-585
- Gomez CR, Nomellini V, Faunce DE, Kovacs EJ (2008): Innate immunity and aging. Exp Gerontol <u>43</u>, 718-728
- **Gon** Y, Hashimoto S, Hayashi S, Koura T, Matsumoto K, Horie T (1996): Lower serum concentrations of cytokines in elderly patients with pneumonia and the impaired pro duction of cytokines by peripheral blood monocytes in the elderly. Clin Exp Immunol <u>106</u>, 120-126

- Gordon S, Taylor PR (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. Nature Rev Immunol <u>5</u>, 953-964
- Gordon S, Martinez FO (2010): Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity <u>32</u>, 593-604
- **Goronzy** JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM (2001): Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. J Virol <u>75</u>, 12182-12187
- Gorse GJ, Thrupp LD, Nudleman KL, Wyle FA, Hawkins B, Cesario TC (1984): Bacterial meningitis in the elderly. Arch Intern Med <u>144</u>, 1603-1607
- **Graeber** MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988): The microglial cytoskeleton: Vimentin is localized within activated cells in situ. J Neurocytol <u>17</u>, 573-580
- Greter M, Merad M (2013): Regulation of microglia development and homeostasis. Glia <u>61</u>, 121-127
- Hanisch UK (2002): Microglia as a source and target of cytokines. Glia 40, 140-155
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci <u>10</u>, 1387-1394
- Hanisch UK, Johnson TV, Kipnis J (2008): Toll-like receptors: roles in neuroprotection? Trends Neurosci <u>31</u>, 176-182
- Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE (2000): Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. Nat Immunol <u>1</u>, 475-482
- Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002): Interferon-γ differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharideand pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. Eur J Neurosci <u>16</u>, 2113-2122
- Hayakawa H, Sato A, Yagi T, Uchiyama H, Ide K, Nakano M (1995): Superoxide generation by alveolar macrophages from aged rats: improvement by in vitro treatment with IFN-gamma. Mech Ageing Dev <u>80</u>, 199-211
- **Haynes** L, Eaton SM (2005): The effect of age on the cognate function of CD4+ T cells. Immunol Rev 205, 220-228
- **Haynes** L, Eaton SM, Burns EM, Randall TD, Swain SL (2003): CD4 T cell memory derived from young naive cells functions well into old age, but memory generated from aged naive cells functions poorly. Proc Natl Acad Sci USA <u>100</u>, 15053-15058
- Haynes L, Eaton SM, Burns EM, Rincon M, Swain SL (2004): Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. J Immunol <u>172</u>, 5194-5199
- Henson SM, Snelgrove R, Hussell T, Wells DJ, Aspinall R (2005): An IL-7 fusion protein that shows increased thymopoietic ability. J Immunol <u>175</u>, 4112-4118
- **Hickey** WF, Kimura H (1988): Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrowderived and present antigen in vivo. Science <u>239</u>, 290-292

- **Hickman** SE, Allison EK, El Khoury J (2008): Microglial dysfunction and defective betaamyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. J Neurosci <u>28</u>, 8354-8360
- **Higashimoto** Y, Fukuchi Y, Shimada Y, Ishida K, Ohata M, Furuse T, Shu C, Teramoto S, Matsuse T, Sudo E, Orimo H (1993): The effects of aging on the function of alveolar macrophages in mice. Mech Ageing Dev <u>69</u>, 207-217
- Hilmer SN, Cogger VC, Le Couteur DG (2007): Basal activity of Kupffer cells increases with old age. J Gerontol A Biol Sci Med Sci <u>62</u>, 973-978
- **Hoellman** JR, Suttles J, Stout RD (2001): Panning T cells on vascular endothelial cell monolayers: a rapid method for enriching naive T cells. Immunobiology <u>203</u>, 769-777
- Hu S, Chao CC, Khanna KV, Gekker G, Peterson PK, Molitor TW (1996): Cytokine and free radical production by porcine microglia. Clin Immunol Immunopathol <u>78</u>, 93-96
- **Iliev** AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). FASEB J <u>18</u>, 412-414
- **Imamura** N, Hida H, Aihara N, Ishida K, Kanda Y, Nishino H, Yamada K (2003): Neurodegeneration of substantia nigra accompanied with macrophage/microglia infiltration after intrastriatal hemorrhage. Neurosci Res <u>46</u>, 289-298
- **Ingalls** RR, Heine H, Lien E, Yoshimura A, Golenbock D (1999): Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors. Infect Dis Clin North Am <u>13</u>, 341-353
- **Iwasaki** A, Medzhitov R (2004): Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol <u>5</u>, 987-995
- Ji RC (2012): Macrophages are important mediators of either tumor- or inflammation-induced lymphangiogenesis. Cell Mol Life Sci <u>69</u>, 897-891
- **Jones** GE (2000): Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. J Leukoc Biol <u>68</u>, 593-602
- **Jurgens** HA, Johnson RW (2012): Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. Exp Neurol <u>233</u>, 40-48
- Kaisho T, Akira S (2002): Toll-like receptors as adjuvant receptors. Biochim Biophys Acta <u>1589</u>, 1-13
- Karampekios S, Hesselink J (2005): Cerebral infections. Eur Radiol 15, 485-493
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA (2001): Origin of microglia. Microsc Res Tech 54, 2-9
- **Kawanishi** N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K (2010): Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high fat diet-induced obese mice. Exerc Immunol Rev <u>16</u>, 105-118
- Kawasaki T, Kawai T (2014): Toll-like receptor signaling pathways. Front Immunol 5, 461
- **Keating** HJ III, Klimek JJ, Levine DS, Kiernan FJ (1984): Effect of aging on the clinical significance of fever in ambulatory adult patients. J Am Geriatr Soc <u>32</u>, 282-287

- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011): Physiology of microglia. Physiol Rev <u>91</u>, 461-553
- Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, Nayak L, Moss PA (2002): Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. J Immunol <u>169</u>, 1984-1992
- Khanna KW, Markan RB (1999): A perspective on cellular immunity in the elderly. Clin Infect Dis <u>28</u>, 710-713
- Khare V, Sodhi A, Singh SM (1996): Effect of aging on the tumoricidal functions of murine peritoneal macrophages. Nat Immun <u>15</u>, 285-294
- Kim SU, de Vellis J (2005): Microglia in health and disease. J Neurosci Res 81, 302-313
- **Kissin** E, Tomasi M, McCartney-Francis N, Gibbs CL, Smith PD (1997): Age-related decline in murine macrophage production of nitric oxide. J Infect Dis <u>175</u>, 1004-1007
- Kohler S, Wagner U, Pierer M, Kimmig S, Oppmann B, Möwes B, Jülke K, Romagnani C, Thiel A (2005): Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. Eur J Immunol <u>35</u>, 1987-1994
- Kohut ML, Senchina DS, Madden KS, Martin AE, Felten DL, Moynihan JA (2004): Age effects on macrophage function vary by tissue site, nature of stimulant, and exercise behavior. Exp Gerontol <u>39</u>, 1347-1360
- Konat GW, Kielian T, Marriott I (2006): The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. J Neurochem <u>99</u>, 1-12
- **Kovacs** EJ, Palmer JL, Fortin CF, Fülöp T Jr, Goldstein DR, Linton PJ (2009): Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. Trends Immunol <u>30</u>, 319-324
- **Kreutzberg** GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci <u>19</u>, 312-318
- **Kumagai** N, Chiba Y, Hosono M, Fujii M, Kawamura N, Keino H, Yoshikawa K, Ishii S, Saitoh Y, Satoh M, Shimada A, Hosokawa M (2007): Involvement of proinflammatory cytokines and microglia in an age-associated neurodegeneration model, the SAMP10 mouse. Brain Res <u>1185</u>, 75-85
- **Kumar** R, Burns EA (2008): Age-related decline in immunity: implications for vaccine responsiveness. Expert Rev Vaccines <u>7</u>, 467-479
- Kwetkat A (2010): Immunologie im Alter. Präv Gesundheitsf 5, 46-50
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B (2005): Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. Brain Res Brain Res Rev <u>48</u>, 196-206
- Lasser A (1983): The mononuclear phagocytic system: a review. Hum Pathol 14, 108-126
- Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT (2005): Of mice and man: TLR11 (finally) finds profiling. Trends Immunol <u>26</u>, 509-511

- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990): Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience <u>39</u>, 151-170
- Lawson LJ, Perry VH, Gordons S (1992): Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience <u>48</u>, 405-415
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA (2000): Gene-expression profile of the ageing brain in mice. Nat Genet <u>25</u>, 294-297
- Lee S, Varvel NH, Konerth ME, Xu G, Cardona AE, Ransohoff RM, Lamb BT (2010): CX₃CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. Am J Pathol <u>177</u>, 2549-2562
- Libby P (2002): Inflammation in atherosclerosis. Nature 420, 868-874
- Long JM, Kalehua AN, Muth NJ, Calhoun ME, Jucker M, Hengemihle JM, Ingram DK, Mouton PR (1998): Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. Neurobiol Aging <u>19</u>, 497-503
- Luo XG, Ding JQ, Chen SD (2010): Microglia in the aging brain: relevance to neurodegenereration. Mol Neurodegener <u>5</u>, 12
- **Mahbub** S, Brubaker AL, Kovacs EJ (2011): Aging of the innate immune system: an update. Curr Immunol Rev <u>7</u>, 104-115
- Maher FO, Nolan Y, Lynch MA (2005): Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. Neurobiol Aging <u>26</u>, 717-728
- **Mantovani** A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002): Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol <u>23</u>, 549-555
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 25, 677-686
- Mantovani A, Sica A, Locati M (2005): Macrophage polarization comes of age. Immunity 23, 344-346
- Mariani E, Pulsatelli L, Neri S, Dolzani P, Meneghetti A, Silvestri T, Ravaglia G, Forti P, Cattini L, Facchini A (2002): RANTES and MIP-1alpha production by T lymphocytes, monocytes and NK cells from nonagenarian subjects. Exp Gerontol <u>37</u>, 219-226
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004): Microglia promote the death of developing Purkinje cells. Neuron <u>41</u>, 535-547
- Mattson MP (2004): Infectious agents and age-related neurodegenerative disorders. Ageing Res Rev <u>3</u>, 105-120
- McLachlan JA, Serkin CD, Morrey-Clark KM, Bakouche O (1995): Immunological functions of aged human monocytes. Pathobiology <u>63</u>, 148-159
- Medzhitov R, Janeway C Jr (2000): Innate immunity. N Engl J Med 343, 338-344

- Miller AP, Xing D, Feng W, Fintel M, Chen YF, Oparil S (2007): Aged rats lose vasoprotective and anti-inflammatory actions of estrogen in injured arteries. Menopause <u>14</u>, 251-260
- Miller LG, Choi C (1997): Meningitis in older patients: how to diagnose and treat a deadly infection. Geriatrics <u>52</u>, 43-55
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2001): Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order on magnitude. Acta Neuropathol <u>101</u>, 249-255
- Miyaji C, Watanabe H, Toma H, Akisaka M, Tomiyama K, Sato Y, Abo T (2000): Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. Hum Immunol <u>61</u>, 908-916
- Mogensen TH (2009): Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin Microbiol Rev <u>22</u>, 240-273
- Molling JW, Kolgen W, van der Vliet HJ, Boomsma MF, Kruizenga H, Smorenburg CH, Molenkamp BG, Langendijk JA, Leemans CR, von Blomberg BM, Scheper RJ, van den Eertwegh AJ (2005): Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. Int J Cancer <u>116</u>, 87-93
- Mosley RL (1996): Aging, immunity and neuroendocrine hormones. Adv Neuroimmunol <u>6</u>, 419-432
- Mosser DM, Edwards JP (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol <u>8</u>, 958-969
- Mouton CP, Bazaldura OV, Pierce B, Espino DV (2001): Common Infections in Older Adults. Am Fam Physician <u>63</u>, 257-268
- **Murasko** DM, Jiang J (2005): Response of aged mice to primary virus infections. Immunol Rev 205, 285-296
- **Murciano** C, Yanez A, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML (2008): Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against Candida albicans. FEMS Immunol Med Microbiol <u>53</u>, 214-221
- **Murray** PJ, Wynn TA (2011): Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol <u>11</u>, 723-737
- Muta T, Takeshige K (2001): Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. Eur J Biochem 268, 4580-4589
- **Mylonas** KJ, Nair MG, Prieto-Lafuente L, Paape D, Allen JE (2009): Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. J Immunol <u>182</u>, 3084-3094
- Naito M (1993): Macrophage heterogeneity in development and differentiation. Arch Histol Cytol <u>56</u>, 331-351

Nathan C, Ding A (2010): Nonresolving inflammation. Cell 140, 871-882

- Nieman RE, Lorber B (1980): Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. Rev Infect Dis <u>2</u>, 207-227
- **Nimmerjahn** A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science <u>308</u>, 1314-1318
- Njie EG, Boelen E, Stassen FR, Steinbusch HW, Borchelt DR, Streit WJ (2012): *Ex vivo* cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. Neurobiol Aging <u>33</u>, 195
- **Noel** W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A (2004): Alternative ly activated macrophages during parasite infections. Trends Parasitol <u>20</u>, 126-133
- Nolan Y, Maher FO, Martin DS, Clarke RM, Brady MT, Bolton AE, Mills KH, Lynch MA (2005): Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. J Biol Chem <u>280</u>, 9354-9362
- Nomellini V, Gomez CR, Kovacs EJ (2008): Aging and Impairment of Innate Immunity. Contrib Microbiol <u>15</u>, 188-205
- **Norden** DM, Godbout JP (2013): Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. Neuropathol Appl Neurobiol <u>39</u>, 19-34
- Norman DC (1999): Special infectious disease problems in geriatrics. Clin Geriatrics <u>suppl 1</u>, 3-5
- Norman DC, Yoshikawa TT (1996): Fever in the elderly. Infect Dis Clin North Am 10, 93-99
- **O'Mahony** L, Holland J, Jackson J, Feighery C, Hennessy TP, Mealy K. (1998): Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. Clin Exp Immunol <u>113</u>, 213-219
- **Ogata** K, An E, Shioi Y, Nakamura K, Luo S, Yokose N, Minami S, Dan K (2001): Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. Clin Exp Immunol <u>124</u>, 392-397
- **Ogawa** T, Kitagawa M, Hirokawa K (2000): Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. Mech Ageing Dev <u>117</u>, 57-68
- **Okun** E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV (2009): Toll-like receptors in neurodegeneration. Brain Res Rev <u>59</u>, 278-292
- **Pawelec** G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstein B, Wikby A (2005): Human immunosenescence: is it infectious? Immunol Rev 205, 257-268
- **Peinado** MA, Quesada A, Pedrosa JA, Torres MI, Martinez M, Esteban FJ, Del Moral ML, Hernandez R, Rodrigo J, Peinado JM (1998): Quantitative and ultrastructural changes in glia and pericytes in the parietal cortex of the aging rat. Microsc Res Tech <u>43</u>, 34-42
- **Perry** VH (1998): A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. J Neuroimmunol <u>90</u>, 113-121

- **Perussia** B, Dayton ET, Fanning V, Thiagarajan P, Hoxie J, Trinchieri G (1983): Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. J Exp Med <u>158</u>, 2058-2080
- **Peters** A, Sethares C (2002): The effects of age on the cells in layer 1 of primate cerebral cortex. Cereb Cortex <u>12</u>, 27-36
- **Peters** A, Josephson K, Vincent SL (1991): Effects of aging on the neuroglial cells and pericytes within area 17 of the rhesus monkey cerebral cortex. Anat Rec <u>229</u>, 384-398
- **Pfister** G, Weiskopf D, Lazuardi L, Kovaiou RD, Cioca DP, Keller M, Lorbeg B, Parson W, Grubeck-Loebenstein B (2006): Naive T cells in the elderly: are they still there? Ann N Y Acad Sci <u>1067</u>, 152-157
- Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ (2004): Aging and innate immune cells. J Leukoc Bio <u>76</u>, 291-299
- **Plowden** J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S (2004): Innate immunity in aging: impact on macrophage function. Aging Cell <u>3</u>, 161-167
- **Prelog** M (2006): Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? Autoimmun Rev <u>5</u>, 136-139
- **Rajnik** M, Ottolini MG (2000): Serious infections of the central nervous system: encephalitis, meningitis, and brain abscess. Adolesc Med <u>11</u>, 401-425
- **Ransohoff** RM, Perry VH (2009): Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu Rev Immunol <u>27</u>, 119-145
- **Ransohoff** RM, Cardona AE (2010): The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. Nature <u>468</u>, 253-262
- **Reber** AJ, Chirkova T, Kim JH, Cao W, Biber R, Shay DK, Sambhara S (2012): Immunosenescence and Challenges of Vaccination against Influenza in the Aging Population. Aging Dis <u>3</u>, 68-90
- **Redlich** S, Ribes S, Schütze S, Czesnik D, Nau R (2012): Palmitoylethanolamide stimulates phagocytosis of *Escherichia coli* K1 and *Streptococcus pneumoniae* R6 by microglial cells. J Neuroimmunol <u>244</u>, 32-34
- **Redlich** S, Ribes S, Schütze S, Nau R (2014): Palmitoylethanolamide stimulates phagocytosis of Escherichia coli K1 by macrophages and increases the resistance of mice against infections. J Neuroinflammation <u>11</u>, 108
- **Renshaw** M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S (2002): Cutting Edge: Impaired Toll-like Receptor Expression and Function in Aging. J Immunol <u>169</u>, 4697-4701
- **Rezaie** P, Male D (1999): Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. Microsc Res Tech <u>45</u>, 359-382
- Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (2009): Pre-stimulation of microglial cells by Toll-like receptor agonists increases phagocytosis, but not killing of *Escherichia coli* DH5α. Infect Immun <u>77</u>, 557-564
- **Ribes** S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eifert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (2010): Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated Streptococcus pneumoniae by murine microglia. Infect Immun <u>78</u>, 865-871
- **Rockwood** K (1989): Acute confusion in elderly medical patients. J Am Geriatr Soc <u>37</u>, 150-154
- **Rollag** H, Degré M (1981): Effect of interferon preparations on the uptake of non-opsonized Escherichia coli by mouse peritoneal macrophages. Acta Pathol Microbiol Scand B <u>89</u>, 153-159
- **Rollag** H, Mørland B, Degré M (1982): Effect of a homologous beta-interferon preparation on degradation of Escherichia coli and on lysosomal enzyme activities in mouse peritoneal macrophages. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B <u>90</u>, 113-118
- **Rollag** H, Degré M, Sonnenfeld G (1984): Effects of interferon-alpha/beta and interferongamma preparations on phagocytosis by mouse peritoneal macrophages. Scand J Immunol <u>20</u>, 149-155
- **Roumier** A, Béchade C, Poncer JC, Smalla KH, Tomasello E, Vivier E, Gundelfinger ED, Triller A, Bessis A (2004): Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. J Neurosci <u>24</u>, 11421-11428
- **Rozemuller** JM, van Muiswinkel FL (2000): Microglia and neurodegeneration. Eur J Clin Invest <u>30</u>, 469-470
- **Rubach** MP, Bender JM, Mottice S, Hanson K, Weng HY, Korgenski K, Daly JA, Pavia AT (2011): Increasing incidence of invasive Haemophilus influenzae disease in adults, Utah, USA. Emerg Infect Dis <u>17</u>, 1645-1650
- Sandell JH, Peters A (2002): Effects of age on the glial cells in the rhesus monkey optic nerve. J Comp Neurol <u>445</u>, 13-28
- Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschösser C, Asch E, Blasko I, Parson W, Böck G, Schönitzer D, Trannoy E, Grubeck-Loebenstein B (2002): Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1and Th2 cytokines. J Immunol <u>168</u>, 5893-5899
- Saviteer SM, Samsa GP, Rutala WA (1988): Nosocomial infections in the elderly. Increased risk per hospital day. Am J Med <u>84</u>, 661-666
- Scheffel J, Regen T, Van Rossum D, Seifert S, Ribes S, Nau R, Parsa R, Harris RA, Boddeke HW, Chuang HN, Pukrop T, Wessels JT, Jürgens T, Merkler D, Brück W, Schnaars M, Simons M, Kettenmann H, Hanisch UK (2012): Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. Glia 60, 1930-1943
- Schlech WF 3rd, Ward JI, Band JD, Hightower A, Fraser DW, Broome CV (1985): Bacterial meningitis in the United States, 1978 through 1981. The National Bacterial Meningitis Surveillance Study. JAMA 253, 1749-1754
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol <u>75</u>, 163-189

- Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA (1997): Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. N Engl J Med <u>337</u>, 970-976
- **Schütze** S, Loleit T, Zeretzke M, Bunkowski S, Brück W, Ribes S, Nau R (2012): Additive microglia-mediated neuronal injury caused by amyloid- β and bacterial TLR agonists in murine neuron-microglia co-cultures quantified by an automated image analysis using cognition network technology. J Alzheimers Dis <u>31</u>, 651-657
- Schütze S, Ribes S, Kaufmann A, Manig A, Scheffel J, Redlich S, Bunkowski S, Hanisch UK, Brück W, Nau R (2014): Higher mortality and impaired elimination of bacteria in aged mice after intracerebral infection with *E. coli* are associated with an age-related decline of microglia and macrophage functions. Oncotarget: Gerotarget (Focus on Aging) <u>5</u>, 12573-12592
- Sebastián C, Espia M, Serra M, Celada A, Lloberas J (2005): MacrophAging: a cellular and molecular review. Immunobiology <u>210</u>, 121-126
- Shah GN, Mooradian AD (1997): Age-related changes in the blood-brain barrier. Exp Gerontol <u>32</u>, 501-519
- Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K (2007): Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. Glia <u>55</u>, 412-424
- Solana R, Mariani E (2000): NK and NK/T cells in human senescence. Vaccine <u>18</u>, 1613-1620
- Solana R, Pawelec G, Tarazona R (2006): Aging and innate immunity. Immunity 24, 491-494
- **Spreer** A, Gerber J, Baake D, Hanssen M, Huether G, Nau R (2006) Antiinflammatory but no neuroprotective effect of melatonin under clinical treatment conditions in rabbit mod els of bacterial meningitis. J Neurosci Res <u>84</u>, 1575-1579
- Statistisches Bundesamt (Hrsg.): Bevölkerung Deutschlands bis 2060, 12. koordninierte Bevölkerungsvorausberechnung. Wiesbaden 2009, 5-30
- **Stoll** G, Jander S (1999): The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. Prog Neurobiol <u>58</u>, 233-247
- Stout RD, Suttles J (2004): Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. J Leukoc Biol <u>76</u>, 509-513
- **Stout** RD, Suttles J (2005): Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. Immunol Rev 205, 60-71
- **Stout** RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J (2005): Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. J Immunol <u>175</u>, 342-349
- Streit WJ (2006): Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? Trends Neurosci 29, 506-510
- Streit WJ, Kreutzberg GW (1987): Lectin binding by resting and reactive microglia. J Neurocytol <u>16</u>, 249-260

- Streit WJ, Graeber MB (1993): Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. Glia <u>7</u>, 68-74
- Streit WJ, Xue QS (2010): The Brain's Aging Immune System. Aging Dis 1, 254-261
- Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL (2004): Dystrophic microglia in the aging human brain. Glia <u>45</u>, 208-212
- Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA (2001): Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. J Invest Dermatol <u>117</u>, 1027-1035
- **Takahashi** I, Ohmoto E, Aoyama S, Takizawa M, Oda Y, Nonaka K, Nakada H, Yorimitsu S, Kimura I (1985): Monocyte chemiluminescence and macrophage precursors in the aged. Acta Med Okayama <u>39</u>, 447-451
- **Takahashi** K (2000): Development and Differentiation of Macrophages and Related Cells: Historical Review and Current Concepts. J Clin Exp Hematop <u>41</u>, 1-33
- **Tambuyzer** BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ (2009): Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. J Leukoc Biol <u>85</u>, 352-370
- Theele DP, Streit WJ (1993): A chronicle of microglial ontogeny. Glia 7, 5-9
- **Thomas** WE (1992): Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. Brain Res Brain Res Rev <u>17</u>, 61-74
- **Tsukamoto** H, Huston GE, Dibble J, Duso DK, Swain SL (2010): Bim dictates naive CD4 T cell lifespan and the development of age-associated functional defects. J Immunol <u>185</u> 4535-4544
- **United Nations**, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2009): World Population Ageing 2009. New York, USA. December 2009
- van Duin D, Mohanty S, Thomas V, Ginter S, Montgomery RR, Fikrig E, Allore HG, Medzhitov R, Shaw AC (2007): Age-associated defect in human TLR-1/2 function. J Immunol <u>178</u>, 970-975
- van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL (1972): The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bull World Health Organ <u>46</u>, 845-852
- van Rossum D, Hanisch UK (2004): Microglia. Metab Brain Dis 19, 393-411
- VanGuilder HD, Bixler GV, Brucklacher RM, Farley JA, Yan H, Warrington JP, Sonntag WE, Freeman WM (2011): Concurrent hippocampal induction of MHC II pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment. J Neuroinflammation <u>8</u>, 138
- Vaughan DW, Peters A (1974): Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: An electron microscope study. J Neurocytol <u>3</u>, 405-429
- **Vega** VL, De Cabo R, De Maio A (2004): Age and caloric restriction diets are confounding factors that modify the response to lipopolysaccharide by peritoneal macrophages in C57BL/6 mice. Shock <u>22</u>, 248-253
- Vilhardt F (2005): Microglia: phagocyte and glia cell. Int J Biochem Cell Biol 37, 17-21

- Walter L, Neumann H (2009): Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration. Semin Immunopathol <u>31</u>, 513-525
- Wang CQ, Udupa KB, Xiao H, Lipschitz DA (1995): Effect of age on marrow macrophage number and function. Aging (Milano) <u>7</u>, 379-384
- Wassermann M, Levinstein M, Keller E, Lee S, Yoshikawa TT (1989): Utility of fever, white blood cell, and differential count in predicting bacterial infections in the elderly. J Am Geriatr Soc <u>37</u>, 537-543
- Wasserman JK, Yang H, Schlichter LC (2008): Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats. Eur J Neurosci <u>28</u>, 1316-1328
- Weinberger B, Herndler-Brandstetter D, Schwanninger A, Weiskopf D, Grubeck Lobenstein B (2008): Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. Clin Infect Dis <u>46</u>, 1078-1084
- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B (2009): The aging of the immune system. Transpl Int. <u>22</u>, 1041-1050
- Weksler ME, Szabo P (2000): The effect of age on the B-cell repertoire. J Clin Immunol <u>20</u>, 240-249
- Weng NP (2006): Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? Immunity <u>24</u>, 495-499
- Wenger JD, Hightower AW, Facklam RR, Gaventa S, Broome CV (1990): Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. The Bacterial Meningitis Study Group. J Infect Dis <u>162</u>, 1316-1323
- Werner H, Kuntsche J (2000): Infektionen im Alter-was ist anders? Z Gerontol Geriat <u>33</u>, 350-356
- Wessels I, Jansen J, Rink L, Uciechowski P (2010): Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils. Sci World J <u>10</u>, 145-160
- **Wynne** AM, Henry CJ, Godbout JP (2009): Immune and behavioral consequences of microglial reactivity in the aged brain. Integr Comp Biol <u>3</u>, 254-266
- Wynne AM, Henry CJ, Huang Y, Cleland A, Godbout JP (2010): Protracted downregulation of CX(3)CR1 on microglia of aged mice after lipopolysaccharide challenge. Brain Behav Immun <u>24</u>, 1190-1201
- **Yoon** P, Keylock KT, Hartman ME, Freund GG, Woods JA (2004): Macrophage hyporesponsiveness to interferon-gamma in aged mice is associated with impaired signaling through Jak-STAT. Mech Ageing Dev <u>125</u>, 137-143
- **Yoshikawa** TT (1997): Perspective: aging and infectious diseases: past, present, and future. J Infect Dis <u>176</u>, 1053-1057
- **Yoshikawa** TT (2000): Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases. Clin Infect Dis <u>30</u>, 931-933
- Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K (1998): IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1

cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. J Immunol <u>161</u>, 3400-3407

- Young HA (1996): Regulation of interferon-gamma gene expression. J Interferon Cytokine Res <u>16</u>, 563-568
- Young HA, Hardy KJ (1995): Role of interferon-gamma in immune cell regulation. J Leukoc Biol <u>58</u>, 373-381
- **Zhang** D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh SA (2004): A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. Science <u>303</u>, 1522-1526
- **Ziv** Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M (2006): Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. Nat Neurosci <u>9</u>, 268-275

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zahl der gewonnenen peritonealen Makrophagen von jungen und alten Mäusen
Abbildung 2: Morphologie von Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit LPS
Abbildung 3: Vitalität der jungen und alten Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit ma- ximal angewendeten Konzentrationen der TLR-Agonisten
Abbildung 4: Phagozytose von <i>E. coli</i> K1 durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten 40
Abbildung 5: NO-Freisetzung durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nicht-aktivier- tem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 6: TNF-α-Freisetzung durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nicht-akti- viertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 7: IL-6-Freisetzung durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nicht-akti- viertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 8: KC-Freisetzung durch junge und alte Peritonealmakrophagen in nicht-akti- viertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 9: Phagozytose von <i>E. coli</i> K1 durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht- aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 10: NO-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zu- stand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 11: TNF-α-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 12: IL-6-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 13: KC-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen in nicht-aktiviertem Zu- stand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 14: Phagozytose von <i>E. coli</i> K1 durch Peritonealmakrophagen unter Verwendung und Abstinenz von IFN-γ in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten
Abbildung 15: TNF-α-Freisetzung durch Peritonealmakrophagen unter Verwendung und Ab- stinenz von IFN-γ in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR- Agonisten

Abbildung 16	: IL-6-Freisetzung durch Peritonealmakrophagen unter Verwendung und Absti- nenz von IFN-γ in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR- Agonisten
Abbildung 17	: KC-Freisetzung durch Peritonealmakrophagen unter Verwendung und Absti- nenz von IFN-γ in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR- Agonisten
Abbildung 18	: Phagozytose von <i>E. coli</i> K1 durch junge und alte Mikrogliazellen bei Absti- nenz von IFN-γ in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR- Agonisten
Abbildung 19	: TNF- α -Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen bei Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten 68
Abbildung 20	: IL-6-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen bei Abstinenz von IFN- γ in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten 69
Abbildung 21	: KC-Freisetzung durch junge und alte Mikrogliazellen bei Abstinenz von IFN-γ in nicht-aktiviertem Zustand und nach Stimulation mit TLR-Agonisten 71

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufbau und Funktion des Immunsystems	3
Tabelle 2: Wichtige TLR und ihre Liganden	. 9

8.3 Abkürzungsverzeichnis

AP	activator protein
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
COL	CC Chamalvin Lizand
CCR	CC-Chemokin-Ligand
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming unit

CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Oligodesoxynukleotid (Cytosin-Phosphat-Guanin)
CSF	colony stimulating factor
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin
CX ₃ CR1	CX ₃ -Chemokin-Rezeptor 1
DMEM	Dulbecco`s Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
	Ethydon diomintatuoogoigoöyna
	Etnylendiamintetraessigsaure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fc	fragment crystallisable
FCS	fetales Kälberserum
a.	Gramm Erdbaschlaunigung
g CDI	Glamm, Erubeschleungung
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HRP	horseradish peroxidase
II.	
IE	Einheit
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G
IGF	insulin-like-growth factor
ΙκΒ	inhibitor of kappa B
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRAK	interleukin-1 receptor-associated kinase

IRF	interferon regulatory factor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KC	keratinocyte chemoattractant/CXCL1
1 DS	Lipopolysaccharid
	L DS hinden den Droteine
	LPS-bindenden Proteins
LRR	leucine rich repeats
μ	mikro (1 x 10 ⁻⁶)
m	milli (1×10^{-3}) , Meter
Mac1	macrophage-1 antigen
MAL	MyD88 adaptor like protein
МАРК	mitogen-activated protein kinase
МНС	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP	matrix metallopeptidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
n	nano (1×10^{-9}) , Anzahl
Ν	Newton (1×10^5)
NaCl	Natriumchlorid
NF-ĸB	nuclear factor kappa B
NK	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
p	piko (1 x 10 ⁻¹²)
Pam ₃ CSK ₄	N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]- [R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S] lysine

PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PEA	Palmitoylethanolamid
PRR	pattern recognition-Rezeptoren
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
STAT	signal transducer and activator of transcription
ТАК	transforming growth factor activated kinase
TGF	transforming growth factor beta
Th	T-Helferzellen
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	TIR-associated protein
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-like Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β
U	Unit
VEGF	vascular endothelial growth factor
WST	water soluble tetrazolium
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. med. Sandra Schütze für die Überlassung dieses spannenden und zukunftsrelevanten Themas bedanken. Sie hat mich an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt und stand mir während des experimentellen Arbeitens und der Anfertigung der schriftlichen Doktorarbeit zu jeder Zeit hilfsbereit zur Seite. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit!

Herrn Prof. Dr. med. Roland Nau danke ich für seine Anregungen und Hilfen bei Fragen praktischer und theoretischer Art.

Ein großes Dankeschön gilt auch Stefanie Bunkowski für ihre ständige Unterstützung und die wertvolle Hilfe bei den praktischen Arbeiten.

Für die Durchsicht des Manuskriptes danke ich meiner Mutter, Martina Kaufmann.