

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

**Effekt einer Palmitoylethanolamid-  
Prophylaxe auf alte oder neutropenische  
Mäuse nach intrazerebraler *E. coli*-  
Infektion**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Ev-Christin Heide

aus

Lübeck

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in: .....

Ko-Referent/in: .....

Drittreferent/in: .....

Datum der mündlichen Prüfung: .....



Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Effekt einer Palmitoylethanolamid-Prophylaxe auf alte oder neutropenische Mäuse nach intrazerebraler *E. coli*-Infektion" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Bakterielle Meningitis im Alter und bei Immundefizienz .....	1
1.2 Immunantwort des ZNS auf Infektionen mit den Veränderungen im Alter und bei Neutropenie.....	3
1.3 PEA als Immunmodulator.....	5
1.4 Fragestellung .....	7
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1 Material.....	9
2.1.1 Geräte.....	9
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	9
2.1.3 Chemikalien .....	10
2.1.4 Mäuse.....	11
2.1.5 Palmitoylethanolamid (PEA).....	11
2.1.6 Bakterium <i>E. coli</i> K1.....	12
2.2 Methoden.....	12
2.2.1 Versuchsabläufe.....	12
2.2.2 PEA-Injektion, Infektion und Monitoring.....	14
2.2.3 Tötung der Mäuse .....	15
2.2.4 Gewebepräparation.....	16
2.2.5 Bestimmung der Bakterienkonzentration.....	17
2.2.6 Bestimmung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen .....	17
2.2.7 Histologie und Immunhistochemie.....	18
2.3 Statistik.....	22
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
3.1 Der Effekt einer PEA-Prophylaxe auf das Überleben und die Immunantwort alter Mäuse nach intrazerebraler Infektion mit <i>E. coli</i> K1 .....	24
3.1.1 Die PEA-Prophylaxe verlängert das Überleben und verzögert den klinischen Symptombeginn bei alten Mäusen nach intrazerebraler <i>E. coli</i> K1-Infektion .....	24
3.1.2 Die PEA-Prophylaxe senkt die schädliche Entzündung in alten Mäusen während der Akutphase nach intrazerebraler <i>E. coli</i> K1-Infektion.....	35
3.2 Der Effekt einer PEA-Prophylaxe auf das Überleben und die Immunantwort neutropenischer Mäuse nach intrazerebraler Infektion mit <i>E. coli</i> K1 .....	41

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>50</b>
4.1	Steigerung der Resistenz alter Mäuse gegen <i>E. coli</i> -Meningitis durch PEA-Prophylaxe.....	50
4.2	PEA-Prophylaxe bei neutropenischen Mäusen mit <i>E. coli</i> -Meningitis .....	55
4.3	Schlussfolgerungen.....	57
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>68</b>
7.1	Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation.....	68

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsabläufe.....	13
Abbildung 2: Blutagarplatte mit Bakterienkolonien nach quantitativem Ausplattieren von seriellen 1:10-Verdünnungsstufen der Gewebe-Homogenate.....	17
Abbildung 3: Beispielbilder des meningealen Inflammationsscores in CAE-gefärbten Hirnschnitten von Mäusen nach i.c. <i>E. coli</i> K1-Infektion. ....	21
Abbildung 4: Beispielbilder von unterschiedlichen Morphologien Iba-1 <sup>+</sup> -Zellen alter Mäuse nach i.c. <i>E. coli</i> K1-Infektion. ....	22
Abbildung 5: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) auf die Entwicklung und Progredienz einer Meningitis nach i.c. Injektion von 1300 CFU <i>E. coli</i> K1 bei alten Mäusen. ....	27
Abbildung 6: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) auf die Überlebensdauer und den Symptombeginn bei alten Mäusen nach i.c. Injektion von 800 CFU <i>E. coli</i> K1 ohne antibiotische Behandlung. ....	29
Abbildung 7: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis von 0,1 mg/kg) auf die Bakterientiter in Kleinhirn, Milz und im Blut alter Mäuse nach Infektion mit 800 CFU <i>E. coli</i> K1 zum Todeszeitpunkt vor bzw. nach 14 Tagen. ....	31
Abbildung 8: Effekt der PEA-Prophylaxe auf die Iba-1 <sup>+</sup> -Zellanzahl und den Mikroglia-AS in <i>E. coli</i> K1-infizierten (800 CFU pro Maus) alten Mäusen. ....	32
Abbildung 9: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) und Einfluss des Infektionsverlaufs auf den meningealen Inflammationsscore bei <i>E. coli</i> K1-Meningitis in alten Mäusen. ....	34
Abbildung 10: Effekt exogener PEA-Prophylaxe auf die bakterielle Ausbreitung in Cerebellum, Milz, Leber und Blut bei alten Mäusen 24 Stunden nach i.c. Infektion mit <i>E. coli</i> K1.....	36
Abbildung 11: Effekt der PEA-Prophylaxe auf den AS von Mikrogliazellen im Gehirn alter Mäuse 24 Stunden nach Infektion. ....	37
Abbildung 12: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) auf den meningealen Inflammationsscore in alten Mäusen 24 Stunden nach Infektion. ....	38
Abbildung 13: Effekt der PEA-Prophylaxe auf das entzündliche Milieu in der Milz alter Mäuse 24 Stunden nach i.c. Infektion mit <i>E. coli</i> K1. ....	40
Abbildung 14: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) auf die Überlebensdauer neutropenischer Mäuse mit <i>E. coli</i> K1-Meningitis.....	44
Abbildung 15: Effekt einer höheren prophylaktischen Dosis von PEA (1 mg/kg) auf die Überlebenszeit neutropenischer Mäuse nach <i>E. coli</i> K1-Infektion. ....	47
Abbildung 16: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 und 1 mg/kg PEA) auf die Bakterientiter in Kleinhirn, Milz und Blut von neutropenischen Mäusen nach i.c. <i>E. coli</i> K1-Infektion zum Todeszeitpunkt bzw. nach 14 Tagen. ....	49

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinischer Score zur Krankheitsbeurteilung der Mäuse nach Gerber et al. 2001. ....	15
Tabelle 2: Meningealer Inflammationsscore mit der Anzahl CAE-positiver Zellen. ....	20

## Abkürzungsverzeichnis

AUC	<i>Area under the curve</i>
AS	<i>Activation Score</i> (Aktivationscore)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
BW	<i>Body weight</i> (Körpergewicht)
C	Cortex
CA1	<i>Cornu ammonis</i> Region 1
CAE	Chloracetatesterase
CB	Cannabinoid
CFU	<i>Colony-forming units</i> (koloniebildende Einheiten)
CS	<i>Clinical Score</i> (klinischer Score)
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-cup	Eppendorf-Röhrchen
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i> (Fettsäureamid-Hydrolase)
GPR55	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 55
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Iba-1 <sup>+</sup>	<i>Ionizing calcium-binding adapter molecule 1 positive</i>
i.c.	intrazerebral
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharid
LTCF	<i>Long-Term Care Facility</i> (Langzeitpflegeeinrichtung)
MIP-1 $\alpha$	<i>Macrophage inflammatory protein 1alpha</i>
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
NAAA	<i>N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase</i> (NAE-hydrolysierende Säureamidase)
NaCl	Natriumchloridlösung
NAE	N-acylethanolamine
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PPAR $\alpha$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\alpha$
PEA	Palmitoylethanolamid
p. i.	<i>post infectionem</i>
r <sub>s</sub>	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> (Toll-like-Rezeptor)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZTE	Zentrale Tiereinrichtung







# 1 Einleitung

## 1.1 Bakterielle Meningitis im Alter und bei Immundefizienz

Die bakterielle Meningitis ist eine Entzündung der Meningen, insbesondere der Arachnoida und Pia mater, durch Invasion von Bakterien in den Subarachnoidalraum (Flexner 1907). Die Entzündung breitet sich nicht selten auf das Gehirngewebe aus und wird dann als Meningoenzephalitis bezeichnet (Swartz 1984). Trotz moderner Antibiotikatherapien und verbesserter Intensivpflege ist die bakterielle Meningitis heutzutage immer noch eine lebensbedrohliche Erkrankung mit hohen Letalitätsraten bis zu 37 % und schweren Folgeerkrankungen bei bis zu 30 % der Überlebenden (van de Beek et al. 2006). Dabei ist die Letalität einer Meningitis mit *Escherichia coli* (*E. coli*) und übrigen gramnegativen Stäbchen höher als die anderer bakterieller Meningitiden (Pomar et al. 2013; Taziarova et al. 2007). Zudem ist die jährliche Inzidenz einer akuten bakteriellen Meningitis bei Individuen  $\geq 65$  Jahre doppelt so groß wie die von jüngeren Erwachsenen (Domingo et al. 2013), passend zu der allgemein beobachteten Zunahme von Infektionen und deren Schweregrad im Alter (Yoshikawa 2000; Gavazzi und Krause 2002). Möglicherweise liegt der Grund dafür neben dem altersabhängigen Rückgang der Immunfunktion in der Vielzahl an Begleiterkrankungen wie Diabetes und immunsupprimierenden Medikamenten wie Kortikoiden (van Veen et al. 2017). Des Weiteren sind gegen einige Keime wie z. B. *E. coli* keine Impfungen vorhanden, oder ihre immunogene Wirkung ist wegen der altersbedingten Veränderungen des Immunsystems reduziert (Weinberger und Grubeck-Loebenstein 2012). Während die klassischen Pathogene eines immunkompetenten Menschen vorwiegend Pneumokokken und Meningokokken umfassen, hat ein immundefizienter Patient ein ganz anderes Keimspektrum. *E. coli* K1 beispielsweise ist einer der häufigsten Keime der gramnegativen Meningitis bei Neonaten und Kleinkindern. Ebenso kommt er bei Menschen mit Neutropenie und älteren Menschen vor (Escudier et al. 1986; Cabellos et al. 2009; Ribes et al. 2014).

Die Bakterien gelangen über kontinuierliche Ausbreitung bei lokalen Infektionen, auf direktem Weg nach neurochirurgischen Operationen oder offenen Schädelverletzungen und über den Blutstrom ins Gehirn (Koedel et al. 2002). Man geht davon aus, dass die bakteriellen Erreger die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bzw. Blut-Liquor-Schranke (BLS) mit drei wesentlichen Mechanismen überwinden: durch Destruktion der Endothelzellen selbst, durch Zerstörung der Tight-Junctions zwischen den Endothelzellen oder durch Transzytose (Iovino et al. 2013). *E. coli*

überwindet die BHS transzellulär, indem es über Interaktion von mikrobiellen Bestandteilen wie dem *Outer membrane protein A* mit Membranstrukturen des zerebralen mikrovaskulären Endothels Signalkaskaden auslöst, die in der Folge eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts bewirken (Kim 2002 und 2016). Für eine erfolgreiche Überwindung der BHS durch *E. coli* ist ein ausreichend hoher Grad an Bakteriämie, eine Bindung an das zerebrale mikrovaskuläre Endothel und eine Invasion desselben durch lebende Bakterien wichtig. Für das Überleben der Bakterien im zerebralen mikrovaskulären Endothel leistet die Kapsel K1 von *E. coli* durch Verhinderung der Verschmelzung mit Lysosomen einen entscheidenden Beitrag (Kim 2016). Nach Einwanderung und Ausbreitung der Bakterien im zentralen Nervensystem (ZNS) sind verschiedene Mechanismen für die Schädigung des Wirtes verantwortlich, die je nach Pathogen und Immunantwort des Wirtes im Ausmaß variieren. Die Bakterieninvasion verursacht einen möglicherweise direkten Schaden der Neurone durch bakterielle Bestandteile, eine Aktivierung von Mikrogliazellen und eine Entzündung, die zu einer Dysfunktion der BHS, einer Einwanderung von Leukozyten in den Subarachnoidalraum und zu Vaskulitis, Gehirnödem sowie sekundärer Ischämie führt (Nau und Brück 2002). Insbesondere bewirkt die langanhaltende und übermäßige Entzündung über Freisetzung von freien Radikalen, Proteasen, Zytokinen und excitatorischen Aminosäuren durch Mikroglia, Makrophagen und Leukozyten eine Schädigung des ZNS (Gerber und Nau 2010).

Die Symptome der ZNS-Infektion sind bei neutropenischen Patienten zu Beginn häufig diskret mit Fieber und mentalen Veränderungen als einzige klinische Manifestation (Lukes et al. 1984), was die Diagnostik erschwert. Auch beim älteren Menschen wird die Diagnose der bakteriellen Meningitis durch das Ausbleiben der typischen Symptome wie Meningismus und Fieber oft erst spät gestellt (Miller und Choi 1997), wodurch eine potentielle Antibiotikatherapie verzögert wird und die Letalitäts- und Komplikationsrate ansteigen (Domingo et al. 2013). In der Folge präsentiert sich die bakterielle Meningitis im Alter über 65 Jahre bei der Aufnahme häufiger mit schweren neurologischen Symptomen, einschließlich Koma oder Hemiparesen (Cabellos et al. 2009). Die Mortalität kann durch Therapieverzögerung um bis zu 9 % pro Stunde ansteigen (Glimaker et al. 2015). Wenn die antibiotische Therapie nach dem *point of no return* gestartet wird, verstirbt der Patient unabhängig von der Art der Antibiotikatherapie (Nau et al. 2015). Um die Zeit bis zum Beginn der Antibiotikatherapie zu minimieren, empfiehlt die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) den Einsatz von Antibiotika nach der Entnahme von Blutkulturen, aber vor Lumbalpunktion, falls diese verzögert stattfindet oder wegen Hirndruck nicht möglich ist (DGN 2015). Zusätzlich ist die antibiotische Therapie in zahlreichen Ländern durch die steigende Resistenzlage erschwert (Boucher et al. 2009). Folglich sind neue Wege zur Prävention von Infektionen in der immungeschwächten Bevölkerung zur

Dämpfung der zerstörenden Entzündungsreaktion sowie zur Erweiterung des therapeutischen Fensters für potentielle Antibiotikatherapien mit der Folge einer verbesserten Wirkung erforderlich.

## **1.2 Immunantwort des ZNS auf Infektionen mit den Veränderungen im Alter und bei Neutropenie**

Die Immunabwehr des ZNS lässt sich mit dem Aufbau einer mittelalterlichen Burg vergleichen. Die BHS und BLS entsprechen dem äußeren Wall der Burg. Sie kontrollieren oder unterbinden den Eintritt von Pathogenen, gelösten Molekülen oder fremden Zellen in das ZNS. Als Burggraben dient der Liquor sowie die perivaskulären Virchow-Robinschen Räume und als zweiter Wall die Membrana limitans gliae, bestehend aus den astrozytären Zellfortsätzen und einer parenchymalen Basalmembran. Im Inneren der Burg verteidigen Mikrogliazellen die Neurone vor eingedrungenen Feinden (Engelhardt und Coisne 2011).

Als Teil der lokalen Immunabwehr phagozytieren und eliminieren Mikroglia zusammen mit perivaskulären und meningealen Makrophagen Bakterien, die erfolgreich ins ZNS eingedrungen sind (Hanisch und Kettenmann 2007). Ob die Infektion eingedämmt werden kann oder sich weiter ausbreitet und eine Meningitis oder begleitende Sepsis verursacht, wird vermutlich maßgeblich durch die Immunantwort der Mikroglia in den ersten Stunden nach Infektion bestimmt (Nau et al. 2014). Anhand ihrer Morphologie und ihres Funktionsstatus lassen sich Mikroglia in Untergruppen einteilen. Die ruhende oder „überwachende“ Mikroglia beispielsweise scannt kontinuierlich ihre Umgebung und kann extrem schnell innerhalb von Sekunden oder Minuten auf Änderungen mit Wechsel ihres funktionellen Phänotyps reagieren (Nimmerjahn et al. 2005; Hanisch und Kettenmann 2007). Je nach Aktivitätsstadium und Untergruppe können Mikroglia eine neuroprotektive oder bei verlängerter Aktivierung neurotoxische Wirkung auf das ZNS haben (Block et al. 2007; Gerber und Nau 2010). Über die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) an ihrer Zelloberfläche können Mikrogliazellen und Makrophagen Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkennen und über Signalkaskaden die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sowie die Steigerung der Transkription von Genen für inflammatorische Zytokine hervorrufen (Akira et al. 2006). So binden Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien wie *E. coli* an den TLR4, wodurch die Mikrogliazelle als Antwort auf die Aktivierung verschiedene proinflammatorische Mediatoren freisetzt (Kawai und Akira 2010). Einerseits können Mikroglia, die zuvor mit bakteriellen Produkten stimuliert wurden, nachweislich Neurone zerstören (Iliev et al. 2004). Andererseits bewirkte eine Prästimulation von Mikroglia durch Agonisten von TLR1/2, TLR4 und TLR9 eine gesteigerte Phagozytoserate von *E. coli* K1 (Ribes et al. 2009). Zum Schutz des

Nervengewebes durch proentzündliche Mediatoren erscheint es daher sinnvoll, eine Überstimulierung von Mikroglia zu verhindern.

Obwohl das Immunsystem des ZNS durch die BHS und BLS von dem des restlichen Körpers getrennt ist, kommuniziert es mit ihm auf vielfältige Weise zur Aufrechterhaltung der Homöostase (Lucin und Wyss-Coray 2009). Für eine effektive Pathogenbekämpfung im ZNS ist die Interaktion zwischen residenten Immunzellen, Endothelzellen und im Blut zirkulierenden Leukozyten vor Einwanderung der Leukozyten über die BHS elementar (Ribes et al. 2013). Wenn die Bakterienkonzentration im ZNS hoch genug ist, um die Immunabwehr des ZNS zu überwinden, wird die sekundäre Immunantwort durch einwandernde Leukozyten vermutlich die Ausbreitung der Infektion nicht mehr aufhalten können (Nau et al. 2014). Wie sich in In-vivo-Experimenten mit Mäusen zeigte, senkt eine Neutropenie stark die Resistenz des Gehirns gegen eine intrazerebrale (i.c.) *E. coli*-Infektion. Nach Depletion der zirkulierenden Granulozyten mit dem Antikörper Anti-Ly-6G (clone 1A8) war das Überleben signifikant niedriger (40,74 %) als in der Kontrollgruppe (65,39 %), und die Bakterienkonzentrationen waren 30 Stunden nach Infektion in Gehirn und Milz höher (Ribes et al. 2013). Die Einwanderung von Leukozyten ins ZNS hat allerdings auch eine zerstörende Wirkung, insbesondere durch die proinflammatorischen und zytotoxischen Eigenschaften der Neutrophilen (Hoffman und Weber 2009). So haben Leukozyten eine ambivalente Rolle, indem sie einerseits Nervengewebe schädigen können und andererseits an der Bekämpfung von Pathogenen beteiligt sind.

Die Bildung von Chemokinen und Zytokinen wird bei einer bakteriellen Meningitis hochreguliert (Mook-Kanamori et al. 2011; Ribes et al. 2013; Spanaus et al. 1997). Als Reaktion auf Stimulation durch bakterielle Bestandteile können sie von Mikroglia, residenten Makrophagen, Astrozyten, einwandernden Leukozyten und Endothelzellen produziert werden (Ribes et al. 2009; Hanisch und Kettenmann 2007). In neutropenischen Mäusen korrelierte nach i.c. Infektion mit *E. coli* K1 eine hohe bakterielle Last im Kleinhirn mit hohen zerebellären Leveln an Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, *chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (CXCL1) und *macrophage inflammatory protein 2* (MIP-2) (Ribes et al. 2013). Zudem unterstützen Chemokine und Zytokine die Interaktion zwischen peripherem und zentralem Immunsystem. Beispielsweise können sie durch aktiven Transport oder durchlässige Stellen der BHS ins ZNS eindringen (Banks 2015). Auch haben die Zytokine abhängig von ihrer Konzentration und der Dauer sowie dem Zeitpunkt ihrer Ausschüttung sowohl positive wie auch negative Folgen für den Wirtsorganismus (Wang et al. 2002). Es gibt Chemo-/Zytokine mit ausgeprägteren proinflammatorischen Eigenschaften und andere mit einer primär antiinflammatorischen Wirkung (Cavaillon und Haeffner-Cavaillon 1993; Le et al. 2004).

Die Ausführungen verdeutlichen, dass ein durch Bakterien stimuliertes Immunsystem sowohl eine nützliche als auch eine zerstörende Wirkung für den Wirtsorganismus zur Folge haben kann. Auf der einen Seite wird die Phagozytose und Eliminierung des Erregers erhöht, auf der anderen Seite kann das Nervengewebe durch eine übermäßige oder verlängerte Entzündungsreaktion potentiell geschädigt werden.

Insgesamt wird der Organismus im Alter zu einem proinflammatorischen Zustand hin verschoben, wobei ein Großteil der in späteren Lebensphasen hochregulierten Gene an der Regulation entzündlicher Prozesse beteiligt ist (Lee et al. 2000; Alexopoulos und Morimoto 2011). Es finden sich erhöhte Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies – reaktive, Sauerstoff-enthaltende Verbindungen – sowie eine erhöhte Anzahl an aktivierter Mikroglia im Alter (Sparkman und Johnson 2008; Streit et al. 2008). Die Mikroglia ist gekennzeichnet durch eine veränderte Morphologie und eine geringere Phagozytoserate von Pathogenen (von Bernhardt et al. 2015; Schütze et al. 2014). Diese altersassoziierten Veränderungen haben letztendlich den Verlust von Neuronen, eine ineffiziente Beseitigung neurotoxischer Moleküle und eine reduzierte Neurogenese zur Folge (Lucin und Wyss-Coray 2009; Alexopoulos und Morimoto 2011). Nach einer i.c. *E. coli*-Infektionen war die Letalität in alten Mäusen mit 73 % sehr viel höher als in jungen Mäuse, bei denen die Letalität nach Infektion nur 43 % betrug. Zum Todeszeitpunkt fand man bei den alten Mäusen eine vergleichsweise stark erhöhte Konzentration von *E. coli* im Blut (Schütze et al. 2014). Des Weiteren zeigte sich sowohl bei älteren Menschen wie auch in alten Mäusen nach einer Infektion mit Pneumokokken bzw. einer intraperitonealen (i.p.) Stimulation mit LPS eine verlängerte entzündliche Aktivität verglichen mit einer jungen Kontrollgruppe (Bruunsgaard et al. 1999; Tateda et al. 1996). Demnach ist die Modulation der Immunantwort und der Dysfunktion von Mikroglia bei Infektionen im Alter klinisch relevant (Nau und Eiffert 2005; Kaeberlein et al. 2015).

### **1.3 PEA als Immunmodulator**

Ein potenzielles Ziel zur Modulation altersbezogener Dysfunktionen ist das Endocannabinoidsystem (Chiurchiu und Maccarrone 2016; Di Marzo 2008). Es trägt zur Regulation der Entzündungsantwort und der Mikrogliaaktivität im ZNS bei. Chronische Infusionen von Agonisten der Cannabinoidrezeptoren (CB-Rezeptoren) 1 und 2 führten zu einer Steigerung der Neurogenese, einer Reduktion der proinflammatorischen Antwort im Gehirn und einer Verbesserung der Gedächtnisleistung alter Ratten (Marchalant et al. 2008; Marchalant et al. 2009). Jedoch kann die Bindung an den neuronalen CB-Rezeptor 1 unerwünschte kollaterale psychoaktive Effekte verursachen (Zanettini et al. 2011).

Palmitoylethanolamid (PEA), ein endogenes Lipid bestehend aus Palmitoylethanolamid (PEA), ein endogenes Lipid bestehend aus Palmitoylethanolamid (PEA) und Ethanolamid, gehört mit dem Sättigungsfaktor Oleoylethanolamid (OEA) zu der Stoffklasse der Fettsäureethanolamide (Petrosino et al. 2010; Vacondio et al. 2015; Balvers et al. 2013). Beide sind Endocannabinoid-ähnliche Substanzen, da sie mit dem Endocannabinoid N-Arachidonylethanolamin (Anandamid, AEA) Enzyme zur Biosynthese und zum Abbau teilen, sowie ähnliche Zielstrukturen beeinflussen können (Di Marzo und Petrosino 2007). PEA bindet jedoch nicht an den CB-Rezeptor 1 oder 2 und besitzt daher keine psychoaktiven Effekte (Ashton und Glass 2007).

PEA kommt sowohl in verschiedenen Nahrungsmitteln als auch im tierischen und menschlichen Körper vor (Petrosino und Di Marzo 2017). Besonders hohe Konzentrationen von PEA findet man beim Menschen natürlicherweise in der Leber und im Gehirn (Balvers et al. 2013), wo es von Neuronen, Mikroglia und Astrozyten produziert wird (Muccioli und Stella 2008; Stella und Piomelli 2001). In Abhängigkeit vom Gewebe, der Tageszeit oder dem Gesundheitszustand unterliegen die PEA-Spiegel Schwankungen. Beim Abbau spielen zwei Enzyme eine besondere Rolle: die Fettsäureamidhydrolase (FAAH) und die N-Acylethanolamine (NAE)-hydrolysierende Säureamidase (NAAA) (Petrosino et al. 2010).

Im Jahr 1954 wurden erstmals antientzündliche Eigenschaften von einem Eigelb-Extrakt beschrieben (Coburn et al. 1954). Später, zur Geburtsstunde von PEA im Jahr 1957, wurde PEA aus Eigelb isoliert und als antientzündliches Agens identifiziert (Kuehl et al. 1957). Schritt für Schritt wurden daraufhin die antientzündlichen und analgetischen Eigenschaften von PEA in verschiedenen Tiermodellen bestätigt und untersucht. Jedoch sollte es noch zwei Jahrzehnte dauern, bis die Nobelpreisträgerin Rita Levi-Montalcini in den 1990-er Jahren eine grundlegende Arbeit zum Wirkmechanismus von PEA veröffentlichte (Keppel Hesselink 2013). Sie erkannte den modulierenden und inhibierenden Effekt von PEA auf hyperaktivierte Mastzellen als Gegenspieler des *Nerve growth factor* bei Entzündung (Aloe et al. 1993). Damit war das Interesse der Wissenschaftler an PEA erneut geweckt. Heute wissen wir, dass PEA neben anderen Rezeptoren wie dem *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1; Ambrosino et al. 2013) oder dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor 55 (GPR55; Pertwee 2007) hauptsächlich über den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor des Subtyps alpha (PPAR $\alpha$ ; LoVerme et al. 2005 und 2006) seine Wirkung entfaltet. PPAR $\alpha$  gehört ebenso wie seine Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$  zu der Familie der ligandenaktivierten nukleären Hormonrezeptoren und beteiligt sich an der Regulation von Entzündungsprozessen durch Suppression der Transkription von Genen für proinflammatorische Mediatoren (Straus und Glass 2007). Obwohl PEA nicht direkt an CB-Rezeptoren bindet, nimmt man an, dass PEA über den so genannten *entourage effect* CB-



Rezeptoren indirekt aktiviert, indem es die Endocannabinoidlevel beispielsweise durch Hemmung von FAAH erhöht (Petrosino und Di Marzo 2017; Jonsson et al. 2001).

Auch das Spektrum an bekannten Eigenschaften von PEA hat sich erweitert. Heutzutage ist PEA für seine antientzündlichen, analgetischen, aber auch antikonvulsiven und neuroprotektiven Wirkungen bekannt und wird in diesen Bereichen therapeutisch eingesetzt (Skaper and Facci 2012; Calignano et al. 1998; Lambert et al. 2001; Esposito und Cuzzocrea 2013). Obwohl es zu der antiinfektiösen Eigenschaft von PEA schon frühe Studien aus den 1970-er Jahren gibt, wurde diese Wirkung lange Zeit vernachlässigt. Erste präklinische Studien von 1972 zeigten nämlich, dass die orale Vorbehandlung mit PEA in einer Dosis von 50 mg/kg an zwölf aufeinanderfolgenden Tagen die Immunabwehr von Mäusen gegenüber dem Toxin von *Shigella dysenteriae*, Streptolysin O und lebenden *Streptokokken* der Gruppe A erhöhte (Raskova et al. 1972). Kürzlich wurden diese vielversprechenden anfänglichen Ergebnisse wieder aufgegriffen. In einem Experiment, das vom Versuchsdesign dem Meinigen ähnlich ist, wurde bei immunkompetenten, jungen Mäusen nach PEA-Prophylaxe eine erhöhte Resistenz gegen eine i.c. *E. coli* K1-Infektion mit einem verlängerten Überleben und einem reduzierten Chemokin- und Zytokinlevel festgestellt (Redlich et al. 2014).

#### **1.4 Fragestellung**

Der häufig komplizierte und letale Verlauf bakterieller Meningitiden im Alter, das enge therapeutische Fenster, das ohnehin schon erhöhte entzündliche Milieu im Alter und das Fehlen einer Impfung gegen *E. coli* verdeutlichen den hohen Bedarf an prophylaktischen Substanzen zur Steigerung der Resistenz gegen *E. coli*-Meningitis und andere durch *E. coli* verursachte Infektionen bei immungeschwächten älteren Personen. PEA erwies sich schon in Tierexperimenten mit immunkompetenten jungen Mäusen als antientzündliches und Phagozytose-steigerndes Agens und erhöhte nachweisbar die Resistenz gegen i.c. *E. coli*-Infektionen (Redlich et al. 2014). Ob prophylaktisches PEA auch bei Immunschwäche die Anfälligkeit für i.c. *E. coli*-Infektionen senkt und der zerstörenden Entzündung entgegenwirkt, ist unseres Wissens noch nicht untersucht worden. Dabei müssen zwei verschiedene Mausmodelle von Immundefizienz unterschieden werden - alte und neutropenische Mäuse. Zunächst stellten wir uns die Frage, ob prophylaktisch appliziertes PEA bei alten oder neutropenischen Mäusen die Überlebensrate oder -zeit steigert. Weiterhin interessierten wir uns für potenzielle Wirkmechanismen von PEA, v. a. in der frühen Phase nach Infektion. Hat eine Prophylaxe mit PEA einen dämpfenden Effekt auf die bakterielle Streuung und die starke Entzündungsreaktion mit erhöhten Entzündungsmediatoren und einer verstärkten

Mikrogliaaktivierung? Entfaltet i.p. verabreichtes PEA seine Wirkung sowohl in der systemischen Zirkulation als auch lokal im Gehirn?

Das Ziel dieser Arbeit ist es folglich, den lebensverlängernden, immunmodulatorischen und antientzündlichen Effekt von prophylaktisch appliziertem PEA in alten oder neutropenischen Mäusen nach i.c. *E. coli* K1-Infektion ohne antibiotische Behandlung zu untersuchen. PEA könnte als Prophylaktikum ein vielversprechendes Agens sein, das potenzielle therapeutische Fenster zu erweitern, der zerstörenden Entzündungsreaktion entgegenzuwirken und die Resistenz von immungeschwächten Menschen gegen bakterielle Meningitis in der klinischen Anwendung zu erhöhen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Ausgießstation, Medite (Orlando, Florida, USA)

Einbettautomat, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Eppendorf Centrifuge 5417R, Schütt Labortechnik (Hamburg, Deutschland)

Finnpipetten, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

IKA Vortex MS1, IKA (Staufen, Deutschland)

Inkubator, Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)

IMark Microplate-Reader, Bio-Rad Laboratories (Hercules, Kalifornien, USA)

Mikroskop Olympus BX51, Olympus (Hamburg, Deutschland)

Mikrowelle, Panasonic (Kadoma, Japan)

Pipetten, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Sartorius excellence Waage, Sartorius GmbH (Göttingen, Deutschland)

Schlittenmikrotom, Leica Biosystems (Wetzlar, Deutschland)

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Blutagarplatten, Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Mikrobiologie (Göttingen, Deutschland)

Deckgläschen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

*E. coli* K1 (Stereotyp O18:K1:H7) von Dr. G. Zysk, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf, Deutschland)

0,5-ml-, 1,5-ml- und 2-ml-Eppendorf-Cups, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

15-ml-BD-Falcon-Röhrchen, Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)

26 G x ½"-Insulin-Kanülen (Ø 0,45 x 12 mm), Braun (Melsungen, Deutschland)

1-ml-Insulin-Spritzen, Braun (Melsungen, Deutschland)

Objektträger, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Parafilm, Pechiney Plastic Packaging (Chicago, Illinois, USA)

Pipettenspitzen, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Präparationsbesteck, Aesculap AG (Tuttlingen, Deutschland)

96-Well-Platten, Nunc (Roskilde, Dänemark)

### 2.1.3 Chemikalien

Anti-Iba 1 (Rabbit), Wako Chemicals GmbH (Neuss, Deutschland)

Anti-Ly-6G-Antikörper clone 1A8, Bioxcell (West Lebanon, New Hampshire, USA)

Anti-Rabbit Ig, GE Healthcare (Little Chalfont, United Kingdom)

Aqua bidest, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Aqua Tex, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Avidin-Biotin-Komplex, Vector Laboratories (Burlingame, California, USA)

Blockpuffer (15 ml Natriumazidlösung + 15 g Sucrose + 3 g Bovines Serumalbumin (BSA) + 300 ml PBS)

Citronensäure, Merck (Darmstadt, Deutschland)

DePeX, Serva (Heidelberg, Deutschland)

Diaminobenzidin, Roche (Mannheim, Deutschland)

Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

DuoSet-ELISA-Development Kit mit Capture-Antikörper-Lösung (5 ml PBS + 27,5 µl Capture-Antikörper) und Detektionsantikörperlösung (pro Mikrotiterplatte 5 ml Reagent Diluent + 27,5 µl Antikörper), R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) und Biozol (Eching, Deutschland)

Esel-Serum, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

Ethanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Fast-Red-Violet LB Standardlösung, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

4%ige Formaldehydlösung, Merck (Darmstadt, Deutschland)

HRP-Diluent (40 ml Waschpuffer + 40 mg BSA + 1 µl Streptavidin)

Isopropanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Ketamin 10 %, Medistar (Ascheberg, Deutschland)

Magermilch, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Mayer's Hämalaunlösung, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Naphtol-AS-D-Chloracetat-Lösung, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

0,9%ige Natriumchloridlösung, Braun (Melsungen, Deutschland)

Natrium-Nitrit-Lösung, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

Palmitoylethanolamid als Trockensubstanz, Tocris (London, United Kingdom)

*Phosphate buffered saline* (PBS), Biochrom (Berlin, Deutschland)

Reagent Diluent (1 g BSA + 100 ml PBS)

Rinderserumalbumin (BSA), Merck (Darmstadt, Deutschland)

Schwefelsäure, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Stopplösung: 1-molare Schwefelsäure

Streptavidin, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substratlösung, Moss Inc. (Pasadena, Maryland, USA)

Trizmal-6,3-Puffer, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

Tween 20, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Wasch-Puffer (0,5 g Tween 20 + 1 l PBS)

Wasserstoffperoxid, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Xylazin 2 %, Riemser Arzneimittel AG (Greifswald, Deutschland)

Xylol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

#### **2.1.4 Mäuse**

Alle Versuche wurden mit der Genehmigung des Niedersächsischen Landesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) nach Befürwortung durch die Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen (UMG; Ethiknummer: 14/1553) unter Einhaltung der „*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*“ (ARRIVE) Richtlinien (Kilkenny et al. 2010) durchgeführt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Die Unterbringung der Versuchstiere und die Tierversuche erfolgten in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der UMG.

Insgesamt wurden 131 Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 von den Züchtern Janvier (LeGenest-Saint-Isle, Frankreich), Charles River (Wilmington, USA) und der ZTE in die Versuche eingeschlossen, darunter 73 Weibchen und 58 Männchen. Das mediane Körpergewicht (BW) zum Versuchsbeginn lag je nach Alter bei den 18-19 Monate alten Mäusen bei 33,0 g und bei den jungen, 8-14 Wochen alten Mäusen bei 19,9 g. Die Mäuse wurden in Käfigen bei konstanter Raumtemperatur (RT) von 20 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % mit einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus und freiem Zugang zu Futter und Trinken gehalten. Zur Differenzierung wurden die Mäuse zu Beginn jedes Versuchs an ihren Schwänzen mit einem Filzstift markiert, wobei die Zuweisung zu den einzelnen Untersuchungsgruppen per Zufallsprinzip erfolgte.

#### **2.1.5 Palmitoylethanolamid (PEA)**

Das verwendete PEA wurde von der Firma Tocris als Trockensubstanz erstanden. Mit dem Ziel, eine 2-, 10- bzw. 20-mM Stocklösung herzustellen, wurde die Trockensubstanz wie nach Herstellerangaben in 100%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) unter Erwärmung in einem Wasserbad (45 °C) gelöst. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert, mit Alufolie lichtabschirmend verpackt und wegen der Gefahr der Hydrolyse durch Enzyme bei -80 °C aufbewahrt (Balvers et al. 2013).

Vor jeder intraperitonealen Injektion wurde die Stocklösung je nach Mäusegewicht und Zieldosis in unterschiedlichen Volumina isotoner Natriumchloridlösung (NaCl) gelöst, sodass jede Maus der Versuchsgruppe abhängig von der Fragestellung eine Dosis von 0,1 mg/kg PEA oder 1 mg/kg PEA in 250 µl 0,9%igem NaCl erhielt. Die Kontrollgruppe wurde jeweils mit 250 µl 0,9%igem NaCl und einer darin enthaltenen, der PEA-Gruppe äquivalenten Menge an DMSO behandelt. Bei alten Mäusen entsprach dies einer maximal 0,5%igen und bei neutropenischen Mäusen einer maximal 1,6%igen DMSO/NaCl-Lösung. Die intraperitoneale Gabe von PEA wurde gewählt, um den Stress für die Mäuse gering zu halten und eine exakte Dosierung zu ermöglichen.

### **2.1.6 Bakterium *E. coli* K1**

Zur Induktion der Meningitis wurde das Bakterium *E. coli* mit der antiphagozytisch wirkenden Kapsel K1 (Serotyp O18:K1:H7) verwendet, das ursprünglich aus dem Liquor eines an neonataler Meningitis erkrankten Kindes isoliert und von Dr. G. Zysk (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde.

Die *E. coli*-Stammlösung wurde bei -80 °C gelagert. Vor Versuchsbeginn wurde ein Teil der Stammlösung auf Blutagarplatten aufgetragen. Nach einer 24-stündigen Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die gewachsenen Kolonien in 0,9%igem NaCl resuspendiert, aliquotiert und erneut bei -80 °C aufbewahrt. Alle Versuche wurden mit Aliquots der selben Bakterienkultur durchgeführt. Vor Beginn der Infektionen wurde ein Aliquot aufgetaut und die Bakterienkonzentration durch quantitatives Ausplattieren bestimmt. Am Infektionstag wurden die Lösungen je nach erforderlicher Infektionsdosis mit unterschiedlichen Volumina isotoner Kochsalzlösung verdünnt und den Mäusen jeweils 10 µl i.c. injiziert. Zur Überprüfung der tatsächlichen Konzentration wurden jeweils 10 µl der injizierten Bakterienlösung bzw. der um den Faktor zehn verdünnten Lösungen von 1:10 bis 1:10<sup>5</sup> auf Blutagarplatten plattiert und diese für 24 Stunden inkubiert. Aus der Anzahl der koloniebildenden Einheiten wurde die Bakterienkonzentration des Inokulums in *colony-forming units* (CFU) *E. coli*/ml ermittelt.

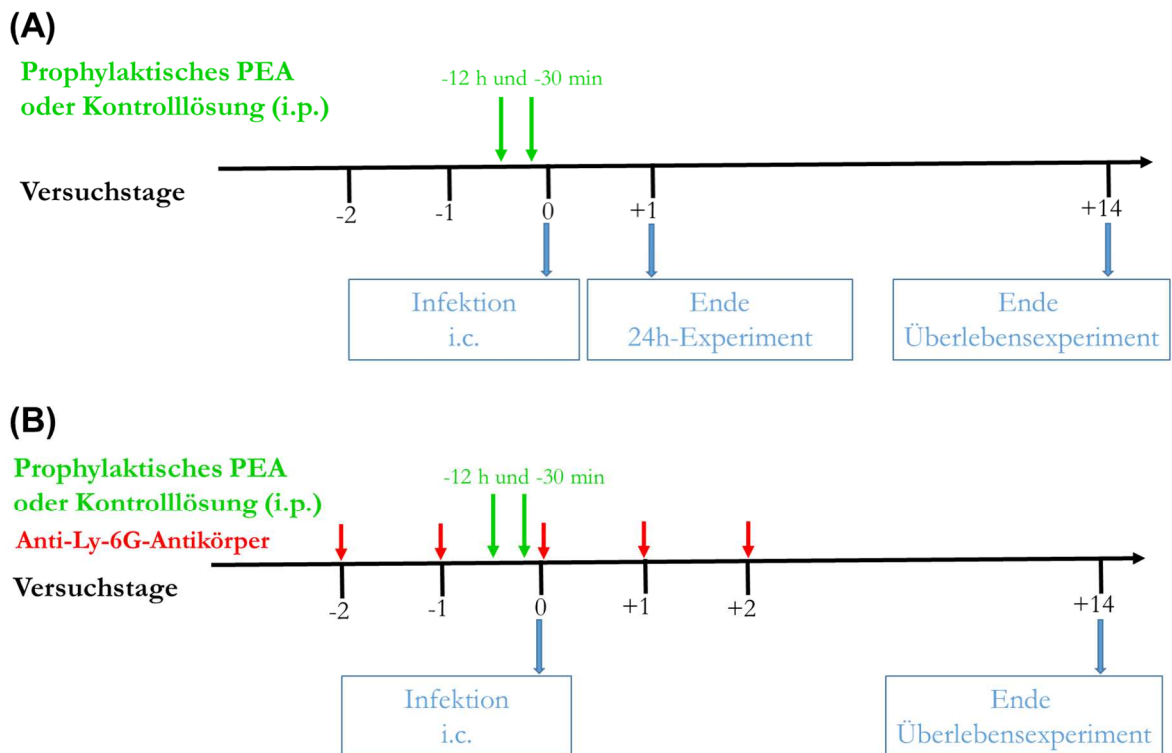
## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Versuchsabläufe**

Zur Untersuchung der Fragestellungen wurden zwei Versuchsabläufe gewählt: Überlebens- und 24 h-Versuche. Bei den Überlebensversuchen war der primäre Outcome-Parameter das unterschiedlich lange Überleben der Versuchs- und Kontrollgruppe in den 14 Tagen nach

Infektion. Bei den 24 h-Experimenten lag der Fokus auf dem Vergleich der Immunabwehr in der Frühphase 24 Stunden nach Infektion.

Der schematische Ablauf der Überlebensversuche ist in Abbildung 1 gezeigt. 12 Stunden und erneut 30 Minuten vor Infektion wurde der Versuchsgruppe eine PEA-Lösung und der Kontrollgruppe eine äquivalente DMSO/NaCl-Lösung i.p. appliziert. Bei der Tötung nach 14 Tagen oder bei Erfüllung der Abbruchkriterien (siehe Kapitel 2.2.3) wurden als sekundäre Outcome-Parameter die Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut bestimmt sowie die Mikroglia-Dichte und -Aktivierung sowie die Granulozyten-Infiltration mittels *Ionizing calcium-binding adaptor molecule 1* (Iba-1)- und Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase (CAE)-Färbung in Gehirnschnitten quantifiziert (s. u.). Überlebensversuche erfolgten an zwei verschiedenen Tiermodellen von Immunschwäche, nämlich an alten (18-19 Monate; Abbildung 1A) und an neutropenischen Mäusen (Abbildung 1B).



**Abbildung 1: Versuchsabläufe.** Den Mäusen wurde 12 Stunden und erneut 30 Minuten (grüne Pfeile) vor Infektion je nach Gruppe eine PEA-Lösung bzw. die äquivalente Kontrolllösung ohne PEA i.p. appliziert. Zum Zeitpunkt 0 wurden die Mäuse durch i.c. Infektion von *E. coli* K1 infiziert. In den Überlebensexperimenten wurden die Mäuse 14 Tage nach und in den 24 h-Experimenten 24 Stunden nach Infektion getötet. Überlebensversuche erfolgten an zwei verschiedenen Tiermodellen von Immunschwäche, nämlich an alten **(A)** und neutropenischen Mäusen **(B)**. Die Neutropenie wurde durch tägliche Behandlung mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper (clone 1A8) in einem Zeitraum von zwei Tagen vor bis drei Tage nach Infektion induziert.

Zur Untersuchung des Effekts der PEA-Prophylaxe auf alte Mäuse wurden insgesamt 50 C57BL/6-Mäuse im Alter von 18-19 Monaten, wie oben erläutert, mit einer PEA-Dosis von 0,1 mg/kg bzw. einer äquivalenten DMSO-Dosis behandelt. Bei den Überlebensversuchen erhielten in einem Versuchsansatz zwölf Mäuse der ZTE Göttingen eine höhere Menge an Bakterien von 1300 CFU pro Maus und in den beiden anderen Versuchsansätzen 18 Janvier-Mäuse eine niedrigere Bakterienmenge von 800 CFU pro Maus durch i.c. Applikation. Zu diesem Tiermodell führten wir aufgrund der Ergebnisse der Überlebensversuche zwei 24 h-Versuche durch (n = 20). Im Gegensatz zu den Überlebensversuchen wurden alle Mäuse 24 Stunden nach Infektion getötet. Es wurden sowohl Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz, Leber und Blut bestimmt als auch Iba-1- und CAE-Färbungen von Gehirnschnitten angefertigt und Chemokinlevel in Milz und Kleinhirn gemessen. Darüber hinaus wurden acht nicht infizierte alte Mäuse 24,5 Stunden nach Injektion einer Kontrolllösung getötet, um die Morphologie von Mikroglia in alten gesunden Mäusen zu beurteilen.

Um den prophylaktischen Effekt von PEA in neutropenischen Mäusen zu untersuchen, wurden 73 C57BL/6-Wildtyp-Mäuse zusätzlich zu dem o.g. Ablauf der Überlebensversuche einmal täglich mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper (clone 1A8) in einem Zeitraum von zwei Tagen vor bis drei Tage nach Infektion behandelt. Dieser depletiert spezifisch und systemisch neutrophile Granulozyten (Daley et al. 2008; Fleming et al. 1993). Analog zu vorherigen Versuchen (Ribes et al. 2013) wurde den Mäusen je 50 µg des Antiköpers in einem Volumen von 250 µl sterilem, 0,9%igem NaCl i.p. verabreicht. Es erfolgten zwei Versuche (n = 30) mit einer niedrigeren Dosis von 0,1 mg PEA/kg und zwei weitere Versuche (n = 43) mit einer höheren Dosis von 1 mg PEA/kg.

Prof. Dr. med. R. Nau und PD Dr. rer. nat. S. Ribes entwarfen das Grundkonzept der Studie. Die Tierexperimente und ihre Auswertung führten meine Betreuerin PD Dr. rer. nat. S. Ribes und ich in gleichen Anteilen durch. Das Messen der Chemokin- und Zytokinlevel sowie die Herstellung und Färbung der histologischen Schnitte wurden von der Medizinisch-technischen Assistentin des Instituts für Neuropathologie, AG Neuroinfektiologie, UMG, Frau S. Bunkowski übernommen. An der statistischen Auswertung waren Prof. Dr. med. R. Nau, PD Dr. rer. nat. S. Ribes, PD Dr. rer. nat. D. Malzahn von der Abteilung „Genetische Epidemiologie“ der UMG und ich beteiligt.

### **2.2.2 PEA-Injektion, Infektion und Monitoring**

Zur PEA-Prophylaxe wurde den Tieren 12 Stunden und erneut 30 Minuten vor dem Zeitpunkt 0, definiert als Zeitpunkt der Infektion, je 250 µl der PEA- bzw. Kontroll-Lösung i.p. in den



linken Unterbauch appliziert mit einer Dosis wie in 2.1.5 beschrieben (Redlich et al. 2014; Genovese et al. 2008).

Am Infektionstag wurde die Bakterienlösung, wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben, aus -80 °C aufgetaut und mit sterilem, 0,9%igem NaCl bis zur gewünschten Infektionsdosis verdünnt. Es wurde eine Erregerdosis angestrebt, bei der die Letalität in den Überlebensversuchen in der Kontrollgruppe ca. 80% und in den 24 h-Versuchen 100 % betrug. Die Anästhesie 10 Minuten vor Infektion erfolgte durch eine i.p. Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg). Nach Prüfung der Narkosetiefe mittels Zwischenzehen- und Umdrehreflexen erfolgte die anschließende Infektion mit 10 µl der Bakterienlösung in den oberflächlichen rechtsfrontalen Kortex und Subarachnoidalraum durch eine 2 mm tiefe Einstichstelle im vorderen Drittel auf einer Linie zwischen rechtem Auge und Ohr (Gerber et al. 2001; Ribes et al. 2013). Im Gegensatz zu der Injektion in den Spinalkanal oder in die Cisterna magna erreicht so das gesamte Inokulum das ZNS.

Von Beginn bis zum Ende eines Versuchs wurde bei den Mäusen ein Monitoring wie zuvor berichtet durch Erhebung eines klinischen Scores (CS) und des BW durchgeführt, nach der Infektion zunächst alle 6 Stunden und dann abhängig vom Gesundheitszustand der Mäuse mindestens einmal täglich (Ribes et al. 2013; Schütze et al. 2014). Der CS nach Gerber et al. (2001; Tabelle 1) beurteilt die Gesundheit einer Maus unter Berücksichtigung von Aspekten wie Aktivität und Körperhaltung anhand eines Scores von 0 (gesund) bis 4 (tot).

**Tabelle 1: Klinischer Score zur Krankheitsbeurteilung der Mäuse nach Gerber et al. 2001.**

<i>Clinical Score</i> (klinischer Score, CS)	Klinische Symptomatik
0	normal aktiv
1	weniger aktiv
2	zusammengekauert, aber gehfähig
3	bewegungsunfähig, abnorme Körperhaltung, Diarrhoe, Dyspnoe, Automutilation
4	tot

### 2.2.3 Tötung der Mäuse

Ein Tier wurde aus ethischen Gründen vor Ende des Versuchs getötet, wenn es die Abbruchkriterien erfüllte, d. h. dass es entweder  $\geq 20$  % des initialen BW verloren oder einen CS von 3 erreicht hatte. In der Kaplan-Meier-Kurve wurde der Zeitpunkt der Tötung als

Todeszeitpunkt gesetzt. Die übrigen Mäuse wurden im Überlebensexperiment 14 Tage und im 24 h-Experiment 24 Stunden nach Infektion getötet.

Dazu wurden die Mäuse mit einer Ketamin-Xylazin-Lösung in gleicher Dosierung wie bei Infektion anästhesiert und die Narkosetiefe überprüft. Die Blutentnahme von 0,6-0,9 ml Blut abhängig vom BW erfolgte durch kardiale Punktion. Zunächst wurde die Punktionsstelle mit 70%igem Ethanol desinfiziert, die Maus in Rückenlage mit einer Hand fixiert und mit der anderen Hand die Punktion senkrecht zur Körperoberfläche auf Höhe des schlagenden Herzens linksseitig vom Sternum durchgeführt. Nach erneuter Überprüfung der Narkosetiefe wurden die Mäuse anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

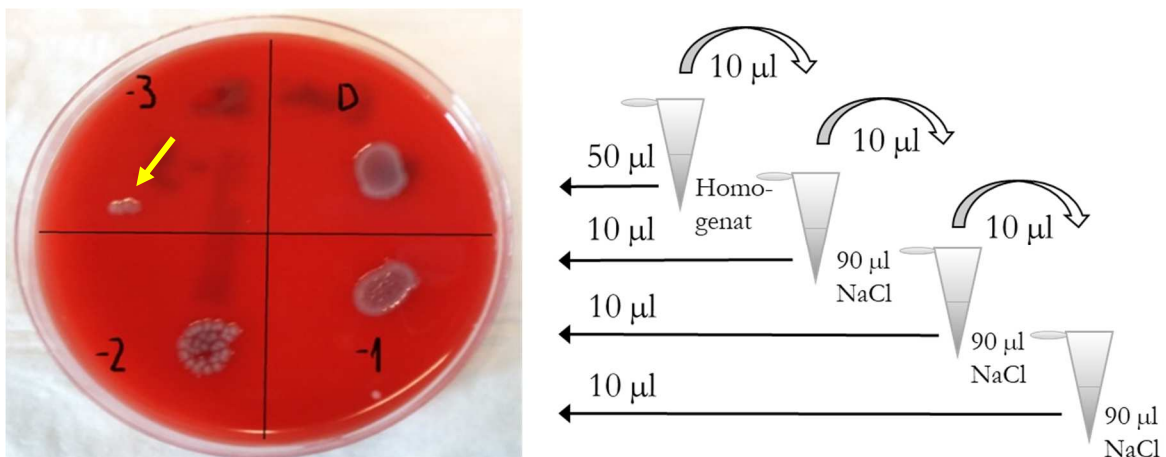
#### **2.2.4 Gewebepreparation**

Von dem Blut wurden 10 µl direkt in 90 µl NaCl gelöst und in weiteren Verdünnungsstufen zur Bestimmung der Bakterienkonzentration auf Agarplatten aufgetragen, während der Rest des Blutes in ein leeres 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen (E-cup) zur 30-minütigen Koagulation bei 4 °C gegeben wurde. Nach 30 Minuten wurde das geronnene Blut für 10 Minuten bei 4 °C und einer relativen Zentrifugalkraft von 3000 xg zentrifugiert, danach das Serum mit einer Pipette aufgenommen und in einem 1,5-ml-E-cup bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Entnahme der gewünschten Organe wurde die Bauchhöhle mit einer chirurgischen Schere eröffnet. Die Milz und beim 24 h-Experiment auch die Leber wurden entnommen. Mit weiteren Schnitten wurden der Kopf abgetrennt, das Fell am Kopf entfernt und mithilfe einer Pinzette die Kalotte und Hirnhäute stückweise abgelöst. Das Cerebrum ohne das zuvor manuell abgetrennte Kleinhirn wurde in ein 15-ml-Röhrchen gegeben und für zwei bis drei Tage in 7 ml 4%iger Formaldehydlösung und danach in *Phosphate buffered saline* (PBS) im Kühlschrank bei 4 °C bis zur Einbettung in Paraffin aufbewahrt. In dem 24 h-Experiment wurde nur die linke Hemisphäre in Formaldehyd fixiert und die rechte Hemisphäre bei -80 °C gelagert. Nach Halbierung von Kleinhirn, Milz und Leber auf einer Paraffinfolie wurde jeweils eine Hälfte sofort auf Trockeneis gelegt und anschließend in einem leeren 1,5-ml-E-cup bei -80 °C aufbewahrt. Die andere Hälfte wurde in einem weiteren E-cup in einem Verhältnis von 1:10 im Kleinhirn, von 1:5 in der Milz und von 1:2 in der Leber mit isotonem NaCl verdünnt und mechanisch homogenisiert. Beim Homogenisieren wurde durch Mörsern und Vortexen mithilfe eines Handhomogenisators eine feine Suspension hergestellt, die auf Agarplatten zur Bakterienkonzentrationsbestimmung aufgetragen wurde (siehe Kapitel 2.2.5). Milz- und Kleinhirn-Homogenate wurden bei -20 °C zur Bestimmung der Zyto- und Chemokinlevel aufbewahrt. Das Kleinhirn wurde gewählt, da es das größte Verhältnis von Meningen zu Gehirngewebe im Vergleich zum Neokortex aufweist.

### 2.2.5 Bestimmung der Bakterienkonzentration

Zur Bestimmung der Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Leber wurden jeweils die Homogenate sowie 10  $\mu\text{l}$  der Verdünnungsstufen von 1:10 bis maximal 1:10<sup>5</sup> auf die Agarplatten aus Schafsblut nebeneinander aufgetragen (Abbildung 2). Von dem 1:10 verdünnten Blut wurden 10  $\mu\text{l}$  sowie weitere drei 1:10-Verdünnungsstufen ausplattiert. Danach wurden die Platten für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und die abzugrenzenden Kolonien gezählt. Diese wurden in eine Bakterienkonzentration von CFU *E. coli*/g des Ausgangsgewebes, bzw. von CFU *E. coli*/ml des Blutes, umgerechnet und der Mittelwert gebildet. Die Detektionsgrenze lag im Kleinhirn bei 200 CFU/g, in der Milz bei 100 CFU/g und in der Leber bei 40 CFU/g. Im Blut konnten Konzentrationen von  $\geq 1000$  CFU/ml noch detektiert werden. Alle Tiere, die Werte unter der Nachweisgrenze aufwiesen, erhielten für die nicht-parametrische statistische Analyse (s. u.) im Kleinhirn den Wert 199 CFU/g, in der Milz den Wert 99 CFU/g und in der Leber den Wert 39 CFU/g und im Blut den Wert 999 CFU/ml.



**Abbildung 2: Blutagarplatte mit Bakterienkolonien nach quantitativem Ausplattieren von seriellen 1:10-Verdünnungsstufen der Gewebe-Homogenate.** Nach Herstellung der Homogenate wurden davon 50  $\mu\text{l}$  direkt (D) auf eine Blutagarplatte aufgetragen. Anschließend erfolgte das Ausplattieren von 10  $\mu\text{l}$  weiterer 1:10-Verdünnungsstufen (hier von -1 bis -3 abgebildet). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C konnte anhand der Anzahl der Kolonien die Bakterienkonzentration in CFU *E. coli*/g im Gewebe ermittelt werden. Der gelbe Pfeil markiert zwei Bakterienkolonien.

### 2.2.6 Bestimmung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen

In dem 24 h-Experiment wurden die proinflammatorischen Zytokine (IL-6 und IL-1 $\beta$ ) und proinflammatorischen Chemokine (CXCL1 und MIP-1 $\alpha$ ) in Kleinhirn- und Milz-Homogenaten gemessen. Zur Bestimmung der Konzentrationen wurde die Methode eines Sandwich-ELISAs (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) unter Gebrauch des DuoSet-ELISA-Development Kits gewählt. Hierbei wird das nachzuweisende Zytokin bzw. Chemokin an zwei Antikörper

gebunden. Durch Zugabe eines Enzyms, das an diesen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex bindet, und des entsprechenden Substrates kommt es zu einem Farbumschlag, der eine photometrische Quantifizierung ermöglicht.

Je 50 µl der mit PBS verdünnten Capture-Antikörper-Lösung wurden in die Näpfe der Mikrowell-Platten gegeben, die als feste Phase für den Capture-Antikörper dienen. Nach Inkubation über Nacht bei RT und dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 300 µl Blockpuffer pro Napf zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen hinzugefügt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine dreifache Waschung.

In der Zwischenzeit wurde die Probe- und Standardlösung abhängig von der Höhe der zu erwartenden Zytokinmenge der jeweiligen Probelösung mit Reagent Diluent verdünnt.

Je 50 µl der verdünnten Probe- und Standardlösungen wurden anschließend pro Napf auf die Platten aufgetragen und für zwei Stunden bei RT inkubiert, bevor der Überschuss durch drei Waschschriffe entfernt wurde.

Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl Detektionsantikörper pro Napf und eine erneute Inkubation für zwei Stunden bei RT. Nach drei Waschschriffen wurden pro Napf 50 µl HRP-Diluent mit dem Reporterenzym *Horseradish Peroxidase* (HRP), das an den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex bindet, hinzugegeben. Auf eine zwanzigminütige Inkubation bei RT und dreifache Waschung folgte die Beimengung von je 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung pro Napf als Substrat des Reporterenzym.

Sobald sich erste blaue Präzipitate in der höchstkonzentriertesten Standardlösung zeigten, wurden pro Napf je 50 µl Stopplösung hinzugegeben. Innerhalb der nächsten 30 Minuten wurde die Extinktion der Lösungen bei 450 nm photometrisch bestimmt und mithilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes die Konzentration in Kleinhirn und Milz ermittelt.

Die Sensitivität der Methode zur Bestimmung der Zytokine und Chemokine lag im Kleinhirn bei 75 pg/g und in der Milz bei 37,5 pg/g. Die Messung wurde geblindet durch die Medizinisch-technische Assistentin Frau S. Bunkowski durchgeführt.

### **2.2.7 Histologie und Immunhistochemie**

Vor Anfertigung der CAE- bzw. Iba-1-Färbung wurden die Cerebra in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte angefertigt. Dazu wurde das Gehirn nach mindestens zweitägiger Fixierung der 4%igen Formaldehydlösung entnommen. Nach einer Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe mit Xylol durchtränkt. In einem Einbettautomaten erfolgte die Einbettung mit Paraffin. Anschließend wurde das Gewebe an der Eingießstation in Gießschälchen mit heißem Paraffin übergossen und zu einem Paraffinblock verarbeitet. Nach Abkühlung des Paraffinblocks wurden aus den Blöcken mit

einem Schlittenmikrotom 2 µm dünne coronare Schnitte angefertigt, die auf einen Objektträger übertragen wurden.

Durch dreimal zehnmütige Behandlung mit Xylol wurden die Schnitte direkt vor der Färbung entparaffiniert. Dann schloss sich die Rehydrierung mit einer absteigenden Reihe von 100%igem bis 50%igem Isopropanol (100 %, 96 %, 70 %, 50 %) für jeweils 3 Minuten an, bevor die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült wurden.

#### 2.2.7.1 Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase-Färbung

Die Naphtol-AS-D-CAE-Färbung ist eine enzymhistochemische Färbung, die neutrophile Granulozyten und ihre Vorläuferzellen ab dem Promyelozyten in der Farbe Rot darstellt. Sie kann zusätzlich auch Monozyten und Makrophagen anfärben (Ysebaert et al. 2000). Die Färbung beruht auf einem farbigen Produkt, das bei der Reaktion von der v. a. in neutrophilen Granulozyten enthaltenen lysosomalen CAE mit dem hinzugegebenen Substrat Naphtol-AS-D-Chloracetat entsteht (Divanian et al. 1990).

Für die Färbung wurde hier ein Naphtol-AS-D-CAE-Kit mit bereits gebrauchsfertigen Reagenzien von der Firma Sigma-Aldrich eingesetzt. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte wurden diese auf Objektträgern mit je 40 ml Aqua bidest bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Je 1 ml Natrium-Nitrit-Lösung und Fast Red Violet LB Standardlösung wurden auf den Objektträger gegeben und gemischt. Anschließend wurden 5 ml Trizmal-6,3-Puffer und 1 ml Naphtol-AS-D-Chloracetat-Lösung nacheinander hinzugefügt, was zur Rotfärbung der Lösung führte. Nun wurden die Schnitte erneut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und im Anschluss mit Aqua bidest gespült. Zum Schluss erfolgte die Kernfärbung mit Hämalau und das Eindeckeln mit Aqua Tex.

#### 2.2.7.2 *Ionizing calcium-binding adaptor molecule 1*-Färbung

Bei der Iba-1-Färbung wird immunhistochemisch unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers (Wako Chemicals GmbH) das Protein Iba-1 angefärbt. Dieses Protein wird spezifisch in Makrophagen und Mikrogliazellen exprimiert und bei Aktivierung dieser Zellen hochreguliert (Ito et al. 1998; Ribes et al. 2013).

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zunächst fünf Mal für drei Minuten in der Mikrowelle mit Citratpuffer (10 mM und pH-Wert von 6) behandelt. Nach dreimaliger Spülung mit PBS erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch 10-minütige Inkubation mit 3%igem Wasserstoffperoxid in PBS, erneutes dreimaliges Waschen mit PBS und Behandlung mit einer Mischung aus 5%igem Esel-Serum und 0,5%iger Margermilch für 30 Minuten. Dann wurde als Primärantikörper der 1:400-verdünnte Kaninchen-Antikörper Anti-Iba1 hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert, bevor die Schnitte drei Mal mit PBS

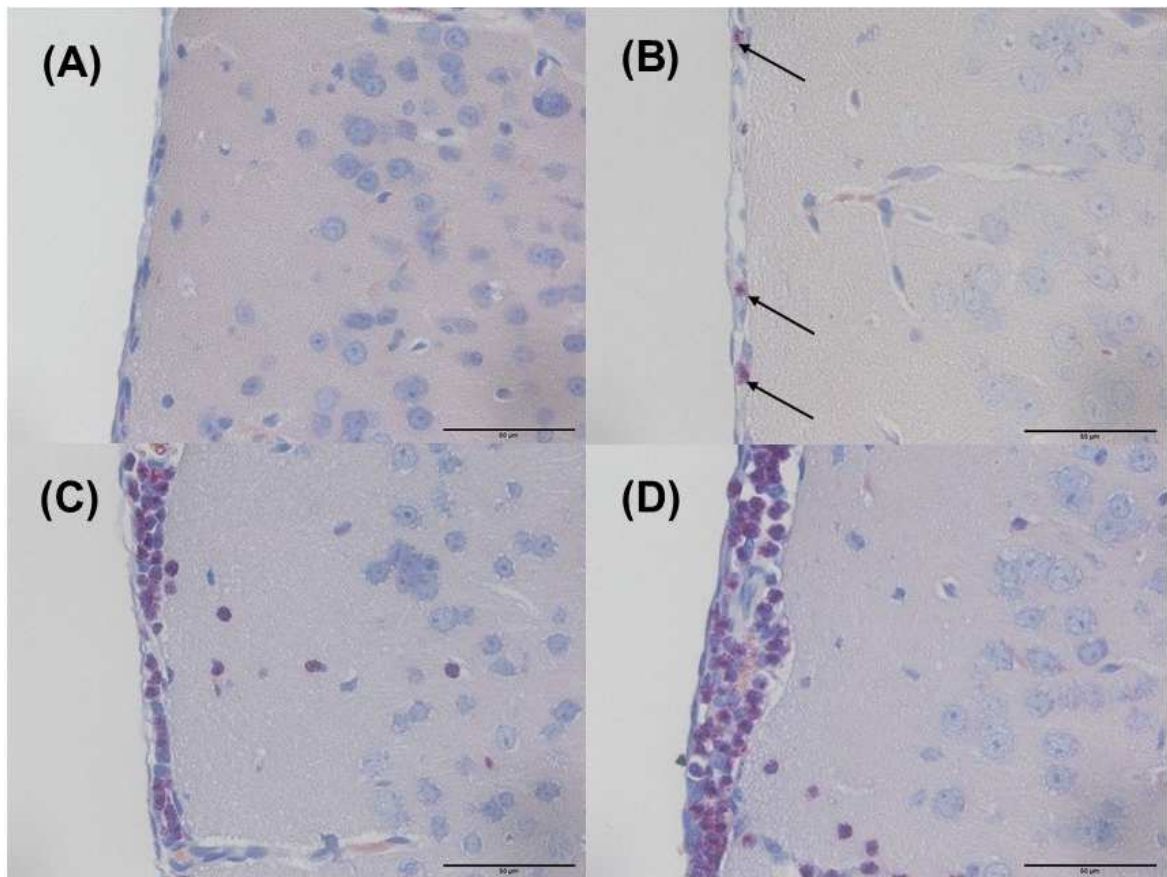
gewaschen wurden. Ein Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-Ig wurde 1:200 verdünnt hinzugefügt, für 60 Minuten bei RT inkubiert und der Überschuss durch drei Waschschrte mit PBS entfernt. Hiernach wurden die Schnitte für eine Stunde mit einer Avidin-Biotin-Komplex-Lösung (98 µl PBS und je 1 µl Avidin bzw. Biotin) behandelt. Im Anschluss an einen erneuten dreimaligen Waschvorgang mit PBS wurden die Schnitte unter Farbentwicklung mit Diaminobenzidin inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayer's Hämalaunlösung. Zuletzt wurden die Schnitte mit Aqua bidest gespült, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol behandelt und mit DePeX auf Objektträgern eingedeckelt.

### 2.2.7.3 Beurteilung der histologischen Schnitte

Mithilfe der Anzahl an CAE-gefärbten Zellen wurde die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Subarachnoidalraum und in das Hirnparenchym, d. h. der Grad der Entzündung, beurteilt (Ribes et al. 2013; Gerber et al. 2001). Dazu wurden die angefärbten Zellen in sechs verschiedenen neokortikalen Hirnarealen in je einem Gesichtsfeld (40fache Vergrößerung) geblindet quantifiziert und semiquantitativ mit einem meningealen Inflammationsscore von 0 bis 3 eingeteilt (Abbildung 3 und Tabelle 2; Ribes et al. 2013; Gerber et al. 2001). Für jedes Tier wurden die einzelnen meningealen Inflammationsscores der sechs Areale aufsummiert und durch die Anzahl der untersuchten Areale geteilt. Von den sechs kortikalen Hirnarealen C (Cortex) 1-6 wurde der Ausschnitt für C1 im primären und sekundären motorischen Kortex, für C2 und C3 im primär somatosensorischen Kortex und für C4-C6 jeweils analog in einem weiteren Schnitt gewählt.

**Tabelle 2: Meningealer Inflammationsscore mit der Anzahl CAE-positiver Zellen.** Zur Beurteilung der meningealen Entzündung wurde die Anzahl an CAE-gefärbten Zellen in sechs verschiedenen neokortikalen Hirnarealen in je einem Gesichtsfeld (40fache Vergrößerung) geblindet quantifiziert und semiquantitativ mit einem meningealen Inflammationsscore eingeteilt.

Meningealer Inflammationsscore	Anzahl an CAE-positiven Zellen (pro Gesichtsfeld; 40fache Vergrößerung)
0	Keine
1	1-9
2	10 bis 49
3	≥ 50



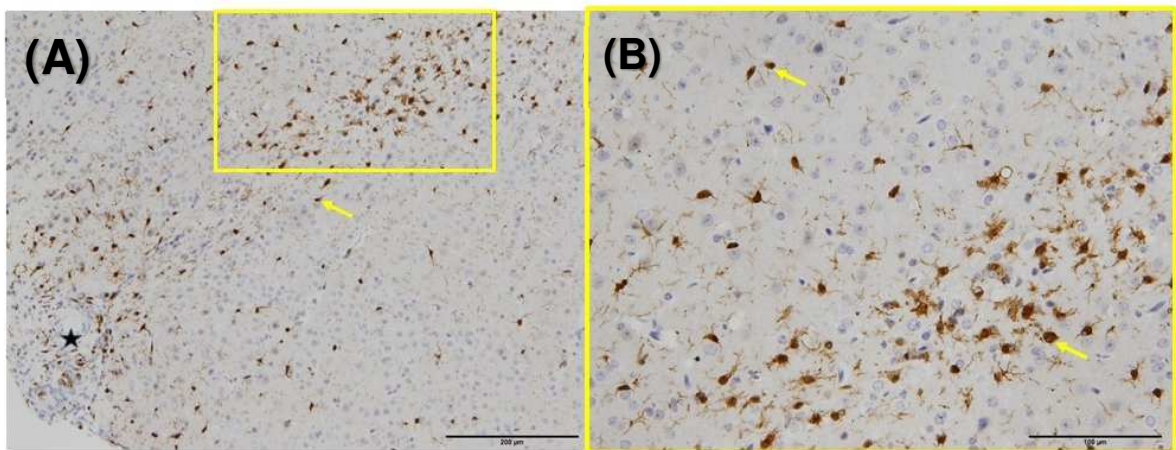
**Abbildung 3: Beispielbilder des meningealen Inflammationsscores in CAE-gefärbten Hirnschnitten von Mäusen nach i.c. *E. coli* K1-Infektion.** Der Reihenfolge nach sind Beispielbilder des meningealen Inflammationsscores von 0 (A), über 1 (B), 2 (C), bis zu einem Score von 3 (D) abgebildet. Die Pfeile in Bild (B) markieren rötlich gefärbte CAE-positive Zellen in den kortikalen Meningen einer Maus, die am ehesten neutrophile Granulozyten darstellen. Die schwarze Skalierungslinie entspricht 50 µm (40fache Vergrößerung).

Anhand der Iba-1-gefärbten Schnitte wurde die Quantität der Mikrogliazellen und ihre Aktivitätsstadien durch einen *Activation Score* (AS) beurteilt. Dazu wurden sechs oberflächliche neokortikale Hirnareale und ein weiteres hippocampales Hirnareal in je einem Gesichtsfeld (20fache Vergrößerung) bewertet. Das hippocampale Areal 1 ist in dem zum dritten Ventrikel hin gerichteten Gewebe zwischen der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellschicht der Region 1 des *Cornu ammonis* (CA1) lokalisiert. Für jedes Tier wurde der Mittelwert aus der Iba-1<sup>+</sup>-Zellanzahl der einzelnen Areale gebildet.

Die Zellmorphologie gibt Hinweise auf die Mikrogliaaktivität (Abbildung 4A und B; Streit et al. 2008). Eine schwere Pathologie ist mit einem höheren Mikrogliaaktivitätsstadium assoziiert (Crews und Vetreno 2016). Anhand eines neu entworfenen AS wurde die Morphologie der angefärbten Mikrogliazellen in den Schnitten der alten Mäuse mit einem Score von 1 bis 4 beurteilt. Dazu wurden alle sechs kortikalen Areale und das hippocampale Areal bei einer



Vergrößerung von 20 betrachtet und der in diesen Arealen vorherrschende Mikroglia-AS von einer geblindeten Person bestimmt. Mikrogliazellen werden stufenweise aktiviert über Hyper-Ramifikation, nachfolgende Vergrößerung des Zellkerns sowie Dickenzunahme der Ausläufer mit teilweiser Retraktion bis hin zu einer amoeboiden Zellmorphologie (Streit et al. 2008; Graeber 2010). In der Abbildung 8 im Ergebnisteil sind die vier Aktivitätsstufen gezeigt, beginnend mit einem Score von 1 mit Mikrogliazellen, die relativ kleine Kerne und dünne Ausläufer haben (Abbildung 8A; Nimmerjahn et al. 2005; Hanisch und Kettenmann 2007; Lucin und Wyss-Coray 2009). Ein Score von 2 definiert hypertrophierte Mikrogliazellen mit größeren Kernen und dickeren Ausläufern und ein Score von 3 oder 4 buschige bzw. amoeboiden Zellen (Abbildung 8B-D).



**Abbildung 4: Beispielbilder von unterschiedlichen Morphologien Iba-1<sup>+</sup>-Zellen alter Mäuse nach i.c. *E. coli* K1-Infektion.** Färbung und Gehirnschnitte wurden wie im Text beschrieben angefertigt. Die gelben Pfeile markieren Iba-1<sup>+</sup>-Zellen. Es gibt unterschiedliche Mikroglia-Morphologien entsprechend unterschiedlichen Aktivitätsstadien, hier in der Nähe zu einem Gefäß (schwarzer Stern) in 10facher Vergrößerung mit einer Skalierungslinie von 200 µm (A) und in 20facher Vergrößerung mit einer Skalierungslinie von 100 µm (B).

### 2.3 Statistik

Das Gesamt- und symptomfreie Überleben in Abhängigkeit von der Zeit wurde in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und mit dem Log-rank-Test sowie dem Cox-Modell die Gruppenunterschiede verglichen. Dazu wurden tote Mäuse mit der Zahl eins und überlebende Mäuse mit null gekennzeichnet. Die Letalität der PEA- und Kontroll-Gruppe wurde mit dem Fisher's Exact Test verglichen.

Andere Vergleiche zwischen PEA- und Kontrollgruppe von nicht-parametrischen Daten wie CS, BW, Bakterientiter in Kleinhirn, Milz, Leber und Blut, die Iba-1<sup>+</sup>-Zellzahlen, der AS der



Mikroglia und der meningeale Inflammationsscore wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Die Level an proinflammatorischen Zytokinen (gemeinsamer Test für IL-1 $\beta$  und IL-6) und an proinflammatorischen Chemokinen (gemeinsamer Test für MIP-1 $\alpha$  und CXCL1) wurden in Kleinhirn und Milz mit dem multivariaten Rangsummentest (Malzahn et al. 2010) ausgewertet. Korrelationen zwischen Bakterientitern und dem Mikroglia-AS bzw. der Mikrogliaanzahl, zwischen Bakterientitern und dem meningealen Inflammationsscore und Bakterientitern und Zytokin-/Chemokinkonzentrationen wurden mit dem Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten ( $r_s$ ) angegeben.

Die Analysen wurden mit GraphPad Prism (Version fünf der GraphPad Software, San Diego) und der Software R (Version 3.2.2; [www.cran.r-project.org](http://www.cran.r-project.org)) durchgeführt. Für alle Tests wurden Unterschiede zwischen zwei Gruppen bei einem  $p$ -Wert von  $<0,05$  als statistisch signifikant gewertet. Bei wiederholtem Testen im gleichen Organ wurde zur Korrektur der  $p$ -Werte die Holm-Bonferroni-Methode angewendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Der Effekt einer PEA-Prophylaxe auf das Überleben und die Immunantwort alter Mäuse nach intrazerebraler Infektion mit *E. coli* K1

Als ein erstes Modell für Immunschwäche wurden alte Mäuse gewählt. Vorherige Studien zu diesem Modell hatten gezeigt, dass alte Mäuse verglichen mit jungen, immunkompetenten Mäusen eine niedrigere Eliminierungsrate und höhere Letalität nach i.c. Infektion mit *E. coli* K1 aufweisen (Schütze et al. 2014).

#### 3.1.1 Die PEA-Prophylaxe verlängert das Überleben und verzögert den klinischen Symptombeginn bei alten Mäusen nach intrazerebraler *E. coli* K1-Infektion

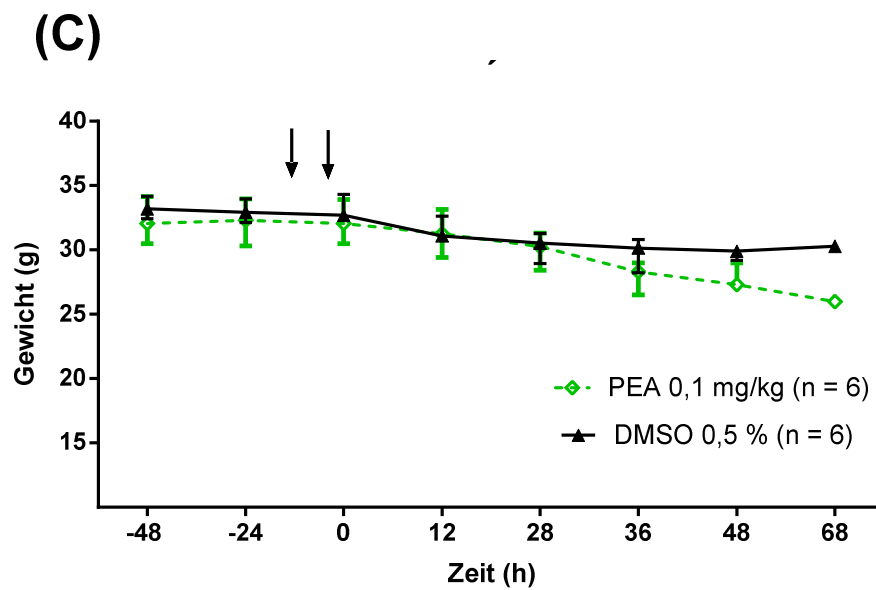
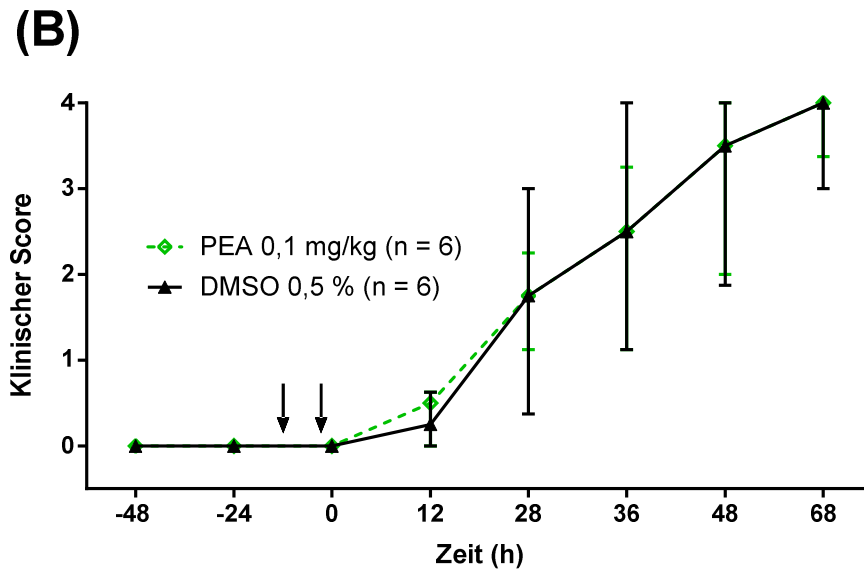
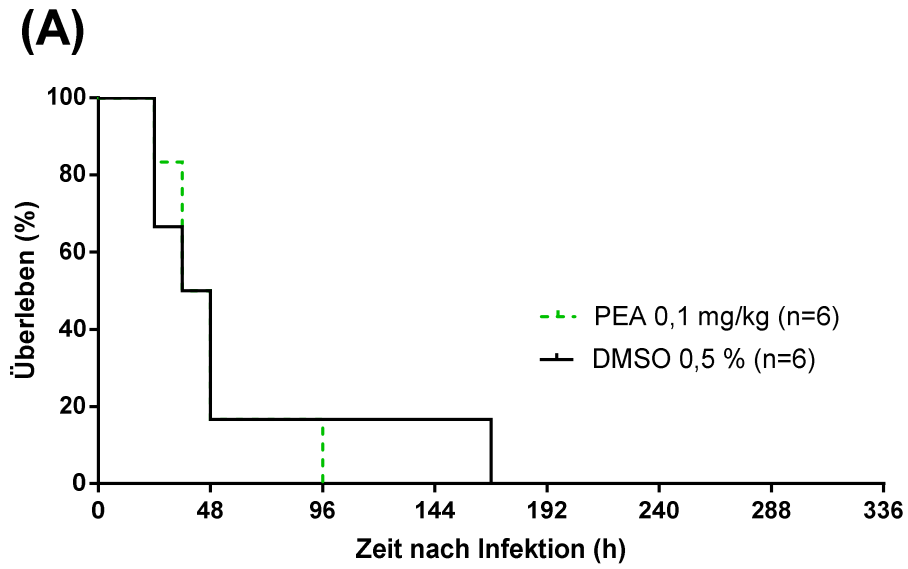
Zur Untersuchung der Fragestellung, welchen Effekt PEA-Prophylaxe auf den Krankheitsverlauf in den 14 Tage nach Infektion hat, wurden drei Versuche wie in Abschnitt 2.2 beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden 30 männliche Mäuse im Alter von 18-19 Monaten mit PEA in einer Dosis von 0,1 mg/kg oder einer äquivalenten Kontrolllösung mit DMSO durch i.p. Injektion 12 Stunden und 30 Minuten vor Infektion prophylaktisch behandelt. In einem Versuchsansatz (n = 12) erhielten die Mäuse eine höhere Menge an Bakterien von 1300 CFU pro Maus und in den beiden anderen Versuchen (n = 18) eine niedrigere Bakteriendosis von 800 CFU pro Maus durch i.c. Applikation. Aufgrund der Unterschiede in Infektionsdosis und Züchter wurde das erste Experiment separat von den beiden anderen ausgewertet.

Wie der Überlebenskurve nach Kaplan-Meier (siehe Abbildung 5A) zu entnehmen ist, lag die Letalität in dem Experiment mit der höheren Infektionsdosis in beiden Gruppen bei 100 % ( $p = 1,0$ , Fisher's Exact Test). 48 Stunden nach der Infektion waren in beiden Gruppen noch 50 % (3/6) der Mäuse am Leben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit zwischen der Untersuchungsgruppe und der Kontrollgruppe ( $p = 0,80$ , Log-rank-Test).

Die Verläufe des CS und des BW sind in Abbildung 5B und C dargelegt. Die Mediane der klinischen Scores nahmen vom Infektionstag bis zum Todeszeitpunkt zu. Der Median zum Zeitpunkt 36 Stunden *post infectionem* (p. i.) entsprach in beiden Gruppen einem klinischen Score von 2,5 ( $p = 0,87$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 5B).

Das mediane Startgewicht der Mäuse betrug 32,1 g in der PEA-Gruppe und 32,7 g in der Kontrollgruppe. Die medianen BWs beider Gruppen fielen nach Infektion am Tag 0 bis 48

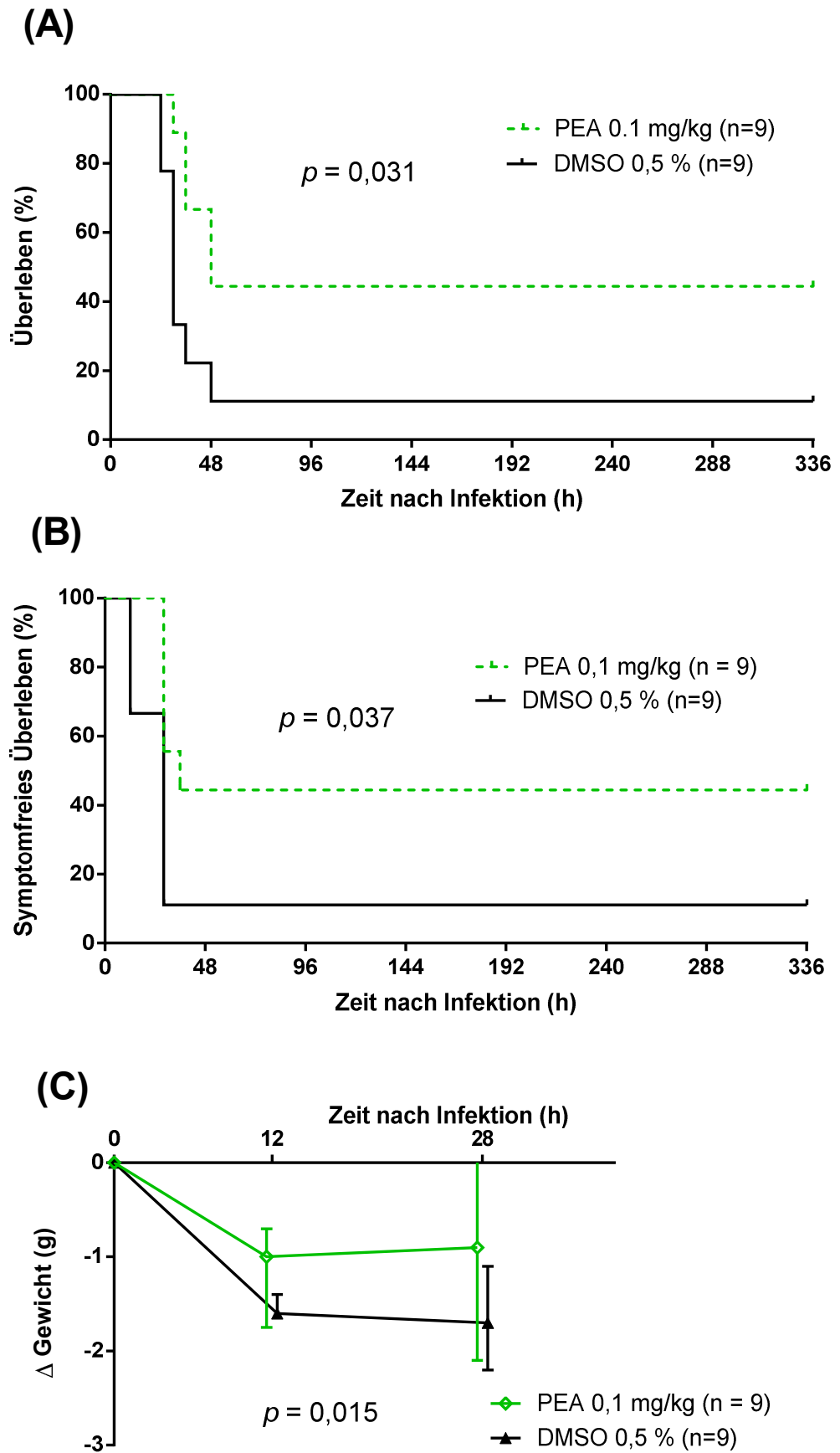
Stunden später stark ab. Nach 36 Stunden hatte die PEA-behandelte Gruppe ein medianes BW von 28,3 g und die DSMO-behandelte Gruppe eines von 30,2 g ( $p = 0,11$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 5C). Zu diesem Zeitpunkt betrug der Anteil der überlebenden Mäuse in der Kontrollgruppe 83 % (5/6) und in der Versuchsgruppe 67 % (4/6).



**Abbildung 5: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) auf die Entwicklung und Progredienz einer Meningitis nach i.c. Injektion von 1300 CFU *E. coli* K1 bei alten Mäusen.** (A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit dem Überleben in % bis 14 Tage p. i. ( $p = 0,80$ , Log-rank-Test). Die Mortalität lag bei 100 %. (B) CS der Mäuse als Median mit dem Interquartilsabstand zwischen dem 0,25- und 0,75-Quantil. Gestorbene Mäuse wurden mit einem Score von 4 weiter berücksichtigt. (C) Verlauf des medianen Gewichts mit dem Interquartilsabstand zwischen dem 0,25- und 0,75-Quantil. Die statistische Analyse erfolgte in (B) und (C) mit dem Mann-Whitney-U-Test 36 Stunden p. i. zum Vergleich der beiden Gruppen, wobei sich die Differenzen nicht signifikant unterschieden. Unter Anästhesie wurden 1300 CFU *E. coli* K1 in den rechten frontalen Neocortex der Mäuse ( $n = 12$ ) injiziert. Jeweils 12 Stunden und 30 Minuten vor Injektion wurde den Mäusen 0,1 mg/kg PEA (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl mit 0,5 % DMSO) bzw. der Kontrollgruppe 0,5 % DMSO (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl) i.p. appliziert (Pfeile). Nach 14 Tagen p. i. wurden alle Mäuse getötet.

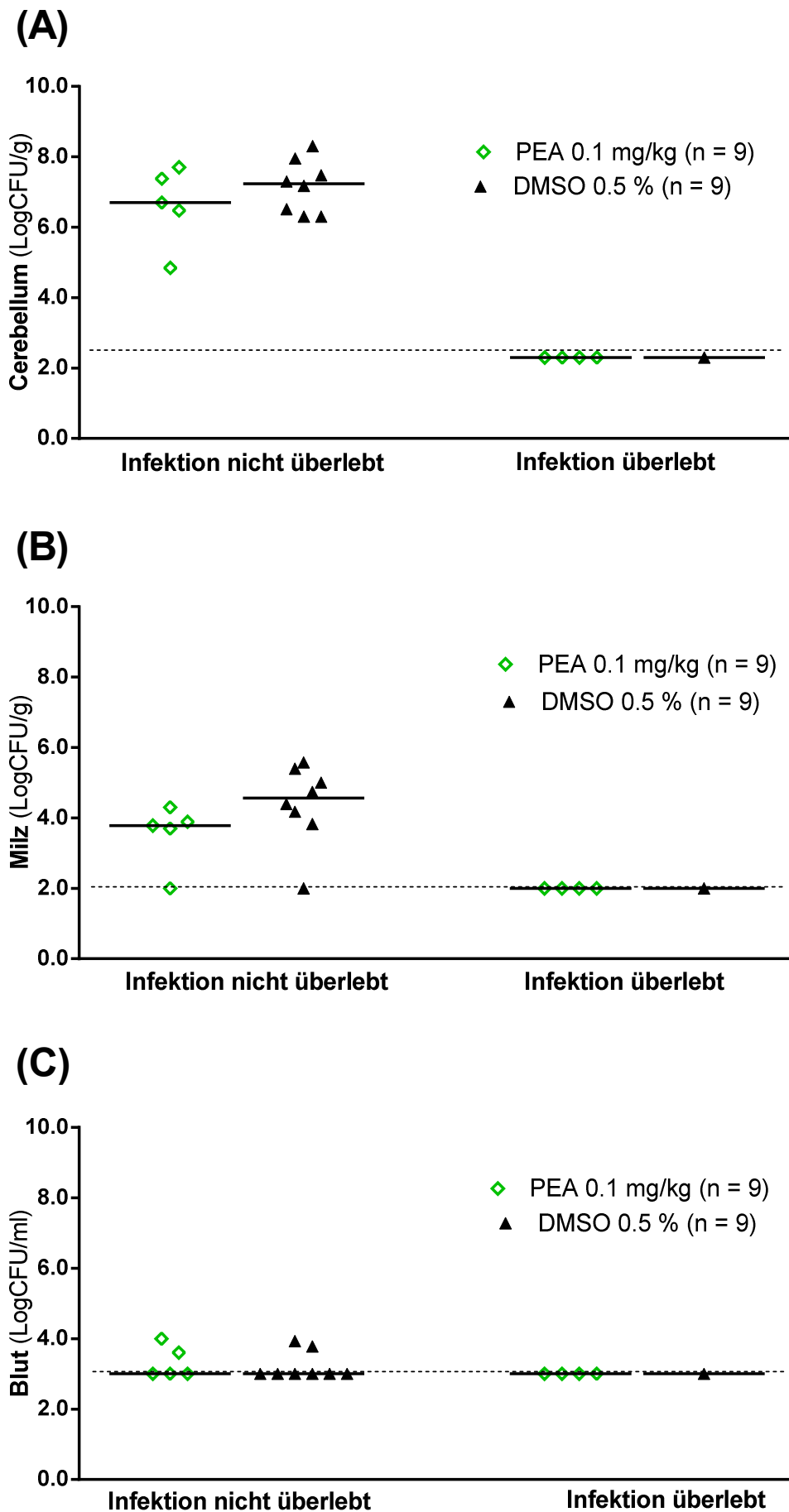
Die Kaplan-Meier-Kurve des Versuchsansatzes mit der niedrigeren Infektionsdosis enthält Abbildung 6A. Die prophylaktische PEA-Gabe hatte bei dieser milderen Infektionsdosis einen signifikanten Effekt auf die Überlebensdauer mit einer Verlängerung der medianen Überlebenszeit nach Infektion um 18 Stunden ( $p = 0,031$ , Log-rank-Test). Die Auswertung aller drei Versuche mit dem geschichteten Cox-Modell zeigte eine Tendenz dafür, dass der Behandlungseffekt mit steigender Infektionsdosis reduziert wurde ( $p = 0,086$ , geschichtetes Cox-Modell). Die Letalität tendierte in der PEA-Gruppe mit 55,6 % (5/9) zu niedrigeren Werten verglichen mit der DMSO-Gruppe mit 88,9 % (8/9), jedoch aufgrund der geringen Gruppengröße ohne Erreichen des Signifikanzniveaus ( $p = 0,29$ , Fisher's Exact Test). Alle Mäuse mit einem CS größer 0 verstarben in dem Versuchsansatz mit der niedrigeren Infektionsdosis an der Infektion, das heißt, wenn eine Maus nicht in der Lage war, in der Anfangsphase die Infektion zu überwinden, verstarb sie. Die Kontrollgruppe entwickelte die ersten dauerhaften klinischen Symptome ( $CS \geq 0,5$ ) signifikant früher als die PEA-Gruppe ( $p = 0,037$ , Log-rank-Test; medianes symptomfreies Überleben 36 Stunden versus 28 Stunden; Abbildung 6B).

Zu Beginn hatten die Mäuse ein medianes Startgewicht von 34,3 g in der PEA-Gruppe und von 33,6 g in der Kontrollgruppe. Der absolute Gewichtsverlust innerhalb von 28 Stunden p. i. war signifikant niedriger in der PEA-Gruppe als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,015$ , Vergleich der *Areas under the curve* (AUCs) der individuellen Gewichtsverluste 0-28 Stunden p. i. mit dem Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 6C).



**Abbildung 6: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) auf die Überlebensdauer und den Symptombeginn bei alten Mäusen nach i.c. Injektion von 800 CFU *E. coli* K1 ohne antibiotische Behandlung.** (A) Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve zeigt eine signifikant längere Überlebenszeit der PEA-behandelten Mäuse mit einer Verlängerung der medianen Überlebenszeit um 18 Stunden ( $p = 0,031$ , Log-rank-Test;  $n = 9$  Mäuse/Gruppe). (B) Symptomfreies Überleben durch PEA-Prophylaxe um 8 Stunden erweitert ( $p = 0,037$ , Log-rank-Test). (C) Medianer Gewichtsverlust bis zum Tod der ersten Maus (28 Stunden p. i.) mit Median  $\pm$  Interquartilsabstand zwischen dem 0,25- und 0,75-Quantil. Der absolute Gewichtsverlust innerhalb von 28 Stunden p. i. war signifikant niedriger in der PEA-Gruppe als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,015$ , Mann-Whitney-U-Test). Die statistische Analyse erfolgte in (A) und (B) mit dem Log-rank-Test und in (C) mit dem Mann-Whitney-U-Test nach Berechnung der individuellen AUCs der Gewichtsverluste 0-28 Stunden p. i. Die Daten stammen von zwei unabhängigen Experimenten. 18 Mäuse wurden 12 Stunden und zusätzlich 30 Minuten vor i.c. Infektion (800 CFU *E. coli* K1 pro Maus) mit je 0,1 mg/kg PEA (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl mit 0,5 % DMSO) bzw. 0,5 % DMSO (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl) i.p. behandelt. 14 Tagen später wurden alle Mäuse getötet. Eine prophylaktische Gabe von PEA bei einer niedrigeren Bakteriendosis von 800 CFU pro Maus verlängerte das Überleben und die symptomfreie Zeit nach Infektion signifikant, verglichen mit der Kontrollgruppe.

Die Abbildung 7 enthält die Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und im Blut der alten Mäuse mit der geringeren Infektionsdosis von 800 CFU *E. coli* K1 pro Maus, gemessen zum Tötungszeitpunkt vor bzw. nach 14 Tagen. Bei den PEA-behandelten Mäusen, die während des Versuchs an der Infektion verstarben, waren die Mediane der Bakterienkonzentrationen in den untersuchten Organen tendenziell geringer bzw. im Blut gleich dem der DMSO-Gruppe. In keinem der drei Organe unterschieden sich die Bakterienkonzentrationen zum Todeszeitpunkt der an der Infektion verstorbenen Tiere signifikant von denen der DMSO-Gruppe. Bei den die Infektion überlebenden Mäusen lagen die Bakterienkonzentrationen in allen drei Organen unter der Nachweisgrenze. Die Nachweisgrenze lag im Cerebellum bei 200 CFU/g (2,3 logCFU/g) und in der Milz bei 100 CFU/g (2 logCFU/g) und im Blut bei 1000 CFU/ml (3 logCFU/ml), wobei im Kleinhirn fünf, in der Milz sieben und im Blut elf Tiere unter der Nachweisgrenze lagen. Bei allen Tieren, die Werte unter der Nachweisgrenze aufwiesen, wurde für statistische Zwecke im Kleinhirn 199 CFU/g, in der Milz 99 CFU/g und im Blut 999 CFU/ml eingesetzt. Der Median der Bakterienkonzentrationen war in beiden Versuchsgruppen zusammen bei den an der Infektion gestorbenen Mäusen im Gehirn, dem Ort der primären Infektion, höher als in der Milz und im Blut ( $1,5 \times 10^7$  CFU/g [7,2 logCFU/g] im Gehirn versus 15000 CFU/g [4,2 logCFU/g] in der Milz und 1000 CFU/ml [3 logCFU/ml] im Blut;  $p < 0,0002$ , Mann-Whitney-U-Test mit nachfolgender Holm-Bonferroni-Korrektur).





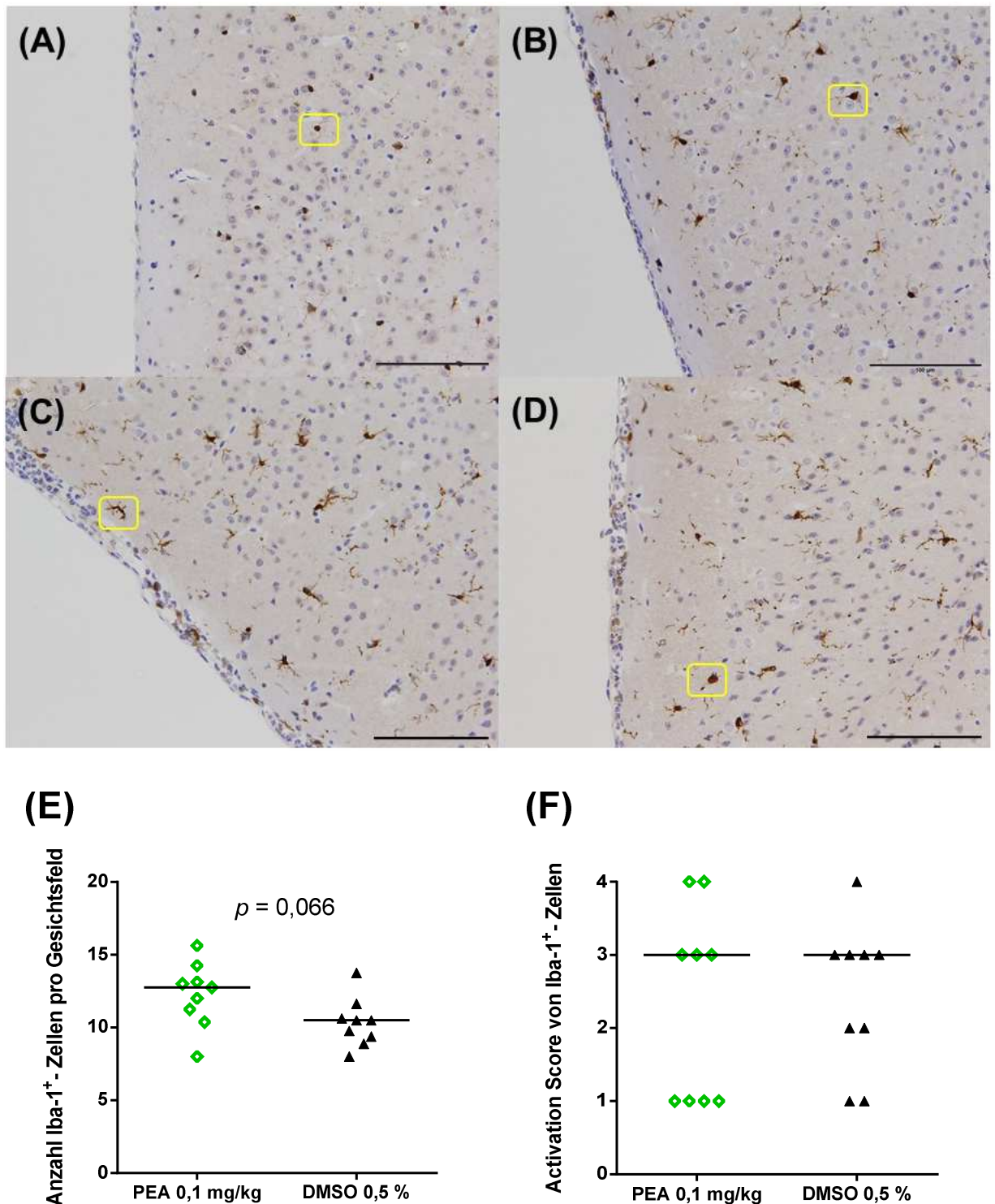
**Abbildung 7: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis von 0,1 mg/kg) auf die Bakterientiter in Kleinhirn, Milz und im Blut alter Mäuse nach Infektion mit 800 CFU *E. coli* K1 zum Todeszeitpunkt vor bzw. nach 14 Tagen.** Die Streudiagramme stellen die Bakterienkonzentrationen (in logCFU/g) im Kleinhirn **(A)**, in der Milz **(B)** und die Bakterienkonzentrationen (in logCFU/ml) im Blut **(C)** von gestorbenen und überlebenden alten Mäusen ( $n = 18$ ) getrennt dar. Jeder Punkt steht für einen Messwert. Die durchgezogene schwarze Linie kennzeichnet den Median und die gestrichelte schwarze Linie die Detektionsgrenze. Im Kleinhirn waren fünf Werte unter, in der Milz sieben Werte unter und im Blut elf Werte unter sowie drei Werte entsprechend der Nachweisgrenze. Alle Tiere, die Werte unter der Nachweisgrenze aufwiesen, wurden im Kleinhirn als 199 CFU/g, in der Milz als 99 CFU/g und im Blut als 999 CFU/ml gewertet. Die statistische Analyse erfolgte in (A), (B) und (C) mit dem Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der zwei Gruppen, wobei sich die Differenzen nicht signifikant unterschieden. 800 CFU *E. coli* K1 wurde alten Mäusen i.c. injiziert. Jeweils 12 Stunden und 30 Minuten vor Injektion wurde den Mäusen 0,1 mg/kg PEA (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl mit 0,5 % DMSO;  $n = 9$ ) und der Kontrollgruppe 0,5 % DMSO (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl;  $n = 8$ ) i.p. appliziert. Nach 14 Tage p. i. wurden alle Mäuse getötet.

Zur Beurteilung der Mikrogliazellen, den Schlüsselzellen bei der Pathogen-Bekämpfung im Gehirn, wurde, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, die Zellanzahl Iba-1-gefärbter Zellen in acht Gehirnregionen pro Maus bestimmt. Bei der Analyse der Schnitte konnten passend zu einem stufenweisen Aktivierungsprozess vier Morphologien der Iba-1-gefärbten Zellen unterschieden werden (Fumagalli et al. 2015; Streit et al. 2008). Dazu benutzte eine geblindete Person einen AS von 1 bis 4 für entsprechend verzweigte, hypertrophe, buschige bzw. amoeboiden Zellformen (siehe Kapitel 2.2.7). Nicht-infizierte, alte Mäuse zeigten einheitlich verteilte Iba-1<sup>+</sup>-Zellen mit feinen Ausläufern (AS 1, Abbildung 8A). Repräsentative Beispiele von aktivierten hypertrophen, buschigen und amoeboiden Iba-1<sup>+</sup>-Zellen (AS 2 bis 4) infizierter alter Tiere sind in Abbildung 8B-D dargestellt.

Die Mikrogliaanzahl tendierte in der PEA-Gruppe zu einem größeren Median von 13 Mikrogliazellen pro Gesichtsfeld (20fache Vergrößerung), verglichen mit dem der DMSO-Gruppe von 11 ( $p = 0,066$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 8E). Die mediane Mikrogliaanzahl war bei den an der Infektion verstorbenen Tieren signifikant niedriger als bei den die Infektion überlebenden Tieren (mediane Mikrogliaanzahl pro Gesichtsfeld 11 versus 14;  $p = 0,0002$ , Mann-Whitney-U-Test).

Der AS beider Gruppen unterschied sich mit jeweils einem Median von 3 nicht voneinander ( $p = 0,99$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 8E). Der AS der Tiere, die die Infektion überlebten, war signifikant niedriger als der AS der an der Infektion verstorbenen Tiere (medianer AS von 1 versus 3;  $p = 0,0007$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 8F). Zwischen der Bakterienkonzentration im Cerebellum und dem AS konnte eine positive Korrelation nachgewiesen werden ( $r_s = 0,63$ ;  $p = 0,005$ ). Je höher die Bakterienkonzentration im Gehirn

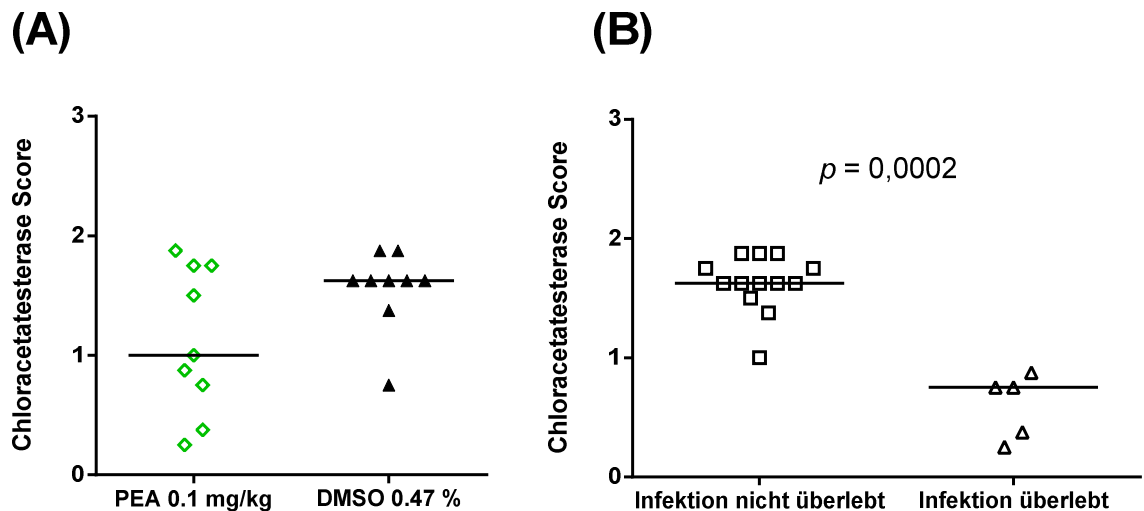
war, desto höher war der AS der Mikroglia und desto niedriger die Zellzahl der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen ( $r_s = -0,68; p = 0,002$ ).



**Abbildung 8:** Effekt der PEA-Prophylaxe auf die Iba-1<sup>+</sup>-Zellanzahl und den Mikroglia-AS in *E. coli* K1-infizierten (800 CFU pro Maus) alten Mäusen. Nach der Tötung erfolgte die Färbung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zur Darstellung der Mikroglia in den Großhirnschnitten. **(A-D)** zeigen typische Beispiele von den unterschiedlichen Zellmorphologien (eingekreist in gelb) und den jeweiligen

AS im Neokortex. Jeder Region wurde durch eine verblindete Person ein einzelner Aktivierungsscore entsprechend der am häufigsten vorkommenden Morphologie gegeben: Mikroglia mit kleiner Größe und sehr feinen Ausläufern (AS 1), hypertrophe mit dickeren Ästen (AS 2), buschige (AS 3) und amoeboiden (AS 4) Zellen, Skalierungslinie 100  $\mu\text{m}$  (20fache Vergrößerung). **(E)** Mediane Iba-1<sup>+</sup>-Zellanzahl der acht beurteilten Hirnareale, wobei jeder Punkt dem Median einer individuellen Maus entspricht. Die schwarze Linie kennzeichnet den Gesamtmedian, der in der PEA-Gruppe mit 13 höher ist als in der DMSO-Gruppe mit 11 ( $p = 0,066$ , Mann-Whitney-U-Test). **(F)** zeigt den AS zur Beurteilung der Mikrogliaaktivität. Nach Betrachtung der Hirnareale wurde pro Maus ein Score zwischen 1 für wenig aktivierte Mikroglia mit schmalen Ausläufern und 4 für stark aktivierte, amoeboidförmige Mikroglia vergeben und im Streudiagramm als ein Messwert eingetragen. Die schwarze Linie stellt den Median dar. Die statistische Analyse in (E) und (F) erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich beider Gruppen, wobei sich die Differenzen nicht signifikant unterschieden.

Durch die CAE-Färbung können die neutrophilen Granulozyten im Subarachnoidalraum und Neokortex angefärbt und bestimmt werden. Die Abbildung 9 zeigt die anhand der Zellanzahl definierten durchschnittlichen CAE-Scores der Gruppen im Vergleich. Pro Maus wurden sechs Gesichtsfelder von Kortexarealen bei 40facher Vergrößerung betrachtet und der Median für eine Maus gebildet. Der Median der PEA-Gruppe war mit einem Wert von 1 niedriger als der der DMSO-Gruppe mit einem Wert von 1,6 ohne Erreichen des statistischen Signifikanzniveaus ( $p = 0,22$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 9A). Die Tiere beider Behandlungsgruppen zusammen, die die Infektion überlebten, hatten einen signifikant niedrigeren CAE-Score als die an der Infektion verstorbenen Tiere (0,8 versus 1,6;  $p = 0,0002$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 9B). Es lag eine positive Korrelation zwischen der Bakterienkonzentration im Kleinhirn und dem CAE-Score vor ( $r_s = 0,55$ ,  $p = 0,018$ ).



**Abbildung 9: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) und Einfluss des Infektionsverlaufs auf den meningealen Inflammationsscore bei *E. coli* K1-Meningitis in alten Mäusen.** Streudiagramme des meningealen Inflammationsscores zur Beurteilung der Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Subarachnoidalraum und das Hirnparenchym mit Werten von 0 (0 Zellen), 1 (1-9 Zellen), 2 (10-49 Zellen) bis 3 ( $\geq 50$  Zellen). Jeder Punkt steht für einen durchschnittlichen Score der sechs beurteilten Kortexareale einer verstorbenen Maus (40fache Vergrößerung). Der Median ist durch die schwarze Linie gekennzeichnet. Die statistische Analyse wurde in (A) und (B) mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. In (A) ist der meningeale Inflammationsscore der beiden Behandlungsgruppen dargestellt, wobei sich die Differenzen nicht signifikant unterscheiden ( $p = 0,22$ , Mann-Whitney-U-Test). (B) zeigt den meningealen Inflammationsscore der die Infektion nicht überlebten Mäuse und der Mäuse, die bis zum Ende des Versuchs überlebten. Die Tiere, die die Infektion überlebten, hatten einen signifikant niedrigeren CAE-Score als die an der Infektion verstorbenen Tiere (0,8 versus 1,6;  $p = 0,0002$ , Mann-Whitney-U-Test).

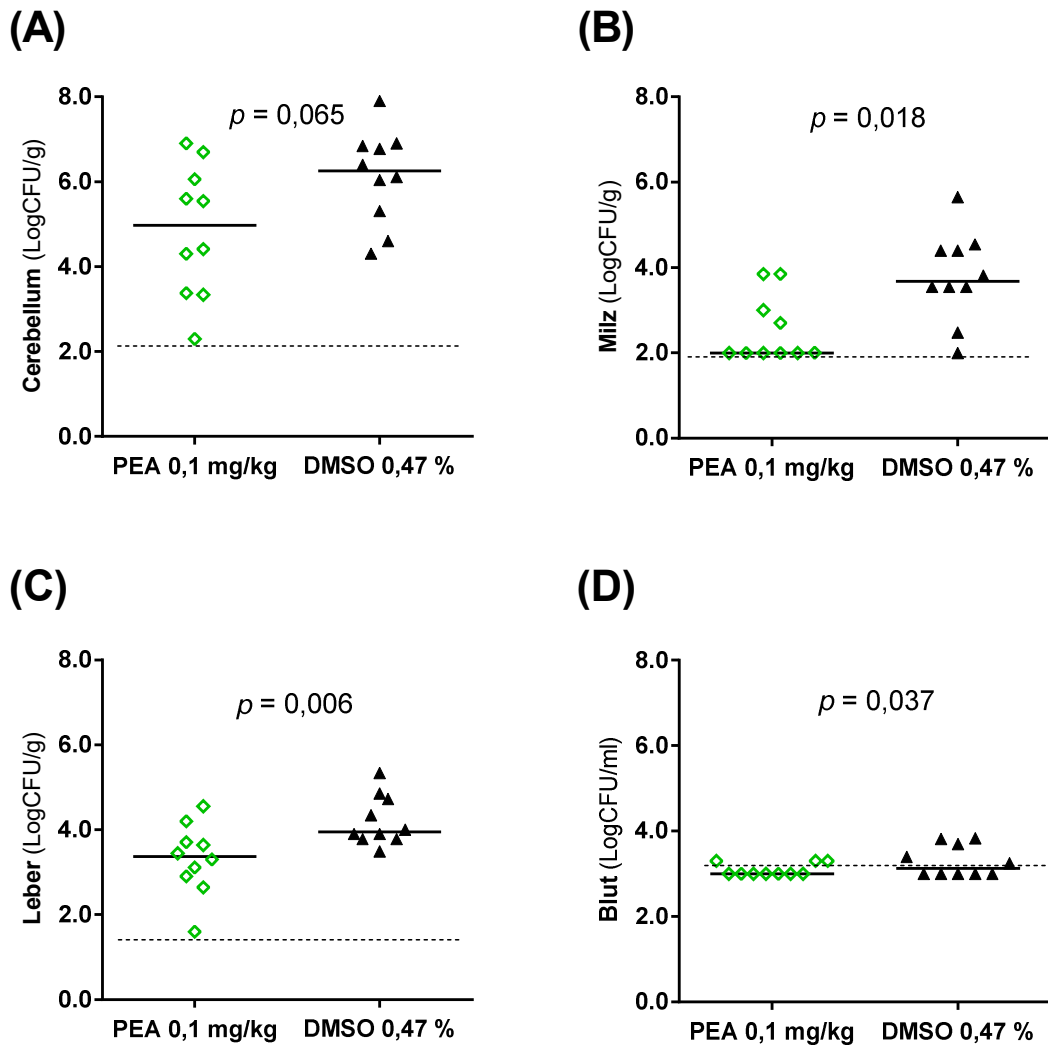
Fasst man zusammen, so hatte die PEA-Prophylaxe mit einer Dosis von 0,1 mg/kg PEA einen signifikanten Effekt auf die Überlebenszeit und den klinischen Symptombeginn bei alten Mäusen nach einer Infektion mit 800 CFU *E. coli* K1, indem sie die Überlebenszeit um 18 Stunden verlängerte und den Symptombeginn um 8 Stunden verzögerte. Der Gewichtsverlust war in den ersten 28 Stunden nach Infektion in der PEA-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Alle Tiere, die einen CS größer null entwickelten, verstarben an der Infektion. Zum Todeszeitpunkt der Tiere, entweder bei Erfüllung der Abbruchkriterien oder nach 14 Tagen p. i., bestand kein Unterschied in der Bakterienkonzentration, dem Mikroglia-AS oder dem CAE-Score zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Je höher die Bakterienkonzentration im Kleinhirn war, desto niedriger war die Zellanzahl an Mikroglia und desto höher der Mikroglia-AS sowie die Zellanzahl an neutrophilen Granulozyten. An der Infektion verstorbene Tiere zeigten in beiden Behandlungsgruppen zusammen höhere mediane

Bakterienkonzentrationen in allen drei Organen sowie einen größeren medianen Mikroglia-AS und eine niedrigere Anzahl an Iba-1<sup>+</sup>-Zellen als Tiere, die die Infektion überlebten. In den Tieren, welche die Infektion überlebten, konnten zwei Wochen nach Infektion keine Bakterien mehr detektiert werden. Bei steigender Infektionsdosis sank der prophylaktische Effekt von PEA und konnte bei einer Dosis von 1300 CFU pro Maus nicht mehr nachgewiesen werden.

### **3.1.2 Die PEA-Prophylaxe senkt die schädliche Entzündung in alten Mäusen während der Akutphase nach intrazerebraler *E. coli* K1-Infektion**

Ob in der Frühphase der Infektion der prophylaktische Effekt von PEA mit einer erniedrigten Bakterienlast und geringeren Entzündungsparametern einhergeht, wurde in zwei 24 h-Experimenten mit insgesamt 20 männlichen 18-19 Monate alten C57BL/6-Mäusen des Züchters Janvier untersucht. Wie in Kapitel 2.2.1 dargelegt, wurden die Mäuse 12 und 0,5 Stunden vor Infektion mit PEA in einer Dosis von 0,1 mg/kg bzw. einer äquivalenten Kontrolllösung mit 0,5 % DMSO behandelt. Nach Infektion mit 4550 CFU *E. coli* K1 wurden die Mäuse 24 Stunden später unabhängig von ihrem CS getötet. Alle 20 Mäuse entwickelten einen CS >0 innerhalb von 24 Stunden p. i. Der mediane CS aller Mäuse bei Tötung entsprach einem Wert von 2. Das mediane Startgewicht der Mäuse betrug in der PEA-Gruppe 31,4 g und in der Kontrollgruppe 32,7 g.

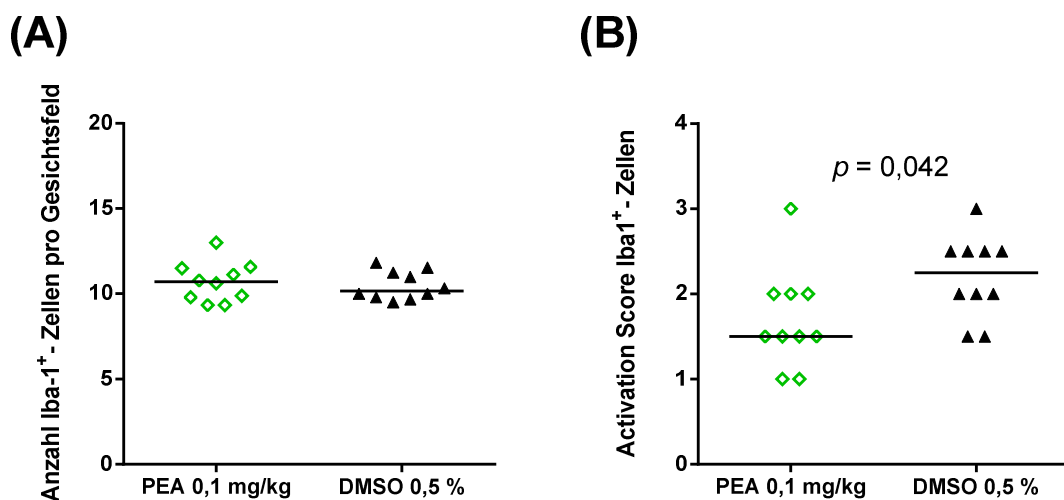
Zunächst untersuchten wir, ob PEA-Prophylaxe mit einem geringeren Bakterienwachstum im Gehirn und einer geringeren Ausbreitung in die systemische Zirkulation einherging. Dazu ermittelten wir die Bakterienkonzentrationen von Kleinhirn, Milz und Leber sowie von Blutproben 24 Stunden nach Infektion (Abbildung 10). Die Bakteriämie war signifikant reduziert in der PEA-behandelten Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p = 0,037$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 10D). Die Bakterienkonzentration von Tieren mit PEA-Prophylaxe war auch signifikant niedriger in der Milz ( $p = 0,018$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 10B) und in der Leber ( $p = 0,006$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 10C). Im Kleinhirn zeigte sich eine Tendenz zu niedrigeren Werten in der PEA-Gruppe ( $p = 0,065$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 10A).



**Abbildung 10: Effekt exogener PEA-Prophylaxe auf die bakterielle Ausbreitung in Cerebellum, Milz, Leber und Blut bei alten Mäusen 24 Stunden nach i.c. Infektion mit *E. coli* K1.** Dargestellt sind vier Streudiagramme mit den Bakterienkonzentrationen von *E. coli* K1 (in logCFU/g) in Kleinhirn **(A)**, Milz **(B)** und Leber **(C)** und den Bakterienkonzentrationen von *E. coli* K1 (in logCFU/ml) im Blut **(D)** 24 Stunden nach Infektion ( $n = 10$  Mäuse/Gruppe). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Der Median wird durch die durchgezogene schwarze Linie und die Detektionsgrenze durch die gestrichelte schwarze Linie gekennzeichnet. Insgesamt lagen im Kleinhirn ein Wert unter, in der Milz sechs Werte unter und ein Wert auf, im Blut fünf Werte unter und sieben Werte auf und in der Leber kein Wert unter aber ein Wert auf der Nachweisgrenze. Diese entsprach im Kleinhirn einem Wert von 200 CFU/g (2,3 logCFU/g), in der Milz von 100 CFU/g (2 logCFU/g), in der Leber von 40 CFU/g (1,6 logCFU/g) und im Blut von 1000 CFU/ml (3 logCFU/ml). Bei allen Tieren, die Werte unter der Nachweisgrenze aufwiesen, wurde im Kleinhirn 199 CFU/g, in der Milz 99 CFU/g, in der Leber 39 CFU/g und im Blut 999 CFU/ml eingetragen. Unterschiede in den Bakterienkonzentrationen zwischen PEA- und Kontroll-Gruppe wurden mit dem Mann-Whitney-U-test getestet. Nach PEA-Prophylaxe waren die Bakterienkonzentrationen 24 Stunden nach Infektion in der Leber ( $p = 0,006$ , Mann-Whitney-U-Test), der Milz ( $p = 0,018$ , Mann-Whitney-U-Test) und im Blut ( $p = 0,037$ , Mann-Whitney-U-Test) signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

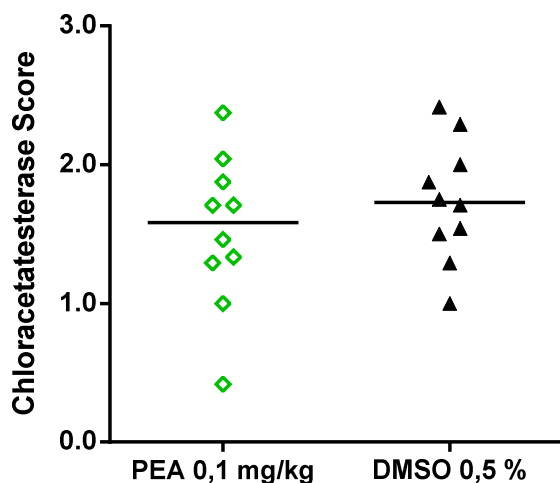
Zur Beurteilung der Mikroglia wurden die Iba-1-gefärbten Großhirnschnitte von alten nicht-infizierten und alten infizierten Mäusen wie in Kapitel 2.2.7 erläutert in acht unterschiedlichen Gehirnregionen ausgewertet. Vier unterschiedliche Morphologien konnten passend zu einem stufenweisen Aktivierungsprozess unterschieden werden (Vgl. Abbildung 8).

Die Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zeigte eine gleiche Anzahl an Mikroglia in der Kontroll- und Untersuchungsgruppe 24 Stunden nach Infektion ( $p = 0,93$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 11A). Die mediane Zellanzahl betrug zwischen 10-11 Zellen pro Gesichtsfeld (20fache Vergrößerung). Der Median des AS war hingegen signifikant höher in der DMSO-Gruppe verglichen mit dem der PEA-Gruppe ( $p = 0,042$ , Mann-Whitney-U-Test). Dementsprechend wiesen Mikroglia von PEA-behandelten Mäusen häufiger eine verzweigte-hypertrophe Morphologie (medianer AS [0,25-/0,75-Quartil]: 1,5 [1.4/2.0]) und die der Kontrollgruppe mehrheitlich eine hypertrophe-buschige Form (2,3 [1.9/2.5]) auf. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Bakterienkonzentration im Kleinhirn und der Anzahl an Iba-1<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden. Jedoch tendierten hohe Mikroglia-AS dazu, mit hohen Bakterienkonzentration im Gehirn zu korrelieren ( $r_s = 0,42$ ,  $p = 0,06$ ;  $n = 20$ ).



**Abbildung 11: Effekt der PEA-Prophylaxe auf den AS von Mikrogliazellen im Gehirn alter Mäuse 24 Stunden nach Infektion.** Mit PEA-Prophylaxe behandelte, alte Mäuse wurden 24 Stunden nach Infektion getötet und die Iba-1<sup>+</sup>-Zellen in den Großhirnschnitten angefärbt. Die mediane Mikrogliaanzahl einer Maus in den acht beurteilten Hauptfeldern (20fache Vergrößerung) entspricht einem Punkt (A). Die waagrechte Linie zeigt den Gesamtmedian, der in beiden Gruppen zwischen zehn und elf liegt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, wobei sich die Differenz zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschied. Das zweite Streudiagramm enthält den mittleren AS jeder Maus als einen Punkt und den Median (waagrechte Linie) (B). Es besteht ein signifikanter Unterschied in beiden Gruppen mit niedrigeren Scores in der PEA-Gruppe ( $p = 0,042$ , Mann-Whitney-U-Test). PEA-behandelte Mäuse zeigten häufiger eine verzweigte-hypertrophe Morphologie und die Kontrollgruppe am häufigsten eine hypertrophe-buschige Form.

Die neutrophilen Granulozyten in den Großhirnschnitten wurden mit der CAE-Färbung dargestellt und in sechs kortikalen Hauptfeldern (40fache Vergrößerung) meningeal und parenchymal von einer geblindeten Person gezählt (siehe Kapitel 2.2.7). Die Anzahl der CAE-gefärbten Zellen der sechs Regionen wurde jeweils mit einem Inflammationsscore bewertet und der Median aus den sechs Werten für jede Maus ermittelt. Der CAE-Score war mit einem Median von 1,6 in der PEA-Gruppe und einem Wert von 1,7 in der DMSO-Gruppe in beiden Gruppen nahezu identisch ( $p = 0,36$ , Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 12).



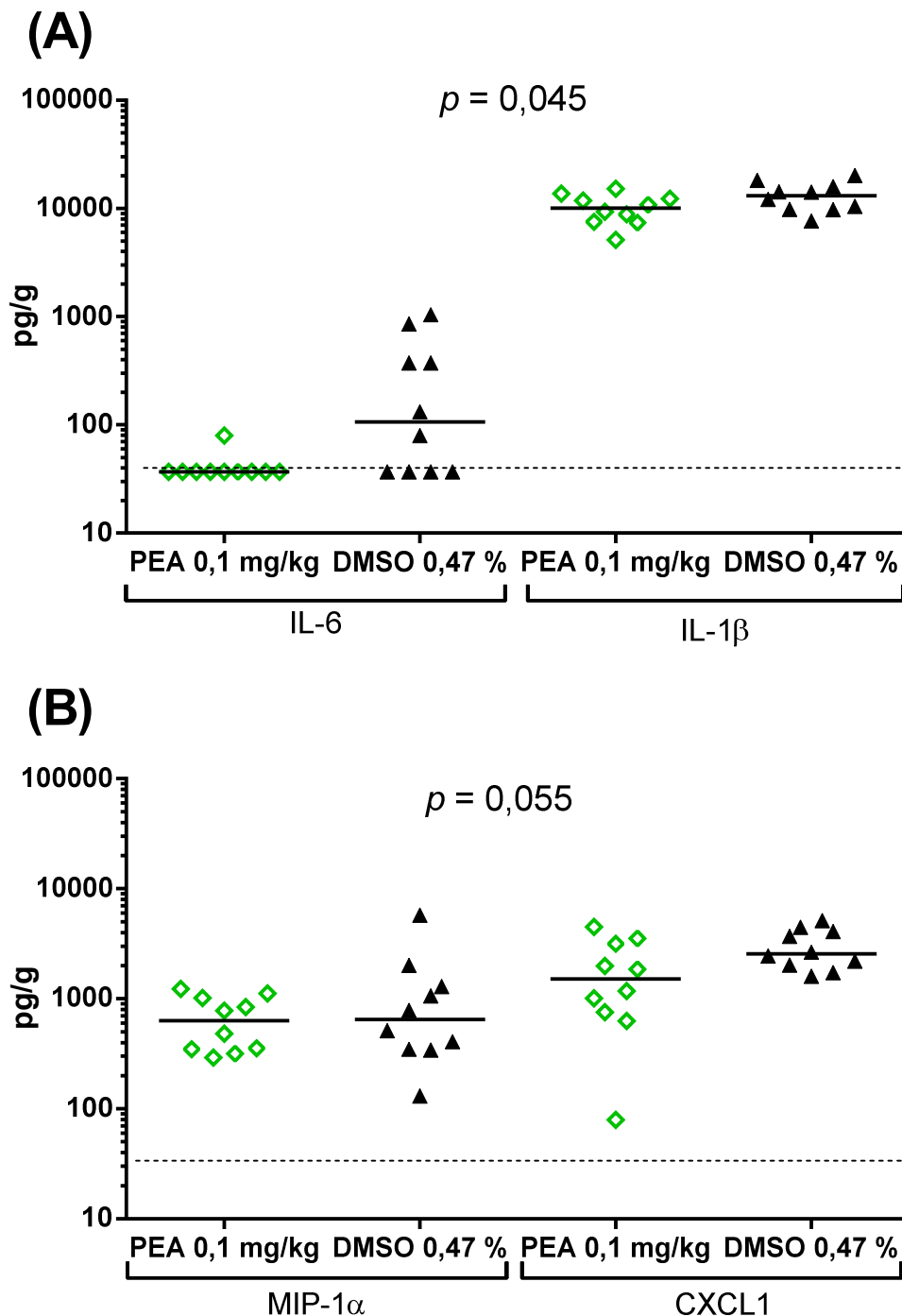
**Abbildung 12: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) auf den meningealen Inflammationsscore in alten Mäusen 24 Stunden nach Infektion.** Das Streudiagramm zeigt die Anzahl der CAE-angefärbten Zellen als meningealen Inflammationsscore zur Beurteilung der Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Subarachnoidalraum und das Hirnparenchym mit Werten von 0 (0 Zellen), 1 (1-9 Zellen), 2 (10-49 Zellen) bis 3 ( $\geq 50$  Zellen) in den beiden Behandlungsgruppen. Jeder Punkt steht für eine Maus und stellt den Durchschnitt der sechs beurteilten kortikalen Regionen dar (40fache Vergrößerung). Die waagrechte Linie entspricht dem Median. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, wobei sich die Differenz zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschied.

Die proinflammatorischen Entzündungsmarker wurden mit einem ELISA in Milz- und Cerebellum-Homogenaten gemessen. In unserer Studie korrelierten Bakterienkonzentrationen in der Milz mit den Levels von IL-6 ( $r_s = 0,45$ ;  $p = 0,049$ ), aber nicht mit den Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  und CXCL1 ( $-0,05 < r_s < 0,09$ ). Es zeigten sich in der Milz von PEA-vorbehandelten Mäusen signifikant niedrigere Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen (IL-6 und IL-1 $\beta$ ), verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p = 0,045$ , multivariater Rangsummentest mit nachfolgender Holm-Bonferroni-Korrektur; Abbildung 13A). Dieser Effekt war für IL-6 besonders ausgeprägt ( $p = 0,038$ , Mann-Whitney-U-Test mit nachfolgender



Holm-Bonferroni-Korrektur). In der Milz waren neun von zehn PEA-behandelten Mäusen mit dem IL-6-Level unter dem Detektionslimit (37,5 pg/g). Weiterhin ergab sich eine Tendenz zu reduzierten Leveln an proinflammatorischen Chemokinen (MIP-1 $\alpha$  und CXCL1) in der Milz ( $p = 0,055$ , multivariater Rangsummentest mit nachfolgender Holm-Bonferroni-Korrektur; Abbildung 13B).

Im Kleinhirn bestand eine positive Korrelation zwischen der bakteriellen Last und den Konzentrationen von IL-6 ( $r_s = 0,77$ ;  $p < 0,0001$ ), IL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,61$ ;  $p = 0,004$ ), MIP-1 $\alpha$  ( $r_s = 0,87$ ;  $p < 0,0001$ ) und CXCL1 ( $r_s = 0,84$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n = 20$ ). PEA-vorbehandelte Mäuse tendierten zu reduzierten Leveln an Chemokinen, verglichen mit den Kontrolltieren ( $p = 0,10$ , multivariater Rangsummentest mit nachfolgender Holm-Bonferroni-Korrektur), und zu einer niedrigeren Bakterienkonzentration im Kleinhirn. Die Level an Zytokinen im Kleinhirn unterschieden sich in den PEA-vorbehandelten Tieren und den Kontrolltieren nicht signifikant ( $p = 0,38$ , multivariater Rangsummentest mit nachfolgender Holm-Bonferroni-Korrektur).



**Abbildung 13: Effekt der PEA-Prophylaxe auf das entzündliche Milieu in der Milz alter Mäuse 24 Stunden nach i.c. Infektion mit *E. coli* K1.** Konzentrationen (in pg/g) an proinflammatorischen Zytokinen Interleukin(IL)-1 $\beta$ , IL-6 **(A)**, proinflammatorischen Chemokinen *macrophage inflammatory protein 1 alpha* (MIP-1 $\alpha$ ) und *chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (CXCL1) **(B)** wurden in der Milz von alten infizierten Mäusen nach PEA- bzw. DMSO-Behandlung gemessen (n = 10/Gruppe). Jeder Punkt im Streudiagramm repräsentiert eine Maus. Der durchgezogene schwarze Strich entspricht dem Median und die gestrichelte schwarze Linie dem Detektionslimit (37,5 pg/g). Bei den proinflammatorischen Zytokinen lagen 14 Werte und bei den proinflammatorischen Chemokinen kein Wert unter der Nachweisgrenze. Die statistische Analyse wurde mit dem multivariaten

Rangsummentest und nachfolgender Holm-Bonferroni-Korrektur der  $p$ -Werte für mehrfaches Testen im gleichen Organ durchgeführt, der einen Effekt der PEA-Prophylaxe auf (i) proinflammatorische Zytokine (gemeinsame Analyse von IL-6 und IL-1 $\beta$ ), (ii) proinflammatorische Chemokine (gemeinsame Analyse von MIP-1 $\alpha$  und CXCL1) testet. Die Konzentrationen wurden 24 Stunden nach i.c. Infektion mit *E. coli* K1 mittels ELISA bestimmt. Die Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen waren in der Milz der PEA-Gruppe signifikant niedriger, verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p = 0,045$ , multivariater Rangsummentest mit Holm-Bonferroni-Korrektur), wobei der Effekt für IL-6 besonders ausgeprägt war ( $p = 0,038$ , Mann-Whitney-U-Test mit Holm-Bonferroni-Korrektur). Weiterhin ergab sich eine Tendenz zu reduzierten Leveln an proinflammatorischen Chemokinen in der Milz der PEA-Gruppe ( $p = 0,055$ , multivariater Rangsummentest mit nachfolgender Holm-Bonferroni-Korrektur).

Zusammenfassend betrachtet konnte in den 24 h-Experimenten eine signifikant niedrigere Bakterienkonzentration in Milz, Blut und Leber der PEA-vorbehandelten Mäuse beobachtet werden. Damit einher gingen reduzierte Konzentrationen an proinflammatorischen Mediatoren (IL-6, IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  und CXCL1) in der Milz der PEA-Gruppe. Im Gehirn als dem primären Infektionsort zeigte sich eine Tendenz zu niedrigeren Bakterientitern und proinflammatorischen Chemokinen sowie ein signifikant erniedrigter Mikroglia-AS. Hier korrelierten hohe Bakterienkonzentrationen mit hohen Chemokinleveln und Mikroglia-AS.

### **3.2 Der Effekt einer PEA-Prophylaxe auf das Überleben und die Immunantwort neutropenischer Mäuse nach intrazerebraler Infektion mit *E. coli* K1**

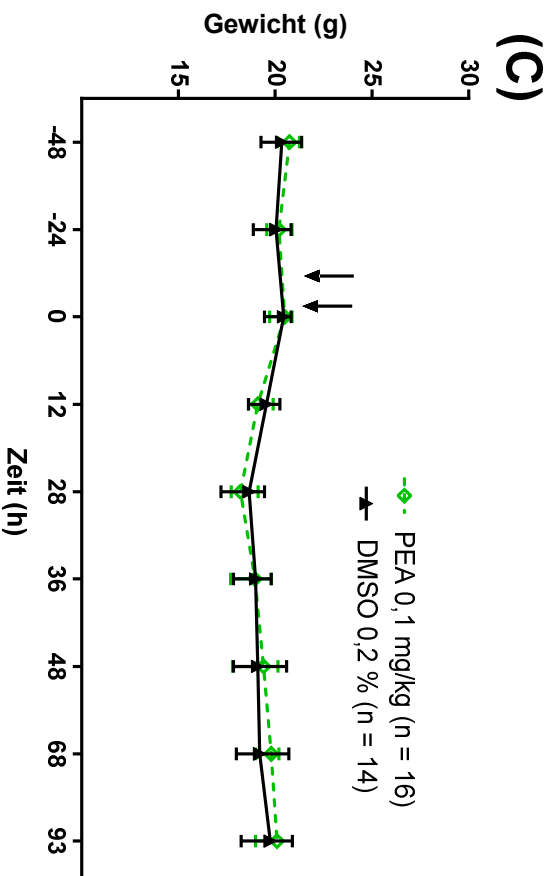
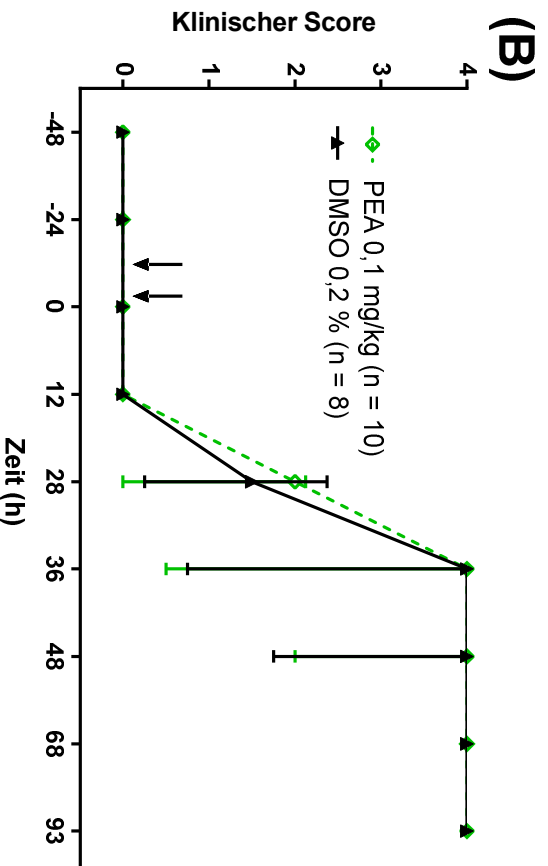
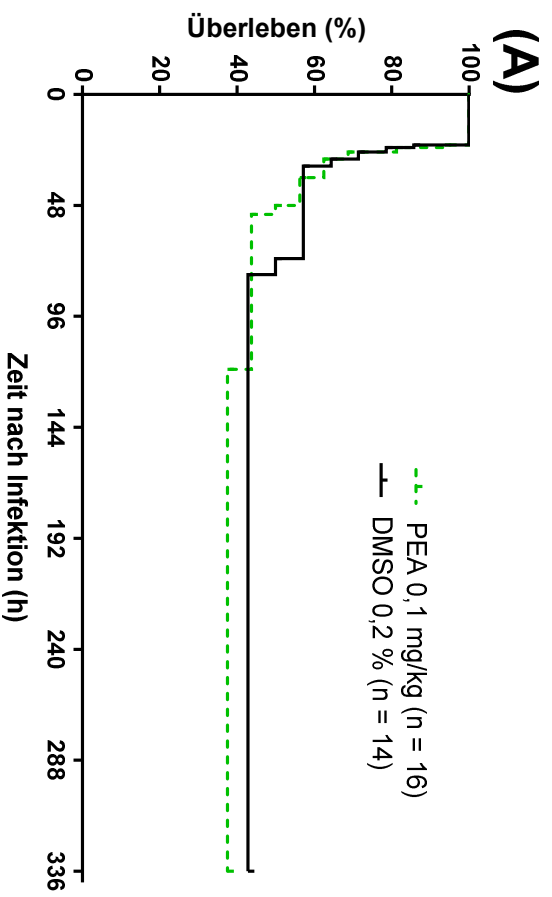
Als ein zweites Modell für Immundefizienz wurden Mäuse mit einer Neutropenie gewählt, da neutropenische Mäuse anfälliger für *E. coli* K1-Meningitis sind als immunkompetente Mäuse (Ribes et al. 2014). Zur Untersuchung des Effektes der PEA-Prophylaxe auf das Überleben und die Immunantwort neutropenischer Mäuse mit Meningoenzephalitis wurden vier Überlebensversuche mit insgesamt 73 Mäusen in einem Alter von 8-14 Wochen durchgeführt. Der Ablauf der Versuche entsprach dem in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Schema der Überlebensversuche. Zusätzlich wurden die Mäuse zur Induktion der Neutropenie zwei Tage vor bis drei Tage nach der Injektion von *E. coli* wie in demselben Kapitel beschrieben mit dem Anti-Ly-6G-Antikörper (clone 1A8) behandelt. Dieser Antikörper depletiert spezifisch neutrophile Granulozyten (Daley et al. 2008; Wang et al. 2012). In zwei Versuchen ( $n = 30$ ) erhielten die Mäuse eine PEA-Dosis von 0,1 mg/kg und in den anderen beiden Versuchen ( $n = 43$ ) eine höhere Dosis von 1 mg PEA/kg jeweils 12 Stunden und 30 Minuten vor Infektion. Nach 14 Tagen wurden alle überlebenden Mäuse getötet.

In den zwei Versuchen mit der geringeren PEA-Dosis von 0,1 mg/kg PEA bzw. 0,2%iger DMSO/NaCl-Lösung wurden weibliche, Anti-Ly-6G-depletierte Mäuse (n = 30) des Stammes C57BL/6 und mit einem medianen Startgewicht von 20,8 g in der PEA-Gruppe bzw. von 20,4 g in der Kontrollgruppe durch i.c. Injektion von 650 CFU *E. coli* K1 infiziert und für 14 Tage beobachtet.

Die Abbildung 14A stellt die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier mit dem Überleben in % in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden nach Infektion dar. Nach 14 Tagen waren in der PEA-Gruppe noch 37,5 % (6/16) und in der DMSO Gruppe noch 42,9 % (6/14) der Mäuse am Leben. Eine prophylaktische Gabe von PEA in der angewendeten Dosis hatte keinen Einfluss auf die mediane Überlebenszeit der Mäuse nach Infektion mit *E. coli* K1 ( $p = 0,83$ , Log-rank-Test; Abbildung 14A).

Die klinischen Symptome wurden anhand des etablierten CS bewertet (siehe Kapitel 2.2.2). Alle Mäuse, die einen CS größer null entwickelten, verstarben auch an der Infektion, mit Ausnahme einer Maus, die nur einmalig bei ansonsten asymptomatischer Klinik einen Score von 1 zeigte. In die Auswertung des CS wurden deshalb nur an der Infektion verstorbene Mäuse einbezogen. Getötete Mäuse wurden mit einem Score von 4 weiterhin berücksichtigt. Der Verlauf des medianen CS war hier in beiden Gruppen ähnlich. Er stieg in beiden Gruppen zwölf Stunden nach Infektion an (Abbildung 14B). 36 Stunden p. i. hatte der mediane CS der an der Infektion verstorbenen Mäuse in beiden Gruppen einen Wert von 4 ( $p = 1,0$ , Mann-Whitney-U-Test).

Die Abbildung 14C weist das mediane BW im Verlauf von zwei Tagen vor bis 93 Stunden nach der Infektion auf. Das mediane BW unterschied sich in den beiden Gruppen zum Zeitpunkt der Infektion nicht signifikant. Nach der Infektion fiel es in beiden Gruppen ab und stieg nach 28 Stunden wieder an. 36 Stunden nach der Infektion betrug das mediane BW in der PEA-Gruppe 19,0 g (10/16) und in der DMSO-Gruppe 19,0 g (9/14). Zusammenfassend hatte die prophylaktische Gabe von PEA in der angewendeten Dosis keinen signifikanten Effekt auf den CS oder das BW verglichen mit der Kontrollgruppe 36 Stunden nach Infektion.



**Abbildung 14: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 mg/kg) auf die Überlebensdauer neutropenischer Mäuse mit *E. coli* K1-Meningitis.** (A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit dem Überleben in % ( $p = 0,83$ , Log-rank-Test), (B) CS der verstorbenen Mäuse als Median  $\pm$  Interquartilsabstand zwischen dem 0,25- und 0,75-Quantil über 2 Tage vor bis 93 Stunden nach Infektion. Alle überlebenden Mäuse entwickelten mit Ausnahme einer Maus, die einmalig einen Score von 1 aufwies bei sonst asymptomatischem Befund, keinen CS über null. (C) Verlauf von Gewicht in Gramm mit Darstellung des Median mit dem Interquartilsabstand zwischen dem 0,25- und 0,75-Quantil. Die statistische Analyse erfolgte in (B) und (C) mit dem Mann-Whitney-U-Test 36 Stunden p. i. zum Vergleich der beiden Gruppen, wobei sich die Differenzen nicht signifikant unterschieden. 650 CFU *E. coli* K1 wurden neutropenischen Mäusen ( $n = 30$ ) i.c. injiziert. 12 Stunden und 30 Minuten vor Injektion wurde den Mäusen 0,1 mg/kg PEA (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl mit 0,2 % DMSO) bzw. der Kontrollgruppe 0,2 % DMSO (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl) i.p. appliziert (Pfeile). 14 Tage p. i. wurden alle Mäuse getötet.

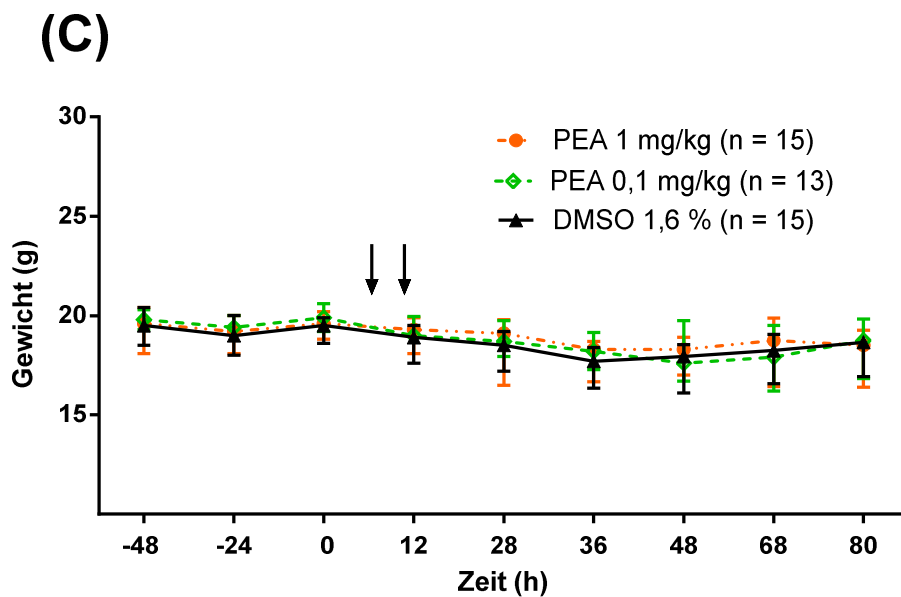
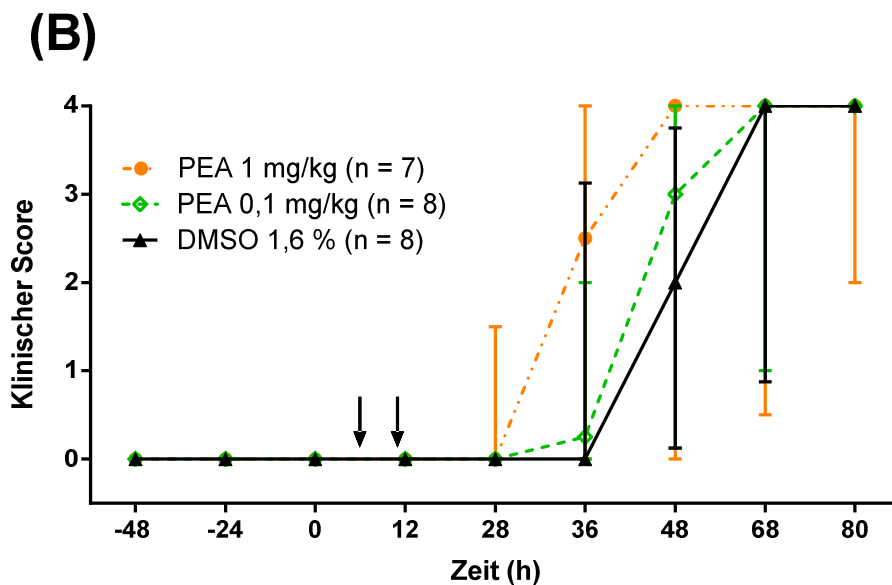
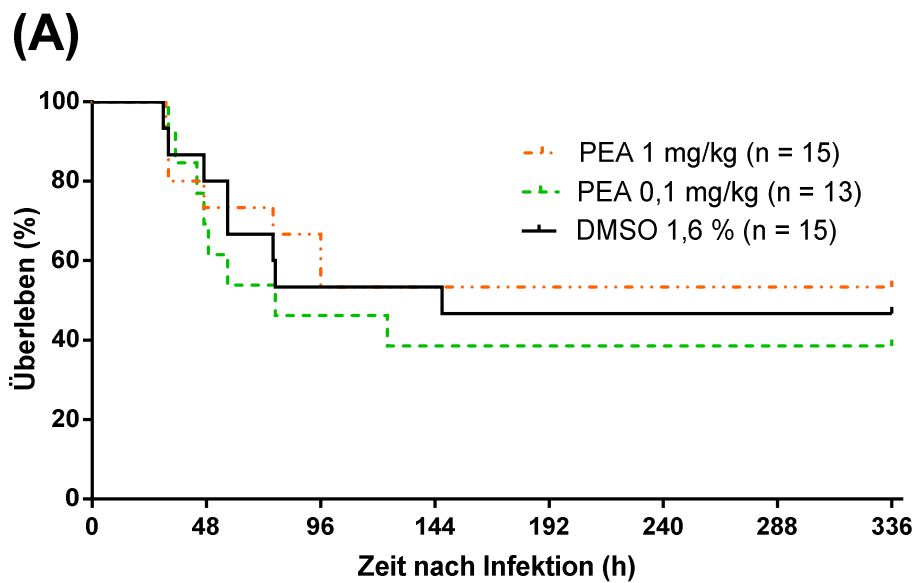
In den zwei Versuchen mit der zusätzlichen höheren Dosis von 1 mg/kg PEA bzw. 1,6%iger DMSO/NaCl-Lösung erhielten 43 weibliche, Anti-Ly-6G-depletierte Mäuse des Stammes C57BL/6 eine i.c. Injektion von 790 CFU *E. coli* K1 pro Maus. Das mediane Startgewicht betrug 19,6 g in der PEA-Gruppe mit der höheren Dosis bzw. 19,9 g in der PEA-Gruppe mit der niedrigeren Dosis und 19,5 g in der Kontrollgruppe.

Wie die Kaplan-Meier-Überlebenskurve dieses Versuchs zeigt (Abbildung 15A), waren nach 14 Tagen in der PEA-Gruppe mit der höheren Dosis 53,3 % (8/15), mit der niedrigen Dosis 38,5 % (5/13) und in der DMSO-Gruppe 46,7 % (7/15) der Mäuse am Leben. Die prophylaktische Gabe von PEA in den angewendeten Dosierungen verlängerte das Überleben nicht signifikant ( $p = 0,75$ , Log-rank-Test).

Der Abbildung 15B und C sind die Mediane des CS und des BW in einem Zeitintervall von 2 Tagen vor bis 80 Stunden nach Infektion zu entnehmen. Auch hier erlagen alle Mäuse, die einen CS größer null entwickelten, der Infektion, mit Ausnahme einer Maus, die zweimalig einen Score von 1 aufwies bei sonst asymptomatischem Befund. In die Auswertung des CS wurden daher wie zuvor nur die Mäuse, die während des Experiments verstarben, miteinbezogen. Nach 36 Stunden p. i. betrug der Median in der PEA-Gruppe der höheren Dosis 2,5 und in den anderen beiden Gruppen 0 ( $p = 0,53$ , Kruskal-Wallis-Test).

Das Startgewicht unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Nach der Infektion fiel es in beiden Gruppen ab und stieg in der PEA-Gruppe mit der höheren Dosis und der DMSO-Gruppe nach 36 h, in der PEA-Gruppe mit der niedrigeren Dosis nach 48 Stunden wieder an. 36 Stunden nach der Infektion betrug der Median des BW in der PEA-Gruppe mit der höheren Dosis 18,3 g (12/15), mit der niedrigen Dosis 18,2 g (12/13) und in der DMSO-Gruppe 17,7 g (13/15) und unterschied sich nicht signifikant ( $p = 0,34$ , Kruskal-Wallis-Test). Zusammenfassend beeinflusste die prophylaktische Gabe von PEA in niedriger und hoher

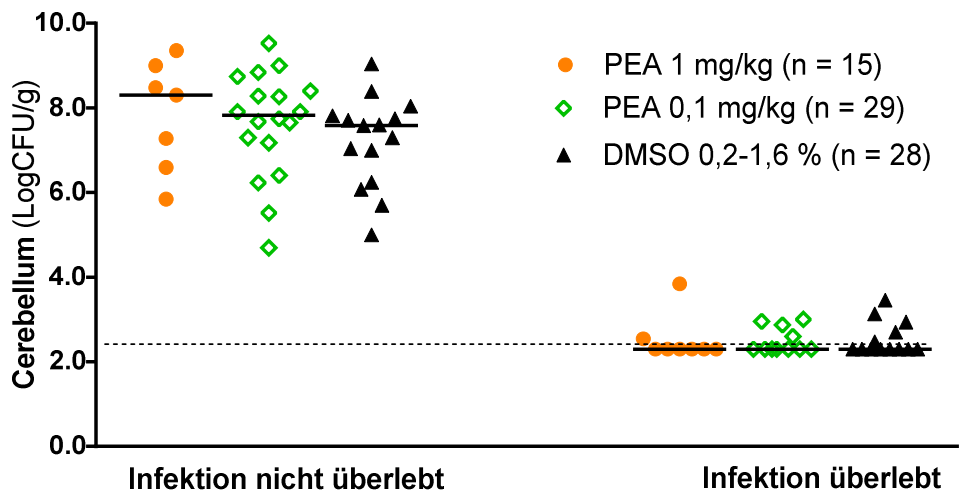
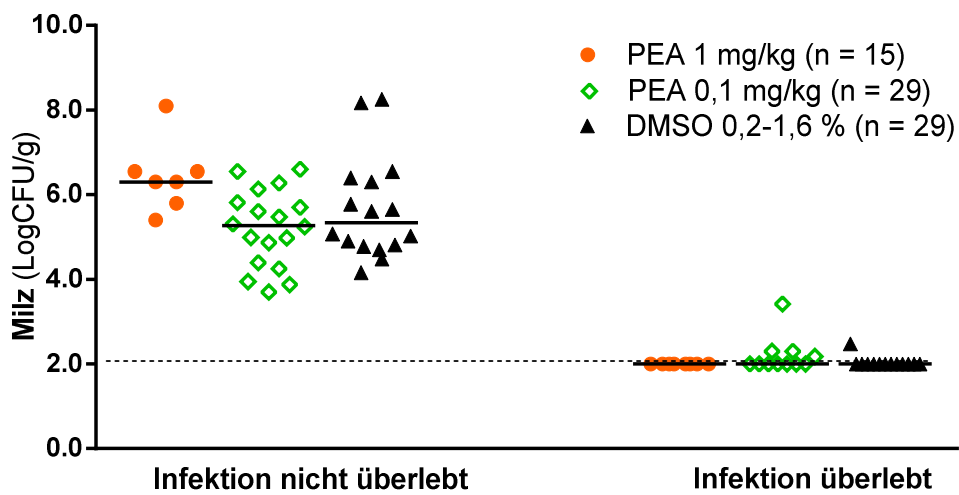
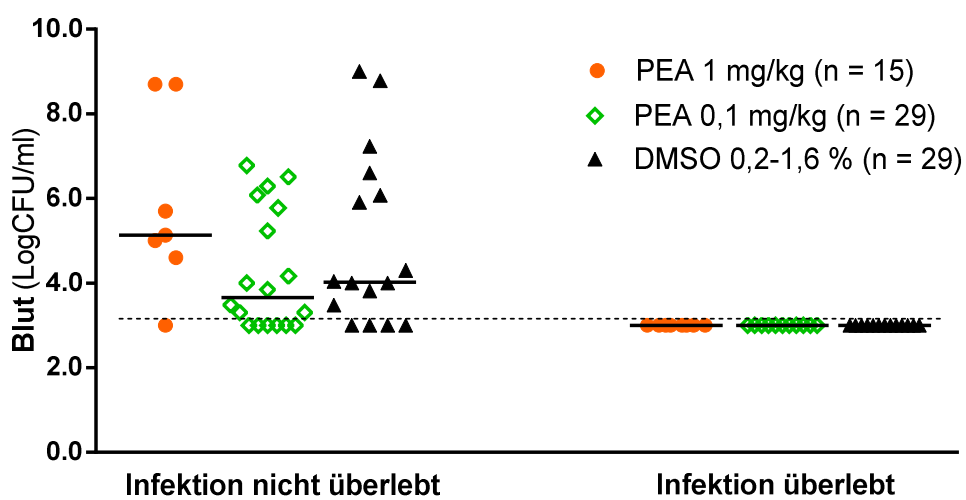
Dosis den CS und das BW von neutropenischen Mäusen 36 Stunden nach Infektion nicht signifikant.





**Abbildung 15: Effekt einer höheren prophylaktischen Dosis von PEA (1 mg/kg) auf die Überlebenszeit neutropenischer Mäuse nach *E. coli* K1-Infektion.** (A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit dem Überleben in % ( $p = 0,57$ , Log-rank-Test). (B) CS der verstorbenen Mäuse als Median  $\pm$  Interquartilsabstand zwischen dem 0,25- und 0,75-Quantil über 2 Tage vor bis 80 Stunden nach Infektion. Alle überlebenden Mäuse entwickelten mit Ausnahme einer Maus, die zweimalig einen Score von 1 aufwies bei sonst asymptomatischem Befund, keinen CS über null. (C) Verlauf des BW mit Darstellung des Median  $\pm$  Interquartilsabstand zwischen dem 0,25- und 0,75-Quantil. Die statistische Analyse erfolgte in (B) und (C) mit dem Kruskal-Wallis-Test 36 Stunden p. i. zum Vergleich der drei Gruppen, wobei sich die Differenzen nicht signifikant unterschieden. Eine Infektionsdosis von 790 CFU *E. coli* K1 wurde neutropenischen Mäusen ( $n = 43$ ) i.c. injiziert. 12 Stunden und 30 Minuten vor Injektion wurde den Mäusen 1 mg/kg PEA bzw. 0,1 mg/kg PEA (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl mit 1,6 % DMSO) und der Kontrollgruppe 1,6 % DMSO (in 250  $\mu$ l isotonem NaCl) i.p. appliziert (Pfeile). Nach 14 Tagen p. i. wurden alle Mäuse getötet.

Nach der Tötung einer Maus wurden direkt die Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut bestimmt. Aufgrund des bei beiden Medikamentendosierungen nicht nachweisbaren Effektes von prophylaktischem PEA auf die Überlebenszeit und den sonst gleichen Bedingungen wurden die Bakterienkonzentrationen für alle vier Versuche zusammen ausgewertet. Die Abbildung 16 enthält für jedes der drei Organe ein Streudiagramm mit den Bakterienkonzentrationen in logCFU/g bzw. logCFU/ml jeder Maus zu ihrem Todeszeitpunkt. Jedes Diagramm ist in sechs Gruppen untergliedert mit den drei unterschiedlichen Prophylaxegruppen und jeweils aufgeteilt in die Mäuse, die der Infektion erlagen bzw. die sie überlebten. Die Nachweisgrenze lag im Cerebellum bei 200 CFU/g (2,3 logCFU/g) und in der Milz bei 100 CFU/g (2 logCFU/g) und im Blut bei 1000 CFU/ml (3 logCFU/ml), wobei im Kleinhirn 21, in der Milz 29 und im Blut 43 Tiere unter der Nachweisgrenze lagen. Bei allen Tieren, die Werte unter der Nachweisgrenze aufwiesen, wurde für statistische Zwecke im Kleinhirn 199 CFU/g, in der Milz 99 CFU/g und im Blut 999 CFU/ml eingetragen. In allen drei Organen hatten die Mäuse, die die Infektion überlebten, zu mehr als 65% einen Bakterientiter unter der Nachweisgrenze. Die Tiere, die an der Infektion verstarben, hatten in mindestens zwei der drei Organe eine Bakterienkonzentration deutlich über der Nachweisgrenze. In Cerebellum, Milz und Blut unterschieden sich die Bakterienkonzentrationen der drei Gruppen nicht signifikant voneinander. Zusammenfassend hatte die prophylaktische Gabe von PEA keinen signifikanten Effekt auf die Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut bei Mäusen mit einer Neutropenie in der späten Phase der Infektion.

**(A)****(B)****(C)**

**Abbildung 16: Effekt von PEA-Prophylaxe (Dosis 0,1 und 1 mg/kg PEA) auf die Bakterientiter in Kleinhirn, Milz und Blut von neutropenischen Mäusen nach i.c. *E. coli* K1-Infektion zum Todeszeitpunkt bzw. nach 14 Tagen.** Bakterienkonzentrationen (in logCFU/g bzw. logCFU/ml) in Kleinhirn **(A)**, in Milz **(B)** und im Blut **(C)** bei gestorbenen und überlebenden Mäusen (n = 72). Jeder Punkt entspricht einer Maus. Die durchgezogene schwarze Linie kennzeichnet den Median und die gestrichelte schwarze Linie die Detektionsgrenze. Im Kleinhirn und in der Milz lagen 21 bzw. 29 Proben unter der Nachweisgrenze von 200 CFU/g (2,3 logCFU/g) bzw. 100 CFU/g (2 logCFU/g). Im Blut waren 43 Proben unter der Nachweisgrenze von 1000 CFU/ml (3 logCFU/ml). Für alle Tiere, die Werte unter der Nachweisgrenze aufwiesen, wurde für die statistische Analyse im Kleinhirn 199 CFU/g, in der Milz 99 CFU/g und im Blut 999 CFU/ml eingetragen. Die statistische Analyse erfolgte in (A), (B) und (C) mit dem Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der drei Gruppen, wobei sich die Differenzen nicht signifikant unterschieden. 650 bzw. 790 CFU *E. coli* K1 wurde neutropenischen Mäusen i.c. injiziert. Jeweils 12 Stunden und 30 Minuten vor Injektion wurde den Mäusen 1 mg/kg PEA (in 250 µl isotonem NaCl mit 0,2 bzw. 1,6 % DMSO; n = 15), 0,1 mg/kg PEA (in 250 µl isotonem NaCl mit 0,2 bzw. 1,6 % DMSO; n = 29) und der Kontrollgruppe 0,2 bzw. 1,6 % DMSO (in 250 µl isotonem NaCl; n = 28) i.p. appliziert. Nach 14 Tagen p. i. wurden alle Mäuse getötet.

Die prophylaktische Gabe von PEA in hoher und niedriger Dosis von 1 mg/kg bzw. 0,1 mg/kg PEA steigerte somit weder die Überlebensdauer noch verhinderte sie die Entwicklung einer Sepsis von Mäusen mit einer Neutropenie nach i.c. Injektion von *E. coli* K1.

## 4 Diskussion

### 4.1 Steigerung der Resistenz alter Mäuse gegen *E. coli*-Meningitis durch PEA-Prophylaxe

In Anbetracht der erhöhten Morbidität und Mortalität älterer und immunsupprimierter Menschen mit bakterieller Meningoenzephalitis war es das Hauptziel dieser Arbeit, ein Prophylaktikum zu finden, das das angeborene Immunsystem stimulieren kann, um die Infektion und deren Ausbreitung durch Vermehrung der Meningitis-Bakterien zu Beginn der Infektion ohne bzw. vor dem Einsatz von Antibiotika zu supprimieren. Ein solcher komplementärer Ansatz könnte im Sinne der rationalen Antiinfektivaverordnung (Antibiotic Stewardship) zur Reduktion bzw. Verbesserung des Gebrauchs antimikrobieller Substanzen führen, was besonders in *Long-Term Care Facilities* (LTCFs) relevant ist. In ähnlicher Zielsetzung wurden bereits Nutraceuticals – von den englischen Begriffen *nutrition* (Ernährung) und *pharmaceutical* (Arzneimittel) stammend - zur Stimulierung des Immunsystems der älteren Bevölkerung verwendet (High 2001). Beispielsweise wurde in Studien eine Reduktion von Infektionen bei älteren Menschen durch prophylaktische Einnahme von Zink, Selen und einigen Vitaminen beobachtet (Girodon et al. 1997). Auch endogene Lipide tragen zur Homöostase und Modulation der Immunantwort bei (Chiurchiu und Maccarrone 2016).

Die Ergebnisse unserer Arbeit haben nun erstmals gezeigt, dass eine prophylaktische Gabe des Endocannabinoid-ähnlichen Lipids PEA bei i.c. *E. coli*-Infektion alter Mäuse mit 800 CFU ohne den Einsatz von Antibiotika einen Überlebensvorteil und eine Verzögerung des Symptombeginns bewirkt. Zwar gelang in der vorliegenden Untersuchung lediglich der Nachweis einer statistisch signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit, die Letalität in der PEA-Gruppe bei Infektion mit 800 CFU lag aber bei 55,6 % (5/9) im Vergleich zu 88,9 % (8/9) in der Kontrollgruppe. Diese hohe Differenz war aufgrund der relativ geringen Fallzahl statistisch nicht signifikant, d. h. die Power der Untersuchung war höchstwahrscheinlich zu gering. Da alte Mäuse sehr teuer sind und nur begrenzte finanzielle Ressourcen zur Verfügung standen, ist dies ein unvermeidbares Manko unserer Untersuchung. In vivo wurde bereits gezeigt, dass prophylaktisches PEA in der gleichen Dosis die Überlebenswahrscheinlichkeit junger immunkompetenter Mäuse um 20 % erhöhte (Redlich et al. 2014). Dieser Effekt in jungen immunkompetenten Mäusen wurde nun erstmals in alten Mäusen nachgewiesen, entsprechend der Hypothese, dass PEA als Immunmodulator der angeborenen Immunantwort antientzündliche und antiinfektiöse (Phagozyten-stimulierende) Eigenschaften besitzt (Esposito und Cuzzocrea 2013; Raskova et al. 1972). Mit steigenden Infektionsdosen und konsekutiv

steigender Letalität nahm der prophylaktische Effekt von PEA ab und war bei der höheren Infektionsdosis von 1300 CFU nicht mehr nachweisbar.

In der frühen Phase nach Infektion war die PEA-Prophylaxe mit geringeren bakteriellen Titern in Milz, Leber und Blut assoziiert, was auf eine systemische Wirkung von i.p. verabreichtem PEA hindeutet. In welchem Ausmaß die durch PEA-Prophylaxe bewirkte Reduktion der systemischen Bakterienkonzentration zusätzlich auf die erhöhte Bakterien-Elimination durch Makrophagen zurückgeht oder auf eine geringere Ausbreitung der Bakterien aus dem Gehirn bei lokal reduzierten Bakterientitern zurückzuführen ist, ließ sich durch diese Experimente nicht hinreichend klären. Der ausgeprägte Effekt in der Milz und im Blut im Vergleich zum Kleinhirn spricht aber für einen zusätzlichen systemischen Effekt. Passend zu unserem Ergebnis zeigten Redlich et al. 2014, dass PEA nach Stimulation peritonealer Makrophagen mit LPS über PPAR $\alpha$  die bakterielle Phagozytoserate erhöhte und in vivo die systemische Bakterienkonzentration nach i.c. Infektion mit *E. coli* senkte. Da die systemischen Komplikationen bei alten Patienten mit bakterieller Meningitis primär die zum Tode führenden sind (Weisfelt et al. 2006; Nau et al. 1999), hat das verlängerte Überleben von 18 Stunden das Potential, zur Erweiterung des therapeutischen Fensters, in welchem der Beginn einer antibiotischen Therapie zur Rettung des Patienten führen kann, beizutragen (Nau et al. 2015). Es ist anzunehmen, dass i.p. gegebenes PEA auch in alten Mäusen im ZNS antiinfektiös wirkt, wie es für junge immunkompetente Mäuse gezeigt wurde (Redlich et al. 2014). Dafür spricht, dass sich in den alten PEA-behandelten Mäusen eine starke Tendenz zu niedrigeren Bakterienkonzentrationen im Cerebellum und eine erniedrigte Mikrogliaaktivität nachweisen ließ, obwohl das Gehirn das am stärksten betroffene Organ der primären Infektion war. Möglicherweise kann eine während der Infektion fortgesetzte Prophylaxe den antiinfektiösen Effekt noch erhöhen, da zwar PEA aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft in Anteilen die BHS passiert, es allerdings Hinweise für einen schnellen Abfall der Plasmaspiegel nach Applikation gibt (Petrosino und Di Marzo 2017).

Im Alter ist das Gehirn wie der Gesamtorganismus in einem leichten proinflammatorischen Status mit aktivierten Mikrogliazellen und höheren Konzentrationen an proinflammatorischen Mediatoren (von Bernhardt et al. 2015; Sparkman und Johnson 2008; Perry et al. 2007). Dabei ist die proinflammatorische Aktivität nach Infektionen im Alter verlängert (Bruunsgaard et al. 1999; Tateda et al. 1996). In unseren Experimenten senkte die PEA-Prophylaxe in der Milz die proinflammatorischen Mediatoren (IL-6, IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , CXCL1), die dafür bekannt sind, durch zerebrales Ödem, Vaskulitis, neuronalen und axonalen Schaden einen letalen Ausgang oder neurologische Langzeitschäden in Meningitis-Patienten zu verursachen (Nau und Brück 2002; Nau et al. 2004). Auch im Gehirn zeigte sich eine Tendenz zu geringeren Leveln an

Chemokinen in der PEA-Gruppe. Diese Ergebnisse bestätigen die Studienergebnisse von Redlich et al. 2014, die einen dämpfenden Effekt von PEA-Prophylaxe auf CXCL1, IL-6 und IL-1 $\beta$  sowohl im Gehirn wie auch in der Milz in jungen immunkompetenten Mäusen mit Meningitis darlegten. Verglichen mit vorherigen Studien, die einen neuroprotektiven Effekt bei höheren Dosen von 1-10 mg/kg (Esposito et al. 2012; Impellizzeri et al. 2017) beobachteten, wurde hier gezeigt, dass auch niedrige Dosen von PEA (0,1 mg/kg) das Überleben alter Mäuse nach Infektion verlängern können. Ob PEA ausschließlich über die signifikant geringere bakterielle Last und die geringere Mikroglia- bzw. Makrophagenaktivität zu einer Senkung der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine führt oder diese zusätzlich direkt herabsetzt, ließ sich durch unsere Experimente nicht hinreichend klären. Andere Studien zeigten sowohl, dass Mikroglia, perivaskuläre Makrophagen, Astrozyten und Endothelzellen auf eine i.c. Injektion von Bakterien vermehrt IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL1 und MIP-2 produzierten (Ribes et al. 2013; Hanisch und Kettenmann 2007) als auch, dass PEA über die Hochregulierung von PPAR $\alpha$  die Freisetzung von Interleukinen und TNF- $\alpha$  in einem nichtinfektiösen Modell von Rückenmarksverletzung herabsetzte (Esposito et al. 2012; Esposito und Cuzzocrea 2013).

Zusätzlich zu der reduzierten proinflammatorischen Antwort beobachteten wir 24 Stunden nach Infektion signifikant weniger morphologische Zeichen von Mikrogliaaktivierung in alten Mäusen mit PEA-Prophylaxe als in der Kontrollgruppe. Da Leukozyten für die Migration ins ZNS längere Zeit brauchen (Ernst et al. 1983; Nau et al. 2014), nimmt in dieser frühen Phase nach Infektion die lokale Immunabwehr mit Mikroglia und residenten Makrophagen eine entscheidende Rolle ein. Diese phagozytieren und eliminieren die Bakterien und treten dazu in Interaktion mit den zirkulierenden Immunzellen (Nau und Brück 2002). Die Immunantwort des ZNS in den ersten Stunden bestimmt, ob die Infektion ohne Antibiotika überlebt wird oder nicht (Ernst et al. 1983; Nau et al. 2014). Alle Mäuse, die schwere klinische Symptome (CS > 1) entwickelten, verstarben hier an der Infektion. Mäuse, die die Infektion überlebten, zeigten entweder keine oder nur sehr milde klinische Symptome in den ersten Stunden nach i.c. Infektion. Mikroglia kann auf Pathogene hin eine Änderung der Morphologie und Funktion erfahren. Aktivierte Mikrogliazellen haben kleine Kerne und kurze Ausläufer und können die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren erhöhen (Colton 2009). Wie bereits erwähnt, kann das im Alter leicht erhöhte proinflammatorische Milieu zu einer Mikrogliaaktivierung führen (von Bernhardt et al. 2015; Perry et al. 2007). In alten Mäusen ist die Fähigkeit nicht-stimulierter und durch TLR-Agonisten stimulierter Mikroglia, *E. coli* zu phagozytieren, beeinträchtigt, verglichen mit den Mikrogliazellen junger Mäuse (Median von 39.3 % versus 100 %; Schütze et al. 2014). In dem 24 h-Experiment zeigten PEA-behandelte Mäuse häufiger moderat aktivierte Mikroglia mit einer verzweigt-hypertrophen Morphologie und die

Kontrollgruppe eine stärker aktivierte, hypertroph-buschige Form. Dazu passend zeigte sich eine statistische Tendenz zu niedrigeren Chemokinleveln und Bakterientitern im Cerebellum. Andere Studien berichten ebenfalls von einer Senkung erhöhter Mikrogliaaktivität durch PEA (Esposito et al. 2012; Luongo et al. 2013). Passend dazu legen aktuelle Ergebnisse nahe, dass PEA einen antiinflammatorischen Effekt auf „aktivierte enterische Gliazellen“ bei intestinaler Entzündung ausübt (Ochoa-Cortes et al. 2016). Weiterhin gibt es In-vitro-Studien, die eine erhöhte Phagozytoserate von Mikroglia mit hypertropher Morphologie nach PEA-Behandlung nahelegen (Guida et al. 2017; Redlich et al. 2012). Zu klären bleibt, ob der hier beobachtete verminderte AS auf die geringere Bakterieninvasion und Chemokinkonzentration zurückzuführen ist oder einen Effekt der homöostatischen Eigenschaft von PEA darstellt. Im 24 h-Experiment tendierten hohe Kleinhirn-Bakterienkonzentrationen mit hohen AS zu korrelieren. In den Überlebensversuchen war die Mikrogliaaktivität nicht mehr signifikant unterschiedlich, was wahrscheinlich auf den späten Zeitpunkt der Tötung zurückzuführen ist. Bei vorzeitiger Tötung waren die Tiere schon sehr krank mit stark aktivierter Mikroglia und hoher Bakterienkonzentration, oder sie überlebten die Infektion 14 Tage mit überwiegend wenig aktivierter Mikroglia mit schmalen Ausläufern und nicht mehr nachweisbaren bzw. sehr niedrigen Bakterientitern. Die Frühphase, in der PEA vermutlich den entscheidenden und größten Einfluss auf die Mikrogliaaktivität und die Resistenz gegen die Infektion ausübt, wird am besten in dem 24 h-Experiment abgebildet.

Über welche Mechanismen und Rezeptoren PEA wirkt, ist erst in Ansätzen geklärt. Viele Effekte von PEA, wie die antientzündlichen, neuroprotektiven oder analgetischen Eigenschaften, sind u. a. über den PPAR $\alpha$  (LoVerme et al. 2005 und 2006), den TRPV1 (Ambrosino et al. 2013), den GPR55 (Pertwee 2007) und den Entourage Effekt (Jonsson et al. 2001) vermittelt. Die antiinfektiöse Wirkung von PEA, über die bisher wenig bekannt ist, beruht vermutlich auch nicht ausschließlich auf PPAR $\alpha$ -Stimulation. In einer In-vitro-Studie wurde nachgewiesen, dass die Phagozytose-Rate durch einen PPAR $\alpha$ -Antagonisten von zuvor mit PEA behandelten Makrophagen weniger stark gesenkt wurde als die von zuvor mit einem bekannten PPAR $\alpha$ -Agonisten stimulierten Makrophagen, was auf einen zusätzlichen PPAR $\alpha$ -unabhängigen Wirkmechanismus von PEA hindeuten könnte (Redlich et al. 2014). Kürzlich wurde erstmals ein antiinfektiöser Mechanismus von PEA über eine indirekte Wirkung auf den CB-Rezeptor Typ 2 durch eine PPAR $\alpha$ -vermittelte erhöhte Expression dieses Rezeptors beschrieben (Guida et al. 2017).

Weiterhin ist es von großem Interesse, in Folgearbeiten z. B. mit größeren Fallzahlen zur Erhöhung der Power und Erhärtung der beobachteten Tendenzen zu bestimmen, in welchem Ausmaß exogenes, i.p. verabreichtes PEA lokal auf das Gehirn wirkt und wie diese Wirkung

verbessert werden kann. Damit einher geht der Bedarf an weiterer Aufklärung des antiinfektiösen Wirkungsmechanismus von prophylaktischem PEA, z. B. an PPAR-alpha-, CB1/2-Rezeptor- und TRPV1-Knockout-Mäusen. Eine weitere Limitation dieser Studie ist der Gebrauch eines einzigen Pathogens zur Induktion der Meningoenzephalitis. Zusätzliche Studien sollten die Effektivität von PEA-Prophylaxe bei einem erweiterten Keimspektrum untersuchen.

Unsere Ergebnisse befürworten klinische Studien, in denen bei älteren immungeschwächten Patienten das Potential einer konstanten PEA-Prophylaxe zur Immunstimulation gegen Infektionen getestet wird. PEA ist als Nutraceutical verfügbar, aber auch in einigen Nahrungsmitteln wie Eigelb, Sojabohnen, Sojalecithin, Erdnussöl und Alfalfa sowie in kleineren Mengen in Erbsen und Tomaten enthalten (Petrosino und Di Marzo 2017). In den 70-er Jahren erwies sich das zu dieser Zeit unter dem Handelsnamen Impulsin (bis zu 1800 mg/Tag) erhältliche PEA in sechs klinischen Studien an 3600 Kindern und jungen Leuten als effektives Medikament zur Reduktion der Inzidenz und Schwere von akuten Atemwegsinfekten durch Influenza, indem es in unspezifischer Weise die Immunabwehr beeinflusst (Kahlich et al. 1979, Masek et al. 1974; Plesnik et al. 1977; Schmid et al. 1990). Seitdem wurden keine weiteren klinischen Studien mit PEA als Immunmodulator mit antiinfektiösen Eigenschaften durchgeführt. In-vivo- und In-vitro-Versuche bei *E. coli*-Infektion bestätigten jedoch die antiinfektiösen Eigenschaften in immunkompetenten Mäusen (Redlich et al. 2012 und 2014). Hier wurde erstmals gezeigt, dass PEA-Prophylaxe in alten Mäusen die Resistenz gegen i.c. Infektionen erhöht. In den durchgeführten Experimenten und in der klinischen Anwendung am Menschen sowie im Labor an Mäusen konnten bisher keine schwerwiegenden Nebenwirkungen der PEA-Prophylaxe beobachtet werden (Kahlich et al. 1979; Keppel Hesselink et al. 2013; Ribes et al. 2014). Im Gegensatz zur Stimulation von Makrophagen mit TLR-Agonisten und NOD2-Agonisten war die Stimulation mit PEA nicht begleitet von einer Freisetzung an proinflammatorischen Zyto-/Chemokinen, die bekanntlich Nervengewebe schädigen können (Redlich et al. 2012). Während der Immunstimulator CpG (100 µg einmalig) das BW von nichtinfizierten Mäusen signifikant senkte (Ribes et al. 2014), konnte bei der PEA-Prophylaxe keine Gewichtsreduktion festgestellt werden. Eine aktuelle Studie zeigt passend zu unseren Ergebnissen, dass i.p. und oral verabreichtes PEA signifikant und Dosis-abhängig den Gewichtsverlust in Mäusen mit induzierter Kolitis reduzierte (Borrelli et al. 2015). Möglicherweise beruht die fehlende Senkung des BW auf den verminderten systemischen Spiegeln an Chemokinen. Denn einige Chemokine können das BW senken (McCusker und Kelley 2013). Tumornekrosefaktor(TNF)- $\alpha$  beispielsweise kann einen Gewichtsverlust in Mäusen hervorrufen (Bluthé et al. 1994), und LPS intrazerebroventrikulär injiziert verursacht



eine zentrale Immunantwort mit erhöhten Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 im Gehirn der Mäuse und einen klinischen Gewichtsverlust (Park et al. 2011). Diese Beobachtungen sprechen für einen klinischen Einsatz von PEA als Prophylaktikum zur Steigerung der Resistenz gegen *E. coli*-Meningitis beim alten Menschen.

## **4.2 PEA-Prophylaxe bei neutropenischen Mäusen mit *E. coli*-Meningitis**

Die bakterielle Meningitis und Sepsis sind nach wie vor lebensbedrohliche Erkrankungen sowohl des alten Menschen, des Neonaten und Kleinkindes als auch des Immuninkompetenten, bei denen *E. coli* einen der wichtigsten Keime darstellt (Cabellos et al. 2009; Gaschignard et al. 2011). Bei immundefizienten Patienten mit Neutropenie wird die Meningitis häufig durch *E. coli* und andere gramnegative Bakterien aus dem eigenen Darmtrakt verursacht (Escudier et al. 1986). Nicht selten verlaufen Meningitiden bei diesen Risikogruppen mit schweren Komplikationen und hoher Letalität, mitverursacht durch multi-drug-resistentes, hoch virulentes *E. coli* vom Serotyp O75:H5:K1 (Iqbal et al. 2016). Daraus ergibt sich die Frage, wie die Immunabwehr des ZNS zum Schutz vor i.c. Infektionen insbesondere bei immungeschwächten Patienten stimuliert werden kann. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine i.p. Prophylaxe mit PEA die Überlebensdauer von neutropenischen Mäusen mit einer i.c. *E. coli*-Infektion nicht signifikant steigert, weder in einer hohen (1 mg/kg) noch in einer niedrigen Dosis (0,1 mg/kg) von PEA. Damit einher gingen nahezu identische Bakterienkonzentrationen in Cerebellum, Milz und Blut im Vergleich beider Gruppen. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen hat sich PEA in vorangegangenen Studien, sowohl in vitro (Raskova et al. 1972; Redlich et al. 2012; Guida et al. 2017) wie auch in vivo bei immunkompetenten Mäusen (Redlich et al. 2014) und in der klinischen Anwendung (Kahlich et al. 1979; Plesnik et al. 1977) als protektiv in der Prophylaxe und Therapie von Infektionen erwiesen. In vitro wurde nachgewiesen, dass die Phagozytose von *E. coli* K1 in Makrophagen und Mikroglia junger Mäuse nach 30-minütiger Stimulierung mit PEA (100 und 300 nM) ohne Freisetzung proinflammatorischer Zytokine signifikant erhöht wird (Redlich et al. 2012 und 2014). In-vivo-Experimente mit ähnlichem Aufbau zeigten eine geringere Anfälligkeit junger Mäuse gegen i.c. Infektion mit *E. coli* K1 nach PEA-Prophylaxe. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Überlebenswahrscheinlichkeit in der PEA-Gruppe festgestellt werden (66 % versus 46 % mit  $p = 0,039$ , Log-rank-Test; Redlich et al. 2014). Dass prophylaktisches PEA in neutropenischen Mäusen nicht lebensverlängernd wirkt, wurde meines Wissens in der Literatur noch nicht beschrieben.

Möglicherweise entfaltet PEA seine Wirkung mithilfe von Neutrophilen und ist deswegen hier wirkungslos. Es ist bekannt, dass die Interaktion über die BHS zwischen den im ZNS ansässigen Immunzellen wie Mikroglia, den vaskulären Endothelzellen und den im Blut zirkulierenden Zellen wie Granulozyten zur Bekämpfung der Bakterien wichtig ist (Ribes et al. 2013). Eventuell wirkt PEA über Neutrophile, um einen Effekt auf die Mikrogliazellen im Gehirn auszuüben. Hier bedarf es weiterer Arbeiten zur Pathophysiologie der *E. coli*-Meningitis, insbesondere zur Interaktion sowie Rolle der verschiedenen Zelltypen und zum Wirkmechanismus von PEA. Eine weitere Hypothese ist, dass der immunstimulierende Effekt von PEA hier durch die ausgeprägte Immunschwäche bei Neutropenie mit hoher Mortalität nach Infektion überdeckt wird. Insgesamt stellt die Neutropenie eine erhebliche Schwächung der Immunabwehr der Mäuse bei bakterieller Meningitis da (Mildner et al. 2008; Ribes et al. 2013). Als Folge der Depletion mit dem Antikörper Anti-Ly-6G reagierten Mäuse auf experimentelle, *E. coli*-induzierte Meningitis mit erhöhter Letalität und größeren Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn und in der Milz 30 Stunden nach Infektion (Ribes et al. 2013). In unseren Experimenten führten bereits niedrige Inokula von 650 CFU bzw. 790 CFU *E. coli* zu einer Sterblichkeit von 53 % bzw. 60 % der neutropenischen Mäuse. Dass die Mäuse an den Folgen der Infektion verstarben, legen die in mindestens zwei Organen jeder verstorbenen Maus nachweisbaren *E. coli*-Besiedlungen nahe. Möglicherweise wurden die endogenen PEA-Level als Antwort auf die Neutropenie endogen schon so hoch reguliert, dass die applizierte Dosis an PEA dessen Konzentration im Serum und Geweben nur unbedeutend steigerte. Es gibt Hinweise darauf, dass PEA zur Aufrechterhaltung zellulärer Homöostase bei externen Stressoren wie Entzündung, neuronalem Schaden oder Schmerz vermehrt biosynthetisiert wird (Skaper und Facci 2012; Esposito und Cuzzocrea 2013; Skaper 2017). Allerdings hatte eine höhere Dosis von 1 mg PEA/kg i.p. appliziert ebenfalls keinen lebensverlängernden Effekt. Dass in anderen Studien noch höhere Dosen an PEA verabreicht wurden, lag vermutlich an der oralen Applikationsart. So wurde beispielsweise zur Prophylaxe von oberen Atemwegsinfektionen bei Menschen einmal täglich 30 mg/kg PEA oral eingenommen (Masek et al. 1974) oder *in vitro* zur Prophylaxe bei Mäusen einmal täglich 50 mg/kg oral eingesetzt (Raskova et al. 1972). Es gibt aktuell Hinweise darauf, dass die orale Bioverfügbarkeit von PEA durch den First-pass-Effekt in der Leber und die geringe Wasserlöslichkeit stark verringert ist. Dazu passt, dass in der Leber FAAH, ein PEA hydrolysierendes Enzym, die zweithöchste spezifische Aktivität hat (Vacondio et al. 2015) und dass auch im Magen-Darm-Trakt NAAA und andere Amidasen vorhanden sind, die PEA metabolisieren können (Borrelli et al. 2015). Anstelle einer höheren Dosis wäre in Folgeexperimenten interessant, den Anwendungszeitraum der Prophylaxe zu erweitern. Zwar ist davon auszugehen, dass PEA aufgrund seiner lipophilen

Eigenschaften die BHS überqueren kann (Petrosino und Di Marzo 2017) und den Ort der primären Infektion erreicht. Jedoch gibt es Studien, die eine schnelle Abnahme der Plasmaspiegel von PEA beschreiben. So führte die orale Gabe von 15 mg PEA/kg in Ratten zu einer maximalen Plasmakonzentration nach 15 Minuten, bevor das basale PEA-Level nach zwei Stunden wieder nahezu erreicht wurde (Vacondio et al. 2015).

### **4.3 Schlussfolgerungen**

Prophylaktische PEA-Applikationen verlängerten nach i.c. Infektion mit *E. coli* K1 bei alten, jedoch nicht bei neutropenischen jungen Mäusen das Überleben und verzögerten den Symptombeginn. Dabei bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Annahme, dass PEA die Phagozytoseleistung von Mikroglia und Makrophagen ohne Freisetzung proinflammatorischer Zyto-/Chemokine verbessert. Obwohl der genaue Wirkmechanismus nicht völlig geklärt ist, lassen die Ergebnisse der Arbeit darauf schließen, dass die Phagozytose von Bakterien nach PEA-Behandlung zu einer geringeren entzündlichen Transformation von Mikroglia führt als ohne PEA und dass Mikroglia vermutlich für ihre volle Phagozytoseleistung und den PEA-Effekt einen Cross-talk mit Monozyten und Granulozyten benötigt. Die Abwesenheit von Medikamenteninteraktionen und Nebenwirkungen sowie die exzellente Verträglichkeit sollten klinische Studien ermöglichen, die den Effekt von PEA-Prophylaxe auf das altersassoziierte proinflammatorische Milieu im Gehirn und das erhöhte Infektionsrisiko von geriatrischen Patienten untersuchen. Dies könnte von klinischem Wert sein, um Hochrisikopatienten wie ältere Menschen vor bakteriellen ZNS-Infektionen zu schützen und einen schweren Verlauf einer Meningitis oder Sepsis im Voraus zu verhindern. Wenn prophylaktisches PEA eine Infektion nicht verhindert, könnte es durch eine Verlängerung der Überlebenszeit das therapeutische Fenster, in welchem eine Antibiotikabehandlung den alten Patienten retten kann, erweitern.

## 5 Zusammenfassung

Palmitoylethanolamid, ein endogenes Lipid und Kongener der Anandamide, besitzt antiinflammatorische, antinozizeptive und neuroprotektive Eigenschaften und übt vielfältige Effekte zur Aufrechterhaltung der metabolischen und zellulären Homöostase aus. Hier untersuchten wir die Wirkung einer prophylaktischen Behandlung mit PEA auf die Überlebensdauer, den Krankheitsverlauf und die Immunantwort von alten oder neutropenischen jungen Mäusen nach i.c. Infektion mit *E. coli* ohne antibiotische Behandlung. Es erfolgte die i.p. Behandlung von 19 Monate alten Mäusen (n = 30) in drei Versuchen mit 0,1 mg PEA/kg gelöst in 250 µl einer DMSO/NaCl-Lösung (n = 15) oder mit 250 µl der Trägersubstanz ohne PEA als Kontrolle (n = 15) 12 und 0,5 Stunden vor Infektion mit 800 bzw. 1300 CFU *E. coli* K1. Outcome-Parameter waren die Überlebenswahrscheinlichkeit und -zeit 14 Tage nach Infektion, die Bakterienkonzentrationen in Gehirn, Milz und Blut und die Mikroglia-dichte sowie der Mikroglia-*Activation Score* und der meningeale Inflammationsscore. Um potenzielle Wirkmechanismen von PEA aufzuzeigen und die frühe Phase der Infektion zu betrachten, wurden weitere 19 Monate alte Mäuse (n = 20) prophylaktisch mit 0,1 mg/kg PEA (n = 10) bzw. dem Kontrollmedium (n = 10) behandelt und 24 Stunden nach Infektion getötet. Zusätzlich zu den vorhergenannten Parametern wurden die Bakterientiter in der Leber und die Konzentrationen an Zyto-/Chemokinen im Gehirn und in der Milz bestimmt. Darüber hinaus wurden acht nicht-infizierte Mäuse 24 Stunden nach Gabe der Kontrolllösung getötet, um die Morphologie von Mikroglia in alten gesunden Mäusen zu untersuchen. Weiterhin wurden 8-14 Wochen alte („junge“) neutropenische Mäuse in insgesamt vier Versuchen i.p. mit entweder 0,1 bzw. 1 mg PEA/kg in 250 µl einer DMSO/NaCl-Lösung (n = 44) oder mit 250 µl der Trägersubstanz ohne PEA als Kontrolle (n = 29) vor i.c. Infektion mit *E. coli* behandelt.

Bei PEA-vorbehandelten alten Mäusen war die mediane Überlebenszeit nach Infektion mit 800 CFU *E. coli* K1 pro Maus ohne antibiotische Behandlung um 18 Stunden verlängert, verglichen mit der Kontrollgruppe. Die PEA-Prophylaxe verzögerte auch den Beginn der klinischen Symptome. Dieser Effekt war verbunden mit einer signifikant niedrigeren Bakterienkonzentration in Milz, Leber und Blut in der PEA-Gruppe 24 Stunden nach Infektion. Prophylaktisches PEA senkte auch signifikant die Spiegel der proinflammatorischen Zytokine in der Milz und zeigte eine Tendenz zu reduzierten Chemokin-konzentrationen in der Milz. Im Gehirn fand sich eine signifikant erniedrigte Mikrogliaaktivierung, einhergehend mit einer Tendenz zu erniedrigten Bakterienkonzentrationen und Chemokinleveln im Cerebellum 24 Stunden nach Infektion. Bei einer höheren Infektionsdosis von 1300 CFU pro Maus mit einer Letalität von 100 % konnte kein Effekt von PEA auf die Überlebenszeit mehr festgestellt werden. In nachfolgenden Studien sollte der infektionsprophylaktische Effekt von PEA auf das

Gehirn weiter aufgeklärt und der lebensverlängernde Effekt an einem erweiterten Keimspektrum untersucht werden.

In neutropenischen Mäusen hatte die PEA-Prophylaxe unabhängig von der verwendeten Dosis (0,1 und 1 mg/kg PEA) keinen nachweisbaren Effekt auf die Letalität und Überlebenszeit in dem beobachteten Zeitraum von 14 Tagen nach Infektion. Passend dazu konnten auch keine Unterschiede in den Bakterienkonzentrationen im Gehirn oder der systemischen Zirkulation zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Es ist deshalb anzunehmen, dass PEA Granulozyten und Monozyten für die volle In-vivo-Wirkung benötigt.

Prophylaktisches PEA verlangsamte den Symptombeginn und verlängerte das Überleben von alten Mäusen nach Infektion, indem es vermutlich durch eine verbesserte Phagozytoseleistung von Mikroglia und Makrophagen die Bakterienkonzentration ohne gleichzeitige Freisetzung proinflammatorischer Zyto-/Chemokine senkte sowie zu einer geringeren entzündlichen Transformation von Mikroglia führte und dadurch der infektassoziierten zerstörenden Antwort entgegenwirkte. Diese antiinfektiven, antientzündlichen und homöostatischen Eigenschaften könnten bei klinischer Anwendung dazu beitragen, das therapeutische Fenster zu erweitern, in dem der Einsatz einer Antibiotikatherapie den Meningitis-Patienten retten kann.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801
- Alexopoulos GS, Morimoto SS (2011): The inflammation hypothesis in geriatric depression. *Int J Geriatr Psychiatry* **26**, 1109–1118
- Aloe L, Leon A, Levi-Montalcini R (1993): A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents Actions* **39 Spec No**, C145-147
- Ambrosino P, Soldovieri MV, Russo C, Tagliatalata M (2013): Activation and desensitization of TRPV1 channels in sensory neurons by the PPAR $\alpha$  agonist palmitoylethanolamide. *Br J Pharmacol* **168**, 1430–1444
- Ashton JC, Glass M (2007): The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* **5**, 73–80
- Balvers MGJ, Verhoeckx KCM, Meijerink J, Wortelboer HM, Witkamp RF (2013): Measurement of palmitoylethanolamide and other N-acyl ethanolamines during physiological and pathological conditions. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **12**, 23–33
- Banks WA (2015): The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. *Brain Behav Immun* **44**, 1–8
- Block ML, Zecca L, Hong J-S (2007): Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* **8**, 57–69
- Bluthé RM, Pawlowski M, Suarez S, Parnet P, Pittman Q, Kelley KW, Dantzer R (1994): Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of sickness behavior in mice. *Psychoneuroendocrinology* **19**, 197–207
- Borrelli F, Romano B, Petrosino S, Pagano E, Capasso R, Coppola D, Battista G, Orlando P, Di Marzo V, Izzo AA (2015): Palmitoylethanolamide, a naturally occurring lipid, is an orally effective intestinal anti-inflammatory agent. *Br J Pharmacol* **172**, 142–158
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J (2009): Bad bugs, no drugs: No escape! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**, 1–12
- Bruunsgaard H, Skinhøj P, Qvist J, Pedersen BK (1999): Elderly humans show prolonged in vivo inflammatory activity during pneumococcal infections. *J Infect Dis* **180**, 551–554
- Cabellos C, Verdager R, Olmo M, Fernández-Sabé N, Cisnal M, Ariza J, Gudiol F, Viladrich PF (2009): Community-acquired bacterial meningitis in elderly patients: Experience over 30 years. *Medicine (Baltimore)* **88**, 115–119
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D (1998): Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* **394**, 277–281
- Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N (1993): Cytokines et inflammation. *Rev Prat* **43**, 547–552
- Chiurchiù V, Maccarrone M (2016): Bioactive lipids as modulators of immunity, inflammation and emotions. *Curr Opin Pharmacol* **29**, 54–62

- Coburn AF, Graham CE, Haninger J (1954): The effect of egg yolk in diets on anaphylactic arthritis (passive Arthus phenomenon) in the guinea pig. *J Exp Med* 100, 425–435
- Colton CA (2009): Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 399–418
- Crews FT, Vetreno RP (2016): Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 1543–1557
- Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE (2008): Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83, 64–70
- DGN (2015): Ambulant erworbene bakterielle (eitrig) Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter. S2k-Leitlinie, <https://www.dgn.org/leitlinien/3230-030-089-ambulant-erworbene-bakterielle-eitrig-meningoenzephalitis-im-erwachsenenalter-2015>; Zugriff am 04.01.2019
- Divanian K, Tsanev D, Franke L (1990): Tsitokhimichno opredeliane na monotsiti, limfotsiti, neutrofilni i eozinofilni granulotsiti s pomoshhta na markerni enzimi. *Eksp Med Morfol* 29, 27–31
- Domingo P, Pomar V, Benito N de, Coll P (2013): The spectrum of acute bacterial meningitis in elderly patients. *BMC Infect Dis* 13, 108
- Engelhardt B, Coisne C (2011): Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS* 8, 4
- Ernst JD, Decazes JM, Sande MA (1983): Experimental pneumococcal meningitis: Role of leukocytes in pathogenesis. *Infect Immun* 41, 275–279
- Escudier E, Cordonnier C, Poirier J (1986): Les infections du système nerveux central au cours des hémopathies malignes. *Rev Neurol (Paris)* 142, 116–125
- Esposito E, Cuzzocrea S (2013): Palmitoylethanolamide in homeostatic and traumatic central nervous system injuries. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12, 55–61
- Esposito E, Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Cuzzocrea S (2012): Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PLoS ONE* 7, e41880
- Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR (1993): Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151, 2399–2408
- Flexner S (1907): Experimental cerebro-spinal meningitis in monkeys. *J Exp Med* 9, 142–167
- Fumagalli S, Perego C, Pischitta F, Zanier ER, Simoni M-G de (2015): The ischemic environment drives microglia and macrophage function. *Front Neurol* 6, 81
- Gaschignard J, Levy C, Romain O, Cohen R, Bingen E, Aujard Y, Boileau P (2011): Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. *Pediatr Infect Dis J* 30, 212–217
- Gavazzi G, Krause K-H (2002): Ageing and infection. *Lancet Infect Dis* 2, 659–666
- Genovese T, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Meli R, Bramanti P, Piomelli D, Calignano A, Cuzzocrea S (2008): Effects of palmitoylethanolamide on signaling pathways implicated in the development of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther* 326, 12–23

- Gerber J, Nau R (2010): Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol* **23**, 312–318
- Gerber J, Raivich G, Wellmer A, Noeske C, Kunst T, Werner A, Brück W, Nau R (2001): A mouse model of *Streptococcus pneumoniae* meningitis mimicking several features of human disease. *Acta Neuropathol* **101**, 499–508
- Girodon F, Lombard M, Galan P, Brunet-Lecomte P, Monget AL, Arnaud J, Preziosi P, Hercberg S (1997): Effect of micronutrient supplementation on infection in institutionalized elderly subjects: A controlled trial. *Ann Nutr Metab* **41**, 98–107
- Glimaker M, Johansson B, Grindborg O, Bottai M, Lindquist L, Sjolín J (2015): Adult bacterial meningitis: Earlier treatment and improved outcome following guideline revision promoting prompt lumbar puncture. *Clin Infect Dis* **60**, 1162–1169
- Graeber MB (2010): Changing face of microglia. *Science* **330**, 783–788
- Guida F, Luongo L, Boccella S, Giordano ME, Romano R, Bellini G, Manzo I, Furiano A, Rizzo A, Imperatore R (2017): Palmitoylethanolamide induces microglia changes associated with increased migration and phagocytic activity: Involvement of the CB2 receptor. *Sci Rep* **7**, 375
- Hanisch U-K, Kettenmann H (2007): Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* **10**, 1387–1394
- High KP (2001): Nutritional strategies to boost immunity and prevent infection in elderly individuals. *Clin Infect Dis* **33**, 1892–1900
- Hoffman O, Weber RJ (2009): Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. *Ther Adv Neurol Disord* **2**, 1–7
- Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). *FASEB J* **18**, 412–414
- Impellizzeri D, Cordaro M, Bruschetta G, Siracusa R, Crupi R, Esposito E, Cuzzocrea S (2017): N-Palmitoylethanolamine-Oxazoline as a New Therapeutic Strategy to Control Neuroinflammation: Neuroprotective Effects in Experimental Models of Spinal Cord and Brain Injury. *J Neurotrauma* **34**, 2609–2623
- Iovino F, Orihuela CJ, Moorlag HE, Molema G, Bijlsma JJE (2013): Interactions between blood-borne *Streptococcus pneumoniae* and the blood-brain barrier preceding meningitis. *PLoS ONE* **8**, e68408
- Iqbal J, Dufendach KR, Wellons JC, Kuba MG, Nickols HH, Gómez-Duarte OG, Wynn JL (2016): Lethal neonatal meningoencephalitis caused by multi-drug resistant, highly virulent *Escherichia coli*. *Infect Dis (Lond)* **48**, 461–466
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998): Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* **57**, 1–9
- Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ (2001): Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol* **133**, 1263–1275
- Kaerberlein M, Rabinovitch PS, Martin GM (2015): Healthy aging: The ultimate preventative medicine. *Science* **350**, 1191–1193



- Kahlich R, Klíma J, Cihla F, Franková V, Masek K, Rosický M, Matousek F, Bruthans J (1979): Studies on prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (Impulsin) in acute respiratory infections. Serologically controlled field trials. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 23, 11–24
- Kawai T, Akira S (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373–384
- Keppel Hesselink JM (2013): Evolution in pharmacologic thinking around the natural analgesic palmitoylethanolamide: From nonspecific resistance to PPAR- $\alpha$  agonist and effective nutraceutical. *J Pain Res* 6, 625–634
- Keppel Hesselink JM, Boer T de, Witkamp RF (2013): Palmitoylethanolamide: A Natural Body-Owned Anti-Inflammatory Agent, Effective and Safe against Influenza and Common Cold. *Int J Inflam* 2013, 151028
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010): Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8, e1000412
- Kim KS (2016): Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 7
- Kim KS (2002): Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. *J Infect Dis* 186 Suppl 2, S220-224
- Koedel U, Scheld WM, Pfister H-W (2002): Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2, 721–736
- Kuehl FA, Jacob TA, Ganley OH, Ormond RE, Meisinger MAP (1957): The identification of n-(2-hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5577–5578
- Lambert DM, Vandevoorde S, Diependaele G, Govaerts SJ, Robert AR (2001): Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. *Epilepsia* 42, 321–327
- Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J (2004): Chemokines and chemokine receptors: Their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol* 1, 95–104
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA (2000): Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* 25, 294–297
- LoVerme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005): The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 67, 15–19
- LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G, Meli R, Hohmann A, Calignano A, Piomelli D (2006): Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *J Pharmacol Exp Ther* 319, 1051–1061
- Lucin KM, Wyss-Coray T (2009): Immune activation in brain aging and neurodegeneration: Too much or too little? *Neuron* 64, 110–122
- Lukes SA, Posner JB, Nielsen S, Armstrong D (1984): Bacterial infections of the CNS in neutropenic patients. *Neurology* 34, 269–275

- Luongo L, Guida F, Boccella S, Bellini G, Gatta L, Rossi F, Novellis V de, Maione S (2013): Palmitoylethanolamide reduces formalin-induced neuropathic-like behaviour through spinal glial/microglial phenotypical changes in mice. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12, 45–54
- Malzahn D, Schillert A, Müller M, Bickeböller H (2010): The longitudinal nonparametric test as a new tool to explore gene-gene and gene-time effects in cohorts. *Genet Epidemiol* 34, 469–478
- Marchalant Y, Cerbai F, Brothers HM, Wenk GL (2008): Cannabinoid receptor stimulation is anti-inflammatory and improves memory in old rats. *Neurobiol Aging* 29, 1894–1901
- Marchalant Y, Brothers HM, Norman GJ, Karelina K, DeVries AC, Wenk GL (2009): Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis. *Neurobiol Dis* 34, 300–307
- Di Marzo V (2008): Targeting the endocannabinoid system: To enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7, 438–455
- Di Marzo V, Petrosino S (2007): Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 18, 129–140
- Masek K, Perlík F, Klíma J, Kahlich R (1974): Prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (impulsin) in acute respiratory tract infections. *Eur J Clin Pharmacol* 7, 415–419
- McCusker RH, Kelley KW (2013): Immune-neural connections: How the immune system's response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol* 216, 84–98
- Mildner A, Djukic M, Garbe D, Wellmer A, Kuziel WA, Mack M, Nau R, Prinz M (2008): Ly-6G+CCR2<sup>+</sup> myeloid cells rather than Ly-6ChighCCR2<sup>+</sup> monocytes are required for the control of bacterial infection in the central nervous system. *J Immunol* 181, 2713–2722
- Miller LG, Choi C (1997): Meningitis in older patients: How to diagnose and treat a deadly infection. *Geriatrics* 52, 43-44, 47-50, 55
- Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D (2011): Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev* 24, 557–591
- Muccioli GG, Stella N (2008): Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide. *Neuropharmacology* 54, 16–22
- Nau R, Brück W (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: Mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25, 38–45
- Nau R, Eiffert H (2005): Minimizing the release of proinflammatory and toxic bacterial products within the host: A promising approach to improve outcome in life-threatening infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44, 1–16
- Nau R, Soto A, Brück W (1999): Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 265–274
- Nau R, Gerber J, Bunkowski S, Brück W (2004): Axonal injury, a neglected cause of CNS damage in bacterial meningitis. *Neurology* 62, 509–511
- Nau R, Ribes S, Djukic M, Eiffert H (2014): Strategies to increase the activity of microglia as efficient protectors of the brain against infections. *Front Cell Neurosci* 8, 138

- Nau R, Djukic M, Spreer A, Ribes S, Eiffert H (2015): Bacterial meningitis: An update of new treatment options. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13, 1401–1423
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318
- Ochoa-Cortes F, Turco F, Linan-Rico A, Soghomonyan S, Whitaker E, Wehner S, Cuomo R, Christofi FL (2016): Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* 22, 433–449
- Park S-E, Dantzer R, Kelley KW, McCusker RH (2011): Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice. *J Neuroinflammation* 8, 12
- Perry VH, Cunningham C, Holmes C (2007): Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7, 161–167
- Pertwee RG (2007): GPR55: A new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol* 152, 984–986
- Petrosino S, Di Marzo V (2017): The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations. *Br J Pharmacol* 174, 1349–1365
- Petrosino S, Iuvone T, Di Marzo V (2010): N-palmitoyl-ethanolamine: Biochemistry and new therapeutic opportunities. *Biochimie* 92, 724–727
- Plesník V, Havrlantová M, Jancová J, Januska J, Macková O (1977): Impulsin v prevenci akutních respiračních onemocnění školáků. *Cesk Pediatr* 32, 365–369
- Pomar V, Benito N, López-Contreras J, Coll P, Gurguí M, Domingo P (2013): Spontaneous gram-negative bacillary meningitis in adult patients: Characteristics and outcome. *BMC Infect Dis* 13, 451
- Rasková H, Masek K, Linèt O (1972): Non-specific resistance induced by palmitoylethanolamide. *Toxicon* 10, 485–490
- 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* 244, 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* 11, 108
- Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch U-K, Hammerschmidt S (2009): Toll-like receptor prestimulation increases phagocytosis of *Escherichia coli* DH5alpha and *Escherichia coli* K1 strains by murine microglial cells. *Infect Immun* 77, 557–564
- Ribes S, Regen T, Meister T, Tauber SC, Schütze S, Mildner A, Mack M, Hanisch U-K, Nau R (2013): Resistance of the brain to *Escherichia coli* K1 infection depends on MyD88 signaling and the contribution of neutrophils and monocytes. *Infect Immun* 81, 1810–1819
- Ribes S, Meister T, Ott M, Redlich S, Janova H, Hanisch U-K, Nessler S, Nau R (2014): Intraperitoneal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotides protects neutropenic mice against intracerebral *Escherichia coli* K1 infection. *J Neuroinflammation* 11, 14

- Schmid HH, Schmid PC, Natarajan V (1990): N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog Lipid Res* 29, 1–43
- Schütze S, Ribes S, Kaufmann A, Manig A, Scheffel J, Redlich S, Bunkowski S, Hanisch U-K, 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* 5, 12573–12592
- Skaper SD (2017): Impact of Inflammation on the Blood-Neural Barrier and Blood-Nerve Interface: From Review to Therapeutic Preview. *Int Rev Neurobiol* 137, 29–45
- Skaper SD, Facci L (2012): Mast cell-glia axis in neuroinflammation and therapeutic potential of the anandamide congener palmitoylethanolamide. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 367, 3312–3325
- Spanaus KS, Nadal D, Pfister HW, Seebach J, Widmer U, Frei K, Gloor S, Fontana A (1997): C-X-C and C-C chemokines are expressed in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 158, 1956–1964
- Sparkman NL, Johnson RW (2008): Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation* 15, 323–330
- Stella N, Piomelli D (2001): Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 425, 189–196
- Straus DS, Glass CK (2007): Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: New insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 28, 551–558
- Streit WJ, Miller KR, Lopes KO, Njie E (2008): Microglial degeneration in the aging brain--bad news for neurons? *Front Biosci* 13, 3423–3438
- Swartz MN (1984): Bacterial meningitis: More involved than just the meninges. *N Engl J Med* 311, 912–914
- Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K (1996): Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect Immun* 64, 769–774
- Taziarova M, Holeckova K, Lesnakova A, Sladeckova V, Bartkovjak M, Seckova S, Bukovinova P, Hvizdak F, Svabova V, Findova L (2007): Gram-negative bacillary community acquired meningitis is not a rare entity in last two decades. *Neuro Endocrinol Lett* 28 Suppl 3, 18–19
- Vacondio F, Bassi M, Silva C, Castelli R, Carmi C, Scalvini L, Lodola A, Vivo V, Flammini L, Barocelli E (2015): Amino Acid Derivatives as Palmitoylethanolamide Prodrugs: Synthesis, In Vitro Metabolism and In Vivo Plasma Profile in Rats. *PLoS ONE* 10, e0128699
- van de Beek D, Gans J de, Tunkel AR, Wijdsicks EFM (2006): Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 354, 44–53
- van Veen KEB, Brouwer MC, van der Ende A, van de Beek D (2017): Bacterial Meningitis in Patients using Immunosuppressive Medication: A Population-based Prospective Nationwide Study. *J Neuroimmune Pharmacol* 12, 213–218
- von Bernhardi R, Eugénin-von Bernhardi L, Eugénin J (2015): Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 7, 124

- Wang J, Asensio VC, Campbell IL (2002): Cytokines and chemokines as mediators of protection and injury in the central nervous system assessed in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 265, 23–48
- Wang J-X, Bair AM, King SL, Shnyder R, Huang Y-F, Shieh C-C, Soberman RJ, Fuhlbrigge RC, Nigrovic PA (2012): Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a  $\beta$ 2-integrin-dependent mechanism. *Blood* 120, 1489–1498
- Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B (2012): Vaccines for the elderly. *Clin Microbiol Infect* 18 Suppl 5, 100–108
- Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, Gans J de (2006): Community-acquired bacterial meningitis in older people. *J Am Geriatr Soc* 54, 1500–1507
- Yoshikawa TT (2000): Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases. *Clin Infect Dis* 30, 931–933
- Ysebaert DK, Greef KE de, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, Broe ME de (2000): Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 15, 1562–1574
- Zanettini C, Panlilio LV, Alicki M, Goldberg SR, Haller J, Yasar S (2011): Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci* 5, 57

## 7 Anhang

### 7.1 Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation

Ribes S, Nessler S, **Heide EC**, Malzahn D, Perske C, Brück W, Nau R (2017): The Early Adaptive Immune Response in the Pathophysiological Process of Pneumococcal Meningitis. *J Infect Dis* 215, 150–8

**Heide EC**, Bindila L, Post JM, Malzahn D, Lutz B, Seele J, Nau R, Ribes S (2018): Prophylactic Palmitoylethanolamide Prolongs Survival and Decreases Detrimental Inflammation in Aged Mice With Bacterial Meningitis. *Front Immunol* 9, 2671

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. rer. nat. Sandra Ribes und meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. med. Roland Nau, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit stets überaus freundlich und engagiert mit kompetenten Ratschlägen unterstützt haben. Ich danke ihnen für ihre ansteckende Begeisterung für das Forschungsgebiet, und die anregenden wissenschaftlichen Gespräche darüber.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Brück danke ich darüber hinaus für die freundliche Aufnahme in der Abteilung Neuropathologie im Zentrum Pathologie des Universitätsklinikums Göttingen und für die Ermöglichung dieser Dissertation in seiner Abteilung.

Mein Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Dörthe Malzahn, die mich stets sehr hilfsbereit und kompetent statistisch beraten und unterstützt hat.

Auch geht mein Dank an Frau Stefanie Bunkowski für ihre exzellente technische und praktische Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Geschwistern für ihre sehr hilfreichen korrigierenden Anmerkungen zum Manuskript.