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

Vitamin D - Immunmodulator der bakteriellen Meningitis

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

vorgelegt von
Marie Luise Onken
aus
Würzburg

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referentin:	Prof. Dr. med. M. Djukic
Koreferent:	Prof. Dr. med. Martin Weber
Drittreferent:	Prof. Dr. med. Martin Oppermann
Promotor- Vertretung:	Prof. Dr. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 01.10.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Vitamin D- Immunmodulator der bakteriellen Meningitis“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 01.10.2020

Inhaltsverzeichnis

1.1.1 Definition ... 3
1.1.2 Epidemiologie ... 3
1.1.2.1 Meningitis der Neugeborenen ... 4
1.1.2.2 Meningitis im Erwachsenenalter ... 4
1.1.3 Pathophysiologie und Pathogenese bakterieller Infektionen des zentralen Nervensystems am Beispiel von *Escherichia coli* ... 5
1.1.3.1 *Escherichia coli* ... 5
1.1.3.2 Pathophysiologie und Pathogenese am Beispiel von *Escherichia coli*-Meningitis ... 6
1.1.3.3 Interaktion von Mikroglia und Toll- like receptor am Beispiel von *Escherichia coli* ... 8

1.2 Vitamin D ... 10
1.2.1 Synthese ... 10
1.2.2 Vitamin-D-Mangel: Definition, Ätiologie und Epidemiologie ... 11
1.2.3 Bedeutung des Vitamin D im zentralen Nervensystem ... 12
1.2.4 Klinische Daten zum Vitamin-D-Mangel ... 13

1.3 Zielsetzung der Arbeit ... 16

2 Material und Methoden ... 17

2.1 Materialien ... 17
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien ... 17
2.1.2 Geräte und Software ... 18
2.1.3 Verbrauchsmaterial und spezielles Material ... 19
2.1.4 Herstellung von Lösungen ... 20

2.2 In-vitro-Versuche ... 21
2.2.1 Messung der Vitamin-D-Konzentration im Blut der Versuchstiere ... 22
2.2.2 Gewinnung und Anzucht der Mikrogliazellen ... 25
2.2.3 Gewinnung von Serum ... 26
2.2.4 Ernte der Mikrogliazellen ... 26
2.2.5 Stimulation der Zellen ... 27
2.2.6 Phagozytose ... 27

2.2.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 29
2.2.8 Messung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung 30
2.2.9 Messung der Überlebensfähigkeit der Mikroglia 31
2.2.10 Homogenisierung des Kleinhirns und der Milz 32

2.3 Statistik 33

3 Ergebnisse 34

3.1 In-vitro-Versuche 34
3.1.1 Phagozytose stimulierter Mikrogliazellen 34
3.1.2 Messung der Zytokinausschüttung 37
3.1.3 Stickstoffmonoxid-Radikal-Freisetzung der Mikroglia 41
3.1.4 Lebendzellzahl der Mikroglia 43

4 Diskussion 45

5 Zusammenfassung 50

6 Veröffentlichung 51

7 Literaturverzeichnis 52

8 Anhang 60

8.1 Abbildungsverzeichnis 60

8.2 Tabellenverzeichnis 60

1. Einleitung

1.1 Die bakterielle Meningitis

1.1.1 Definition

Die bakterielle Meningitis ist eine Entzündung der Meningen, vor allem der Arachnoidea und der Pia mater, aufgrund der Einwanderung von Bakterien in den Subarachnoidalraum. Greift die Entzündungsreaktion auf das Gehirnparenchym über, spricht man von einer Meningoenzephalitis, bei einer Mitbeteiligung der Nervenwasserkammern von einer Ventrikulitis. Eine Infektion des zentralen Nervensystems kann außerdem das Rückenmark betreffen (Hofmann und Weber 2009). Eine bakterielle Meningitis ist mit einer hohen Mortalität und Morbidität verbunden (Nau und Brück 2002). Die Letalität ist vom Erregertyp abhängig und beträgt 10-20 %, bei Neugeborenen bis zu 50 % (Masuhr und Neuman 2013). Daher stellt die bakterielle Meningitis einen medizinischen Notfall dar, der schnellstmöglich erkannt und behandelt werden muss.

1.1.2 Epidemiologie

Laut WHO (Stand Februar 2013) sterben jährlich weltweit 170000 Menschen, vorwiegend Kinder und Jugendliche, während oder an den Folgen einer bakteriellen Meningitis. Weltweit erkranken jährlich etwa 1,2 Millionen Menschen an einer bakteriellen Meningitis (Nau et al. 2012). Besonders in Entwicklungsländern wie Afrika tritt diese Erkrankung aufgrund der schlechten hygienischen Bedingungen auf. In Europa sind vor allem Neugeborene und Säuglinge betroffen. Seit Einführung des Impfstoffes gegen den Kapseltyp b *Haemophilus influenzae (H. influenzae)* ist die Zahl der Neuerkrankungen zurückgegangen und verliert zunehmend an Bedeutung (WHO 2013). In Deutschland wurden im Jahr 2015 549 Fälle einer invasiven Infektion durch *H. influenzae* registriert. Von den vornehmlich über 59-jährigen Patienten erkrankten 1 % an einer Meningitis (Robert Koch-Institut 2016). Zu den häufigsten Erregern einer bakteriellen Meningitis zählen *Streptococcus pneumoniae (S. pneumoniae), H. influenzae, Neisseria meningitidis (N. meningitidis), Escherichia coli (E. coli), Listeria monocytogenes (L. monocytogenes)* und *Staphylococcus aureus (S. aureus)* (Van de Beeck 2004). In Abhängigkeit vom Lebensalter der Erkrankten variiert die Häufigkeit der verschiedenen Erreger. Streptokokken der Gruppe B, *L. monocytogenes* und *E. coli* treten häufig bei Säuglingen auf. Bei Kleinkindern überwiegen Meningitiden,

verursacht durch *H. influenzae, N. meningitidis* und *S. pneumoniae*. Auch bei Jugendlichen tritt die Meningokokken-Meningitis ebenfalls auf. Der häufigste Erreger beim erwachsenen Menschen ist *S. pneumoniae*. Insbesondere Ältere, Alkoholkranke und Splenektomierte erkranken häufiger an einer durch Pneumokokken verursachten Meningitis (Nau und Brück 2002). Ein hohes Alter und Immunsuppression sind Risikofaktoren für eine Infektion mit atypischen und multiresisteten Erregern (Herold 2011). Laut Van de Beeck und Kollegen hat sich die Epidemiologie der bakteriellen Meningitis aufgrund neuer Impfstoffe in den letzten Jahren zunehmend verändert (Van de Beeck et al. 2004). So ist eine Infektion durch *H. influencae* Typ B in westlichen Ländern nahezu ausgelöscht worden. Konjugatimpstoffe gegen *Streptococcus pneumoniae* versprechen ebenfalls, die Pneumokokkenmeningitis einzudämmen. Diese decken bislang 23 der 90 pathogenen Pneumokokkenserotypen ab. Laut der Deutschen Gesellschaft für Neurologie versterben jährlich 10-15 % der Patienten an einer Pneumokokken- Meningitis (Janssens et al. 2010).

1.1.2.1 Meningitis der Neugeborenen

Wie bereits erwähnt, ist *E. coli*-K1 neben Listerien, Enterokokken und *Staphylococcus aureus* ein häufiger Erreger der frühen neonatalen Meningitis und Sepsis. Eine Hirnhautentzündung kann zu akuten Komplikationen wie Hirnblutungen, Hydrozephalus und Krampfanfällen führen (Belhohradsky und Weiß 2007). Die hohe Letalität sowie Langzeitschäden (Wachstumsstörungen, Entwicklungsverzögerung, Hörverlust, körperliche Behinderung und neurologische Spätschäden) verdeutlichen die Bedrohlichkeit einer Infektion. Der Verlauf einer frühen neonatalen Sepsis ist oft fulminant, die Letalität liegt bei 10-25 %, und die Gefahr, eine bakterielle Meningitis zu entwickeln, ist hoch (Belhohradsky und Weiß 2007). Symptome einer neonatalen Meningitis sind Störungen der Atmung und des Muskeltonus, der Temperaturregulation, sowie Krampfanfälle, schrilles Schreien und gespannte Fontanellen. Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie empfiehlt bei Neugeborenen eine Kombinationstherapie aus Cefotaxim, Ampicillin oder Piperacillin. Jenseits der ersten drei Lebensmonate sollte die Therapie mit einem Cephalosporin der 3. Generation (Cefotaxim oder Ceftriaxon) erfolgen (DGN 2015).

1.1.2.2 Meningitis im Erwachsenenalter

Das Keimspektrum bakterieller Infektionen bei älteren und jüngeren Patienten unterscheidet sich bezüglich der Häufigkeit spezieller Erreger sowie der Vielfalt der Erreger

(Gavazzi und Krause 2002). So sind zum Beispiel bei der ambulant erworbenen Pneumonie nicht nur die klassischen Erreger wie *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) anzutreffen, sondern vermehrt *Hämophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Staphylococcus aureus*, *Legionella spezies*, *Chlamydia pneumoniae* und andere gramnegative Erreger. *Staphylococcus aureus und E. coli* sind mit ungefähr 25 % die häufigsten Erreger einer Sepsis im Erwachsenenalter (Marrie 2000). Als Komplikation einer Sepsis kann sich aufgrund der hohen Erregerkonzentration im Blut eine bakterielle Meningitis entwickeln. Die Meningitis durch *E. coli* tritt vor allem bei älteren, immunsupprimierten oder polytraumatisierten Patienten oder im Rahmen neurochirurgischer Operationen auf (Mofredj et al. 2000). Schwere ZNS-Infektionen führen zu einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinzustandes und können Folgeerkrankungen auslösen. Daher ist die Überlebensrate bei älteren und immungeschwächten Personen deutlich geringer als bei Jüngeren (Cabellos et al. 2009). Symptome einer bakteriellen Meningitis bei Erwachsenen sind Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, hohes Fieber, Photophobie, bei Beteiligung des Enzephalons auch Somnolenz und epileptische Anfälle (Masuhr und Neumann 2013). Die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie empfehlen bei außerhalb des Krankenhauses erworbener Meningitis vor der Therapie mit Antibiotika die adjuvante Gabe von 10 mg Dexamethason. Ist der Erreger zunächst noch unbekannt, sollte eine empirische Therapie mit einem Cephalosporin der 3. Generation und Ampicillin vorgenommen werden. Bei nosokomialen Infekten wird die Gabe von Vancomycin in Kombination mit Meropenem oder Ceftazidim und Metronidazol empfohlen. Des Weiteren kann die Applikation von Immunglobulinen bei schweren Verläufen erwogen werden (DGN 2015).

1.1.3 Pathophysiologie und Pathogenese bakterieller Infektionen des zentralen Nervensystems am Beispiel von *Escherichia coli*

1.1.3.1 *Escherichia coli*

E. coli ist ein gramnegatives Bakterium, welches sich lokal in Harntrakt, Weichteilgewebe, Abdomen und Lunge ansiedelt und sich dann systemisch im Körper ausbreiten kann. Das Risiko an der durch *E. coli K* 1 verursachten Sepsis zu erkranken ist trotz der Fortschritte in der Therapie hoch. Dies betrifft vor allem an Meningitis erkrankte Neurgeborene, Kinder, Immunsupprimierte und ältere Patienten (Russo und Johnson 2003). *E. coli K1* besitzt eine Kapsel, welche das Bakterium besonders pathogen macht, indem es die Phagozytose

erschwert, die Invasivität erhöht und ihm ermöglicht, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu passieren. Versuche an Mikroglia-Zellkulturen konnten zeigen, dass die Phagozytose von *E. coli* K1 durch Toll-like-Rezeptoren (TLR)- Stimulation erhöht wird (Ribes et al. 2009).

1.1.3.2 Pathophysiologie und Pathogenese am Beispiel von *Escherichia coli*-Meningitis

Bakterielle Erreger können auf verschiedenen Wegen in das ZNS gelangen, beispielsweise hämatogen aufgrund einer Sepsis, direkt bei offenen traumatischen Schädelverletzungen, nach chirurgischen Eingriffen oder per continuitatem im Rahmen einer Sinusitis, Otitis oder Mastoiditis (Hufschmidt et al. 2009). Um eine Entzündung der Hirnhäute auszulösen, muss der Erreger in den mit Liquor gefüllten Subarachnoidalraum gelangen. Die Blut-Hirn-Schranke stellt dabei eine natürliche Barriere zwischen dem ZNS und dem Blutkreislauf dar. Sie wird aus den Endothelzellen der Blutgefäße, den bindegewebigen Perizyten sowie den Astrozyten des Gehirns gebildet und schützt das ZNS vor dem Eintreten von Krankheitserregern. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke kann auf unterschiedliche Wege geschehen; sie variiert in Abhängigkeit vom verursachenden Erreger. Bakterien wie *E. coli* K1 gelingt die Überwindung der BHS, indem sie die Gefäßendothelzellen des Gehirns mittels Neuanordnung des Aktinzytoskeletts durchwandern (Kim 2003). Um in den Liquorraum zu gelangen, bindet sich *E. coli* mit spezifischen bakteriellen Proteinen wie etwa dem *outer membrane protein A* (OmpA) an endotheliale Rezeptoren der Gefäßwände und gelangt somit in das ZNS, wo sich die Bakterien im Subarachnoidalraum (SAR) exponentiell vermehren (Kim 2000). Ursächlich hierfür ist der ungenügende lymphatische Abfluss (Johnston et al. 2004) und das verhinderte Eintreten von immunkompetenten Zellen durch die BHS und BLS. Der SAR enthält außerdem eine Reihe von antiinflammatorischen Immunfaktoren, welche die Immunabwehr unterdrücken (Niederkorn 2006). Die den SAR umgebenden Hirnhäute, das perivaskuläre Gewebe sowie der Plexus choroideus verfügen über residente Makrophagen und dendritische Zellen (Guillemin und Brew 2004). Bei einer hohen Konzentration des Erregers kommt es somit zu einer Immunantwort (Koedel et al. 2010). Das unspezifische Immunsystem wird dabei von den durch Autolyse freigesetzten Bakterienbestandteilen wie Lipopolysacchariden (LPS) als Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, Lipoteichon- und Teichonsäuren als Zellwandbestandteil grampositiver Bakterien sowie Peptidoglykane, Pneumolysin und bakterieller DNA aktiviert (Koedel et al. 2010). Die residenten immunkompetenten Zellen des SAR erkennen die bakteriellen

Bestandteile anhand von TLR. Diese gehören zu der Gruppe der *pathogen recognition receptors* (PRR) und reagieren auf spezifische *pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMP), wodurch das Immunsystem aktiviert wird (Akira et al. 2006). Der Mechanismus führt über die Translokation des Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor kappa B (NFkB) zur Aktivierung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und schließlich zur Transkription von Genen für inflammatorische Zytokine. Dabei spielt das intrazelluläre Adaptermolekül *myeloid-differentiation-factor-88* (MyD88) für den Signalweg der TLR eine wichtige Rolle. TLR-4 erkennt beispielsweise LPS, welche in der Zellwand von gram-negativen Bakterien, unter anderem auch bei *E. coli,* vorkommt (Akira et al. 2006). Illustriert wird dieser Mechanismus in Abbildung 1 (Seite 7).

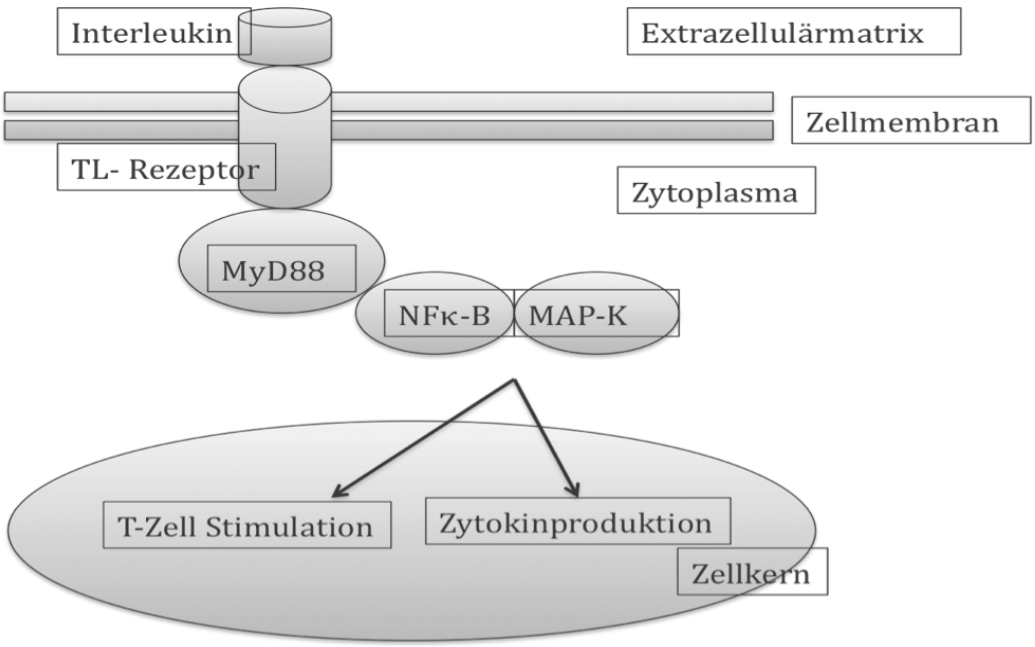

Abbildung 1 TLR-Signaltransduktion in der immunkompetenten Zelle des Subarachnoidalraums
Das intrazelluläre Adaptermolekül *myeloid-differentiation-factor-88* (MyD88) erkennt den TL-Rezeptor und löst die weitere Kaskade aus. Durch Translokation des Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor kappa B (NFkB) kommt es zur Aktivierung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Diese führt zur T-Zell Stimulation und Zytokinproduktion innerhalb des Zellkerns (eigene Abbildung).

Ein wichtiger Bestandteil zur Bekämpfung bakterieller Erreger stellt die Migration der Leukozyten als Bestandteil der adaptiven Immunantwort dar. Dieser Prozess wird anfangs durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch meningeale Makrophagen, Ependymzellen und chorioidale Plexusepithelzellen und später durch Mikrogliazellen

und die eingewanderten Leukozyten selbst initiiert (Nau und Brück 2002). Nachfolgend kommt es zur Freisetzung weiterer entzündungsaktiver Substanzen wie Proteasen und freier Radikale (Engelhardt und Cosine 2011). Dieser Prozess wird anfangs durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch residente immunkompetente Zellen wie Makrophagen und später durch die eingewanderten Leukozyten selbst initiiert (Nau und Brück 2002). Die Leukozytenmigration verläuft in folgenden Schritten: Anbindung mithilfe von Selektinen, Triggerung der Leukozyten durch proinflammatorische Zytokine, Chemokine, Teilen des Komplementsystems sowie bakterielle Zellwandbestandteile, Adhäsion durch Integrine und schließlich Emigration in den SAR (Scheld et al. 2002). Aktivierte Leukozyten lösen die Freisetzung von reaktiven Oxidantien wie Sauerstoffradikalen (ROS), Stickstoffradikalen (*reactive nitrogen intermediates*- RNI]) und proteolytischen Enzymen wie der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) aus (Gerber und Nau 2010). Diese wiederum verstärken die Inflammation, zerstören die Barrierefunktion des Gehirns und induzieren somit vermehrten Zelluntergang. Die erhöhte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α, IL-1 und IL-6 verstärken wiederum die Durchlässigkeit der BHS. Am Ende führen diese Reaktionen zu den schweren klinischen Folgen einer bakteriellen Meningitis mit lokalen Vasospasmen und Vaskulitis gefolgt von Minderperfusion des Gehirns, Hirnödem und schließlich schwerwiegender Schädigung von Hirngewebe (Ramesh et al. 2013). Damit zeigt sich, dass die Aktivierung des Immunsystems nicht nur essentiell für die Bekämpfung des Erregers ist, sondern auch die ausgelöste Immunreaktion des eingewanderten Erregers dazu beiträgt, sekundär Gehirngewebe zu schädigen. Werden diese pathophysiologischen Vorgänge nicht rechtzeitig unterbrochen, können die gesetzten irreversiblen neuronalen Schäden zum Tode führen (Koedel et al. 2010).

1.1.3.3 Interaktion von Mikroglia und Toll- like receptor am Beispiel von *Escherichia coli*

Mikroglia sind mesodermalen Ursprungs und gehören zu der Gruppe der Gliazellen. Man findet sie in Gehirn und Rückenmark. Mikroglia halten die Hämostase im ZNS aufrecht, besitzen regenerierende Aufgaben und gehören zum angeborenen unspezifischen Immunsystem (Aloisi 2001). Sie stellen die Phagozyten des ZNS dar und erfüllen die Abwehrfunktion, wenn Bakterien bei einer bakteriellen Infektion in das Gehirn eindringen (Hanisch und Kettenmann 2007). Säugetiere besitzen bei der Immunabwehr bakterieller Infektionen zwei Aktivierungswege: das angeborene (Phagozytose und Antigenpräsentation) und das erworbene (T- und B- Lymphozytenfunktion) Immunsystem (Herold

2011). Treten Bakterien im Blut oder Liquor auf, reagiert das Gehirn mit einer gut organisierten Immunreaktion (Aravalli et al. 2007). Die Mikroglia exprimieren hierbei eine Vielzahl an TLRs (Bsibsi et al. 2002), welche PAMPs erkennen und die lokale Immunantwort einleiten (Simard und Rivest 2005). Zirkulierende Immunzellen werden vom Ort der Infektion zusammen mit perivaskulären und meningealen Makrophagen angezogen (Hanisch und Kettenmann 2007). Durch die Rezeptor-Ligand-Interaktion verändern sich die ruhenden und verzweigten Zellen zu aktivierten, runderen Mikrogliazellen (Hanisch et al. 2007). Neben der Morphologie ändert sich der Immunphänotyp. Zu den Aufgaben unter inflammatorischen Bedingungen zählen sowohl die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Sauerstoffradikalen (ROS) als auch eine Erhöhung der Phagozytose- Aktivität (Häusler et al. 2002). Einerseits schützen Mikrogliazellen das Gehirn und das Rückenmark vor Bakterien, andererseits setzen sie NO und TNF-α frei (Ebert et al. 2005), wodurch wiederum Neurone geschädigt werden können (Iliev et al. 2004). Durch die Stimulation mit Interferon-γ (IFN-γ) geht die Produktion von neuroprotektiven Faktoren durch Mikroglia zurück und führt zu einer vermehrten Freisetzung zelltoxischer Substanzen (Moran et al. 2007). Dieser Vorgang wird den Untersuchungen in dieser Arbeit Zugrunde gelegt. TLR nehmen eine zentrale Rolle im Immunsystem ein. Sie werden von Makrophagen und dendritischen Zellen als Teil der angeborenen, von B-Zellen als Teil der adaptiven Immunabwehr exprimiert und während einer Inflammation im ZNS verstärkt gebildet. So konnte eine verstärkte Expression der mRNA von TLR-2, TLR-4 und TLR-7 in Gehirnen junger C57BL/6-Mäuse nach i.c. Infektion mit *E. coli*-K1 gezeigt werden (Böttcher et al. 2003). Im menschlichen Körper werden 11 verschiedene, in Mäusen hingegen bis zu 13 TLR exprimiert (Kawai und Akira 2006). Die unterschiedlichen Typen von TLR werden an Zellbestandteilen exprimiert und über bestimmte bakterielle Oberflächenmerkmale stimuliert. Dies führt über diverse Signaltransduktionswege zu entsprechenden Immun-antworten. Ruhende Mikroglia sind nicht-phagozytierende Zellen, aktivierte Mikroglia sind phagozytierende Zellen. Stimuliert man Mikrogliazellen mit Agonisten der TLR-1/2, -4 und -9, so erhöht sich die Phagozytoserate von Bakterien deutlich (Ribes et al. 2010). Die Stimulation von Mikrogliazellen mit dem TLR-3-Agonisten *polyinosinic-polycytidylic-acid* (Poly I:C) führt zu einer vermehrten Phagozytoserate und gesteigertem intrazellulärem Abtöten von *E. coli* sowie zur vermehrten Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen und Stickstoffmonoxid (NO) (Ribes et al. 2010). Ebenso führt die Aktivierung von Mikrogliazellen durch TLR-1/2-, -4- und -9-Agonisten zur Ausschüttung von NO und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) (Ebert et al. 2005). Im Experiment mit murinen Neuronen-Mikroglia-

Kokulturen zeigt sich allerdings auch, dass es unter Stimulation durch TLR-1-, -2- und -4-Agonisten zur Abnahme der Lebensfähigkeit der Neurone kommt, gemessen an der reduzierten Zahl von intakten neuronalen Ausläufern und Vernetzungen (Schütze et al. 2012). TLR-2 und -4 befinden sich auf der Zelloberfläche und erkennen Bestandteile aus bakteriellen Zellwänden. TLR-9 wird in intrazellulären Vesikeln, Endosomen und Lysosomen exprimiert (Muzio und Mantovani 2000). Tripalmitoyl-Cystein (Pam_3CSK_4) ist ein synthetisch hergestelltes Analogon für Bestandteile von Zellwänden grampositiver Bakterien und stimuliert TLR-1/2. Lipopolysaccharide (LPS), welche Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien sind, können beispielsweise über die Aktivierung von TLR-4 und die nachfolgende Immunantwort einen septischen Schock verursachen (Ribes et al. 2010a). *Oligodesoxynucleotides containing unmethylated cytosine guanosin motifs* (ODN CpG) ist ein synthetisches Analogon für bakterielle CG-Sequenzen, diese gehören zur bakteriellen DNA gramnegativer sowie grampositiver Bakterien. Durch Bindung an den TLR-9 und kann zum Beispiel ursächlich für einen septischen Schock sowie zerebrale Entzündung sein (Tauber et al. 2009). Stimulation des TLR-3 führt zur Aktivierung des *TIR domain containing adaptor inducing interferon γ* (TRIF)-Signalwegs (Yamamoto et al. 2002a). Die Aktivierung des Signalmoleküls MyD88 ist wichtig für eine effektive Immunantwort während einer bakteriellen Meningitis (Koedel et al. 2004) und führt zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPKs). Infolge der Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren kommt es zu einer Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen. Der MyD88 unabhängige Signalweg führt ebenfalls über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und Interferon Typ 1 (Yamamoto et al. 2002b). Es wird deutlich, dass aktive Mikroglia einerseits durch vielfältige Mechanismen das Gehirn sowohl schützen als auch schädigen können und somit verschiedene Angriffspunkte zur Intervention bieten. In den genannten experimentellen Untersuchungen konnte durch gezielte TLR-Stimulation die Bedeutung der TLR und die Auswirkung auf die Immunantwort gezeigt werden.

1.2 Vitamin D

1.2.1 Synthese

Physiologischerweise nehmen wir etwas Vitamin D über die Nahrung auf (tierisch: Vitamin D_3 [Cholekalziferol] oder pflanzlich: Vitamin D_2 [Ergokalziferol]). Viel entscheidender ist die

Bildung von Vitamin D in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol unter Einfluss von UV-Licht. Dieses wird in der Leber zu inaktivem 25-Hydroxyvitamin D_3 (Calcifediol) umgewandelt und wird aufgrund der langen Halbwertszeit und seiner hydrophoben Eigenschaft zur Bestimmung des Vitamin-D-Status bei Patienten benutzt werden (Holick 2007). Anschließend erfolgt die Umwandlung in der Niere durch das Enzym 1α-Hydroxylase zum aktiven Metaboliten 1α-25-Dihydroxyvitamin D_3 (Kalzitriol). Aufgrund des Synthese-mechanismus ist Vitamin D als Prohormon anzusehen, dessen Produktion unter dem Einfluss von Phosphat, Kalzium und Parathormon (PTH) steht. Bei Hypokalziämie wird die PTH-Produktion stimuliert, was zu einer gesteigerten Phosphatausscheidung der Nieren und einer vermehrten Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen führt. Das Absinken des Serum-Phosphatspiegels bewirkt wiederum eine vermehrte Produktion von aktivem Vitamin D_3. Kalzitriol führt nun am Darm zu einer gesteigerten enteralen Kalzium- und Phosphatresorption. Dieser Mechanismus wirkt auch in die gegenläufige Richtung, sodass bei einem gesunden Organismus die bedarfsgerechte Versorgung hergestellt wird (Herold 2011). Je nach Literatur werden verschiedene Referenzbereiche des optimalen 25-Hydoxyvitamin-D-Spiegels diskutiert (Holick 2007; Hewison 2011b). Die Richtwerte für einen ausreichenden Vitamin-D-Spiegel liegen bei 50nmol/l Calcifediol für Erwachsene (Robert Koch-Institut 2019).

1.2.2 Vitamin-D-Mangel: Definition, Ätiologie und Epidemiologie

In der Vergangenheit sprach man von Vitamin-D-Mangel ab einem Serumspiegel von < 8 ng/ml (20 nM) und einer damit einhergehenden Erkrankung wie zum Beispiel Osteoporose (Hewison 2011b). Somit lag der physiologische Referenzbereich in der Vergangenheit bei 8-30 ng/ml (20-75 nM). Neuere Studien zeigten eine Wechselwirkung von zirkulierendem Parathormon, der intestinalen Calciumaufnahme und Serumspiegeln von Vitamin D ab 30 ng/ml (75 nM), sodass aktuell der optimale Referenzbereich des 25-Hydoxyvitamin-D zwischen 30-32 ng/ml (75-80 nM) liegt (Hewison 2011b). Klinische Studien konnten zeigen, dass die Prävalenz neurologischer Erkrankungen (neuromuskulär, neurodegenerativ, ischämisch und dementiell) bei älteren Menschen stark mit einem Vitamin-D-Mangel assoziiert sind (Sudarsky 2001). Gehäuft tritt eine Hypovitaminose-D bei Menschen höheren Lebensalters auf. Dies betrifft in Amerika und Europa etwa 50 % der zu Hause lebenden und 80 % der in Pflegeheimen ansässigen älteren Personen (Holick 2006; Flicker et al. 2005). Mögliche Ursachen eines Vitamin-D-Mangels sind unzureichende UV-Exposition, mangelnde Vitamin-D-Zufuhr über die Nahrung oder Malassimilationssyndrome.

Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Stoffwechselstörung auf Ebene von Leber und Niere sowie genetisch bedingten Störungen der Enzym- oder Vitamin-D-Rezeptor-(VDR-)Synthese. Die Prävalenz des Vitamin-D-Mangels schwankt abhängig von geographischen Begebenheiten, Lebensalter, Jahreszeit und Sonnenexposition (Herold 2011). In der Bevölkerung von Industrieländern hat das häufige Vorkommen einer Hypovitaminose-D3 hinsichtlich der Zellalterung vor allem bei älteren Menschen, eine wichtige Bedeutung. Eine inadäquate Vitamin-D-Versorgung des Organismus kann nicht immer allein durch die gewöhnliche Nahrung ausgeglichen werden, daher werden bereits Nahrungs-ergänzungsmittel mit dem Zusatz von Vitamin D hergestellt (Nowson und Margerison 2002).

1.2.3 Bedeutung des Vitamin D im zentralen Nervensystem

In den letzten Jahren ist durch eine Fülle an laborchemischen klinischen Studien herausgekommen, dass Vitamin D durch Einflussnahme auf das angeborene und erworbene Immunsystem bei zahlreichen Krankheitsbildern eine Rolle spielt. Unter anderem zeigte sich ein Zusammenhang von Vitamin in ausreichender Konzentration und dessen Eigenschaft, das Risiko von autoimmunen Krankheiten wie Multipler Sklerose, Typ 1-Diabetes, entzündlichen Darmerkrankungen, rheumatoider Arthrtis, Osteoarthritis und systemischen Lupus erythematodes zu reduzieren (Adorini und Penna 2008). Vitamin-D-Rezeptoren, das Enzym 1α-Hydroxylase und Vitamin-D-Metabolite sind im gesamten Nervensystem vorhanden und spielen eine zentrale Rolle bezüglich Gesundheit und Krankheit. Daneben gibt es noch die extra-renale Vitamin-D-Synthese: Gehirn, Prostata, Brust, Darm und viele andere Gewebe exprimieren VDR, besitzen das Enzym 1α-Hydroxylase und produzieren damit die aktive Form des Vitamin D (Holick 2006, Dusso et al. 2005). Vitamin D fungiert als auto- oder parakrines Hormon vom neurosteroidalen Typ und verbindet sich direkt mit den VDRs der Gliazellen des Gehirns, insbesondere des temporalen, orbitalen und zingulären Kortex sowie Thalamus, Amygdala und Rückenmark (Langhub et al. 2001). Ob direkt oder indirekt, 1,25-Dihydroxyvitamin D kontrolliert über 200 Gene, welche Einfluss auf Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese nehmen (Napgal et al. 2005). Weiterhin induziert das Hormon die Produktion von antibakteriellen Proteinen und unterstützt somit die zelluläre Abtötung von Bakterien in verschieden Zelltypen (Hewison 2012). Auf welche Weise Vitamin D auf das Risiko und Fortschreiten einer Krankheit Einfluss nimmt, ist bisher wenig verstanden. Untersuchungen zeigten aber, dass der Serumspiegel im Organismus hinsichtlich des Krankheitsverlaufs bei neurodegenerativen

Krankheiten wie Parkinson oder Alzheimer entscheidend ist (Evatt at al. 2008). Hierbei scheinen niedrige Spiegel an Vitamin D die Entstehung und den Ausbruch der Erkrankung zu begünstigen. Dies lässt vermuten, dass Vitamin D über die T-Zell-Modulation hinaus eine wichtige Rolle in Entwicklung und Funktion des ZNS spielt (Garcion et al. 2002). In einem gesunden ZNS werden VDR in den Nervenzellen der grauen, nicht aber der weißen Substanz exprimiert. Außerdem findet sich in diesen Zellen die 1,25-$(OH)_2$-D3-1α-Hydroxylase, das Enzym, welches die Reaktion in die biologisch aktive Form von Vitamin D3 katalysiert (Eyles at al. 2005). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Vitamin D die Differenzierung und Proliferation neuronaler Zellen entscheidend beeinflusst (Deluca et al. 2013). Dabei schützte die zusätzliche Gabe von Vitamin D Mäuse vor Cuprizon-induzierter- Demyelinisierung und reduzierte die Aktivität von Mikroglia und Makrophagen (Wergeland et al. 2011). Die Experimente dieser Arbeit wurden mit aus Mäusen gewonnenen Mikrogliazellen durchgeführt. Die Annahme war, dass die Wirkung von Vitamin D auf die angeborene antibakterielle Aktivität auf Primaten beschränkt sei, da diese ein Schlüsselmolekül, das Vitamin-D-Response-Element (VDRE) exprimieren, welches für die Vitamin D vermittelte Regulation der Transkription von antibakteriellen Proteinen zuständig ist (Gombart et al. 2009). Es zeigte sich aber, dass einige Proteine der Maus wie zum Beispiel Angiogenin 4 (Ang4) antimikrobiell von Vitamin D beeinflusst werden. In den mit Vitamin-D-defizienten Mäusen war die Ang4-Konzentration niedriger, daraus folgte die Dysregulation der antibakteriellen Aktivität und der Homöostase der Darmbakterien. Somit stieg das Prädispositionsrisiko, an einer Kolitis zu erkranken (Lagishetty et al. 2010). Obwohl die Funktion des Ang4 auf bestimmte Regionen des Gastrointestinaltraktes beschränkt zu sein scheint, unterstreicht diese Beobachtung die Vielseitigkeit des Vitamin D, weil es die antibakterielle Aktivität in verschiedenen Gewebe und Tierspezies begünstigt (Hewison 2011a). Die antibakterielle Wirkung des Vitamin D wird aber nicht nur über Monozyten und Makrophagen vermittelt, sondern schließt auch eine Vielzahl an Zellen einschließlich des Bronchialepithels (Yim et al. 2007), der myleolischen Zellreihe (Gombart et al. 2005) sowie der dezidualen und trophoblastischen Zellen der Plazenta (Evans et al. 2006) mit ein. Folglich liegt die Vermutung nahe, dass Vitamin D eine der Schlüsselfaktoren in der menschlichen Immunabwehr darstellt.

1.2.4 Klinische Daten zum Vitamin-D-Mangel

Bereits 1903 wurde Niels Finsen mit dem Nobelpreis ausgezeichnet, nachdem er den Nutzen von UV-Exposition bei Lupus vulgaris, einer Hautmanifestation der Tuberkulose

demonstrierte. Nachfolgende klinische Studien belegten, dass Vitamin D durch Aktivierung der TLR die Immunantwort bei Tuberkulose positiv beeinflusst. So führte Vitamin-D-Substitution bei Lungentuberkulose nach 12 Wochen zu einer Verbesserung der klinischen und bildgebenden Befunde. Weiterhin konnte in dieser Studie eine Verbesserung der Immunaktivierung, gemessen an der INF-γ-Freisetzung, nachgewiesen werden (Salahuddin et al. 2013). Neben der Tuberkulose korrelieren auch bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) niedrige Level an 25-Hydroxyvitamin D im Serum mit der Schwere des Krankheitsverlaufs (Janssens et al. 2010). Bei der Sarkoidose zeigten sich demgegenüber eine erhöhte Konzentration an 1,25-Dihydoxyvitamin-D und eine Hyperkalziämie im Serum. Diese erhöhten Vitamin-D-Spiegel ließen sich vor allem auf die erhöhte Enzymaktivität der 1α-Hydroxylase in Makrophagen der Lunge zurückführen (Kamphuis et al. 2014). Bei epidemiologischen Analysen kann weiterhin eine Verbindung zwischen saisonal veränderter Serumkonzentration von 25-Hydroxyvitamin D und der saisonalen Häufung von Influenza beobachtet werden, was wiederum die Rolle des Vitamin D bei der Abwehr von Infektionen im oberen Respirationstrakt hervorhebt (Aloia und Li-Ng 2007). Vitamin D wurde auch als Schlüsselfaktor bei der Modulierung der Immunantwort im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen des Respirationstraktes identifiziert (Bergman et al. 2012). Die Prävalenz des Vitamin-D-Mangels ist bei hospitalisierten Patienten besonders hoch und stellt einen zusätzlichen Risikofaktor bei der Entwicklung einer Infektion mit septischem Verlauf dar. Im Rahmen einer Sepsis ist zum Beispiel das Vitamin-D-Trägerprotein erniedrigt. Dies führt wiederum zu niedrigeren Konzentrationen an 25-Hydroxyvitamin D (Jeng et al. 2009) und verstärkt die Minderproduktion des aktiven Vitamin D. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein von 25-Hydroxyvitamin D die Blutgerinnungseigenschaften hinsichtlich der mit Sepsis verbundenen disseminierten intravasalen Gerinnung verbessert. Die Vitamin-D-Substitution im Tiermodell beeinflusste die Menge an zirkulierenden entzündlichen Zytokinen wie TNF-α und IL-6 (Watkins et al. 2011). Diese Erkenntnisse führen zu der Ansicht, dass Vitamin-D-Mangel eine verminderte Immunantwort im Rahmen einer Infektion hervorruft. Als mögliche Mechanismen, denen die protektive Wirkung des Vitamin D im Rahmen einer bakteriellen Infektion zuzuschreiben sind, wurden Beeinflussung der Konzentration antimikrobieller Peptide (AMP), Supression der T-Zell-Proliferation und Modulation der dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems identifiziert (Van der Aar et al. 2013; Olliver et al.2013). Bei Erwachsenen verfügt das ZNS über sämtliche Bausteine, um seine eigenen aktiven Metabolite des Vitamin D zu produzieren. Vitamin D fungiert somit als Auto- oder

Parakrinhormon vom neurosteroidalen Typ (Garcion et al. 2002). Über die Bindung an den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) nimmt es Einfluss auf den Temporallappen, den Thalamus (Nucleus accumbens, Stria terminalis), die Amygdala und das Rückenmark (Langub et al. 2001). Darüber hinaus besitzt Vitamin D im ZNS antiepileptische, immunmodulatorische und verhaltensmodifizierende Eigenschaften sowie die Fähigkeit Alterungsprozessen entgegen zu wirken (Kalueff und Touhimaa 2007). Weiterhin konnte belegt werden, dass Vitamin D das Neuronenwachstum in hippokampalen Zellkulturen der Ratten beschleunigt (Brown et al. 2003). Außerdem spielt Vitamin D eine Rolle bei der Regulation zahlreicher Neurotransmitter im Rattengehirn wie z.B. Acetylcholin, Dopamin, Serotonin und Gammaaminobuttersäure (Garcion et al. 2002; Kalueff und Touhimaa 2007). Diesen neurotrophen Merkmalen des Vitamins D ist sein neuroprotektiver Charakter z.B. im Rahmen von zerebralen Ischämien und sein anti- neurodegenerativer Effekt in Tier-modellen der Parkinsonschen Erkrankung zuzuschreiben (Wang et al. 2000; Garcion et al. 2002). In einer prospektiven Studie über 6 Jahre untersuchten Littlejohns und Kollegen eine Kohorte von 1.658 Amerikanern höheren Lebensalters in Bezug auf niedrige Vitamin-D-Konzentrationen und deren Einfluss auf Demenzerkrankungen. Das Ergebnis zeigte unter den Senioren ein zweifach erhöhtes Risiko, beim Vorliegen eines Vitamin-D-Mangels an einer Demenz oder einem Morbus Alzheimer zu erkranken. Ab einer Konzentration von 50 nmol/l war eine Demenzerkrankung vermeidbar. Im Gegenzug stellte die Substitution des Hormons nicht zwangsläufig einen Schutz dar (Littlejohns et al. 2014). Vitamin D wurde bereits vor einigen Jahrzehnten eine ernstzunehmende immunmodulatorische Funktion zugeschrieben. Klinische und experimentelle Studien stützen die Hypothese, dass eine unzureichende Versorgung mit Vitamin D zu einer Dysregulation der menschlichen Immunantwort führt und somit die Entstehung von Infektionskrankheiten und Immun-erkrankungen begünstigt (Hewison 2011; Bergman et al. 2012). Auch belegen immer mehr Studien eine Korrelation von Vitamin-D-Mangel und neurologischen Funktionsstörungen. Ob im menschlichen oder tierischem Organismus, Vitamin D scheint eine zentrale Rolle in der Neurotransmission, Neuroprotektion und Neuroimmunmodulation sowie bei Transmitterprozessen des Gehirns zu spielen (Annweiler et al. 2010). Im Jahr 2014 wurde eine Metaanalyse veröffentlicht, welche den Einfluss einer Vitamin D-Substitution hinsichtlich der Mortalität in Bezug auf kardiovaskuläre Erkankungen, Tumorleiden oder andere Krankheiten untersuchte. Es konnte gezeigt werden, dass die Substitution von inaktivem Vitamin D die Mortalität unter älteren Menschen signifikant senkte (Chowdhury et al. 2014). Weitere Wirkungsspektren des Vitamin D sind antiproliferative Effekte (Spina et

al. 2006), die Förderung der antimikrobiellen angeborenen Immunantwort (Hewison 2011a) sowie die Wirkung auf Bluthochdruck (Zhou et al. 2008) und Immunmodulation (Adams und Hewison 2008; Hewison 2011b). Hierbei scheint der zellspezifischen Synthese des aktiven Metaboliten 1,25$(OH)_2$D eine zentrale Bedeutung zuzukommen. Das Enzym 25-OHD-1α-Hydroxylase, welches auf dem Gen CYP27B1 codiert ist und in vielen extrarenalen Geweben und dem des Immunsystems exprimiert wird, spielt dabei eine zentrale Rolle (Hewison 2011b). Diese Erkenntnisse unterstreichen die wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen, Beeinflussung neurodegenerativer und neuro-immunologischer Krankheiten und Eindämmung von Entzündungen durch die Wirkung des Vitamin D auf körpereigene Immunzellen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die durch *E. coli* verursachte Meningitis und Meningoenzephalitis geht mit einer hohen Sterblichkeit und neurologischen Folgeschäden einher. Gehäuft traten diese Beobachtungen bei Patientenkollektiven auf, die an einer Hypovitaminose D litten. Vitamin D hat potenten Einfluss auf das menschliche Immunsystem, indem es antimikrobielle Proteine (AMPs) akquiriert und die T-Zell-Proliferation hemmt. Sein Einfluss auf die Mikrogliazellen ist jedoch weitestgehend unbekannt. Weiterhin werden Vitamin D antibakterielle, neurotrope, antioxidative und antiinflammatorische Effekte zugeschrieben.

Der Einfluss von Vitamin D im Rahmen einer bakteriellen Meningitis, damit assoziierte oxidative und inflammatorische Prozesse sowie insbesondere die Aktivierung der Mikroglia sind bisher nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Effekte des Vitamin-D-Mangels und -Überflusses auf Mikrogliazellen der Maus hinsichtlich Phagozytoserate, intrazellulärer Abtötung von Erregern und Immunantwort zu untersuchen. Dabei wurde die Mikroglia aus Mäusegehirnen Vitamin-D-defizienter und -suffizienter Mäuse isoliert und kultiviert sowie mit TLR-Agonisten stimuliert. Untersucht wurden zudem Unterschiede hinsichtlich Freisetzung von Zytokinen und Stickstoffmonoxid durch die Mikrogliazellen. Diese Arbeit verfolgt die Hypothese, dass Vitamin D durch Förderung der Erregerlimination und der positiven Beeinflussung der Immunantwort zu einem günstigeren Verlauf der *E. coli*-Meningitis beitragen kann und einen protektiven Effekt auf das Hirngewebe im In-vivo-Modell der bakteriellen Meningitis hat.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aqua, destilliert	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Avidin- Biotin- Komplex	Sigma, St. Louis, MO, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oligonucleotides containing unmethylathed cytosine- guanosin motifs (CpG)	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
DePeX	Serva, Heidelberg, Deutschland
Deoxyribonuclease I	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Diaminobenzidin	Roche, Mannheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)	GIBCO, Darmstadt, Deutschland
D-PBS	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS): Escherichia coli Serotyp026:B6	Sigma, St. Louis, MO, USA
E. coli K1	G. Zysk, Institut für Medizinsiche Mikrobologie, Düsseldorf, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Merck Darmstadt, Deutschland
Gentamicin (10 µg/ml)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Meyers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Interferon-γ	Sigma, St. Louis, MO, USA
Isotone Natrium-Chlorid (NaCl) Lösung 0,9 %	Braun, Melsungen, Deutschland
Isolectin-B4	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ketamin 10 %	Medistar, Ascheberg, Deutschland

Mouse IL-6 ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse TNF-α ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse KC ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IL-10 ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Natriumchlorid	Diaco (Triesk, I)
phosphate buffered saline (PBS) Dulbecco	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	GIBCO, Darmstadt, Deutschland
Poly I:C	Invivo Gen, San Diego, CA, USA
Streptavidin HRP conjugate	Biosource Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma, St. Louis, MO USA
Trypanblau-Lösung	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trypsin	Biochrom (Berlin, D) Deutschland
Tripalmitoyl-S-glyceryl-Cystein (Pam_3CSK_4)	EMC Microcollections, Tübingen, Deutschland
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Xylazin 2 %	Riemser, Greifswald (Insel Riems), Deutschland

2.1.2 Geräte und Software

Autoklav	Systec, Wettenberg, Deutschland
Bunsenbrenner	Schütt, Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Einbettautomat	Thermo Scientific Excelsior ES, Hudson, NH, USA
Eingießstation	Shandon Histocentre 2, Frankfurt, Deutschland
Eismaschine	Scotsman-Enodis, Sprockhövel, Deutschland
Mikroplatten- Reader	Tecan Multi- plate reader, Männerdorf, Schweiz
Graphpad Prism 4.0 Software	Graphpad, San Diego, CA, USA

Inkubator	Memmert Typ BE200, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Olympus BX51, Hamburg, Deutschland
Reagenzglasschüttler-Reax Top®	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Schüttelplatte „rotomix“	Zeipel, Bovenden, Deutschland
Sterilbank-Laminair®	Heraeus, Hannover, Deutschland
Vortex	IKA MS1 Works, Staufen, Deutschland
Waage	Omnilab, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterial und spezielles Material

10 ml Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Napf-Gewebekulturplatten	Satstedt, Nümbrecht, Deutschland
13 mm Glasplättchen/Coverslips	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Blutagar-Platten	Institut für Medizinische Mikrobiologie Göttingen, Deutschland
Deckgläser (24x32 mm)	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf-Cups (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Insulinspritzen (1 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	LO- Laboroptik, Bad Homburg, Deutschland
Objektträger	Knittel- Gläser, Braunschweig, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pinzetten, Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Röhrchen (15 ml)	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Schere	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schraubenbecher (100 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Standard Mausfutter	Ssniff, Soest, Deutschland
Zellsieb (40 µm)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Vitamin-D-armes Futter	Ssniff, Soest, Deutschland

2.1.4 Herstellung von Lösungen

70 %iger Alkohol

Zur Herstellung von 70 %igem Alkohol wurden 700 ml 99 %iger Ethylalkohol mit 300 ml destilliertem Wasser gut vermischt.

Herstellung von *Phosphate-buffered-saline* (PBS)

Es wurden 28,875 g PBS Dulbecco-Pulver in 2,5 l destilliertem Wasser gelöst und mithilfe des Magnet-Rotors gut vermischt. Anschließend wurde die PBS-Lösung autoklaviert.

Zellkulturmedium

Zur Herstellung des Mediums für die Zellkultur wurde zunächst je ein Eppendorf-Cup fetales Kälbsserum (FCS) sowie Penicillin+Streptomycin (=100 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin) (PS) aus dem Kühlfach entnommen und im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, bis sie sich in einem flüssigen Aggregatzustand befanden. Weiterhin wurde ein steril verpackter Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) Behälter aus der Kühlung entnommen, unter der sterilen Anzugshaube geöffnet und 50ml mit der Pipette entnommen. Anschließend wurden 50 ml FCS und 5 ml PS mit einer Pipette in das Medium DMEM überführt. Nachdem das neu angesetzte Medium DMEM+FCS+PS angesetzt worden war, erfolgte die Lagerung im Kühlschrank zur weiteren Verwendung

Stimulation Stammlösung

Zur Herstellung der Stammlösung DMEM+FCS für die Stimulation und das *E. coli*-Inokulum wurde wie unter 2.1.4. beschrieben verfahren unter Ausschluss der 5 ml PS-Zugabe.

***Escherichia coli* K1-Inokulum**

Der Stamm K1 wurde aus dem Liquor eines an Meningitis erkrankten Kindes isoliert und uns freundlicherweise von Dr. med G. Zysk aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie in Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Der Bakterienstamm wurde nicht hitzeinaktiviert und stellt damit einen virulenten Keim dar. Nach Anzüchtung auf Blutagarplatten für 24 Stunden wurden die Bakterien in 0,9 % NaCl-Lösung überführt und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration des Bakteriums in der Stammsuspension beträgt 4,1 x 10^{11} CFU/ml DMEM+FCS und wird auf eine Konzentration von zweimal 10^{7}CFU/ml verdünnt. Unter der sterilen Anzugshaube wird 1 µl *E. coli* mit 20 µl DMEM+FCS verdünnt. Zur Kontrolle der CFU wird das Inokulum in 5 Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, ...) auf eine Blutagarplatte aufgetragen und nach 24 h abgelesen.

Griess-Reagenz

Das für die Messung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung benötigte Griess-Reagenz wurde aus 2,2 ml Reagent A (1 g Sulfonamid, 30 ml Acetat und 70 ml Wasser) und 2,2 ml Reagent B (0,1 g Naphthylethylendiamin, 60 ml Acetat und 50 ml Wasser) hergestellt.

2.2 In-vitro-Versuche

Die Tierversuche wurden durch die Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Göttingen unterstützt und vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt. Die Mäuse wurden bei konstanten 20 °C Raumtemparatur, einer relativen Luftfeuchte von 55 % sowie Beobachtung des Tag/Nacht- Zyklus in Gemeinschaftskäfigen mit maximal sieben Mäusen in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universität Göttingen untergebracht. Die Mäuse erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Es wurden Mäuse des Stammes C57BL/6J einbezogen. Insgesamt wurden 195 Mäuse (168 junge, 26 alte) in die Versuche integriert. Weiterhin wurde stets auf gleichmäßige Geschlechterverteilung geachtet. Bei den neugeborenen Mäusen wurden die unabhängig von der Verteilung alle Geschlechter miteinbezogen.

2.2.1 Messung der Vitamin-D-Konzentration im Blut der Versuchstiere

Sechs Wochen vor der Verpaarung der Tiere wurden die Mäuse ausschließlich mit Vitamin-D-armen Futter der Firma Ssniff (Produktnummer E15312-244, Tabelle 1, Seite 23*)* ernährt. Die Kontrollgruppe erhielt normales Tierfutter (Produktnummer V1534-000, Tabelle 2, Seite 24). Der Vitamin-D-Gehalt des Futters lag dabei unterhalb der Nachweisgrenze bei normaler Calcium- und Phosphatkonzentration. Zur Kontrolle des Vitamin-D-Spiegels wurde den Mäusen, nachdem sie sechs Wochen mit dem Futter ernährt worden waren, Blut entnommen. Dies erfolgte aus dem rechten retrobulbären Plexus mithilfe einer Mikro-Hämatokrit-Kapillare. Dabei wurden bis zu fünf Tropfen Blut gewonnen, um die Mäuse nicht zu schwächen. Anschließend wurde die 25-OH-Vitamin-D3-Konzentration mittels Flüssigkeits-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie gemessen (Prof. Dr. med. T. Bertsch Institut für Klinische Chemie, Laboratoriumsmedizin und Transfusionsmedizin-Zentrallaboratorium; Universitätsinstitut der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Nürnberg).

Vitamin-D-armes Futter:

Inhalte	**Einheit**	**Vitamin-D-Defizienz** Ohne Zusatz von Vitamin D_3
Kasein	%	24,000
Maisstärke, vorgeliert	%	30,000
Maltodextrin, 10 DE	%	19,570
Dextrose	%	10,000
Zellstoff	%	5,000
L-Zystein	%	0,200
Vitaminvorgemisch Vitamin D_3	%	1,000
Mineralienvorgemisch	%	6,000
Choline Cl (50 %)	%	0,200
Farbstoff (rot/blau)	%	0,030
Sojabohnenöl	%	4,000
Roheiweißgehalt	%	20,8
Rohfettgehalt	%	4,2
Rohbalaststoffgehalt	%	5,0
Rohaschegehalt	%	5,3
Stärke	%	28,9
Dextrin	%	19,4
Zucker	%	10,8
Kalzium	%	0,90
Phosphat	%	0,63
Vitamin A	IU/kg	15,000
Vitamin D_3	IU/kg	<100
Energie kcal% Protein kcal% Fett kcal% Kohlehydrate	MJ/kg	15,2 23 10 67

Tabelle 1 Zusammensetzung des Vitamin-D3-armen Futters.

(Produktnummer E15312-244)

Reguläres Tierfutter:

Inhalte	Einheit	Normales Tierfutter, Angabe pro Kg
Rohprotein	%	19,0
Rohfett	%	3,3
Rohfaser	%	4,9
Rohasche	%	6,4
Calcium	%	1,0
Phosphat	%	0,7
Zucker	%	4,7
Calcium	%	1,0
Vitamin A	IE/kg	15,000
Vitamin D3	IE/kg	1,100
Vitamin E	mg/kg	100
Eisen-(II)-Sulfat	mg/kg	100
Zink	mg/kg	50
Mangan	mg/kg	30
Kupfer	mg/kg	5
Selen	mg/kg	0,1
Jod	mg/kg	2.0
Energie kcal% Protein kcal% Fett kcal% Kohlehydrate	MJ/kg	16,3 33 9 58

Tabelle 2 Zusammensetzung des regulären Tierfutters

(Produktnummer V1534-000)

2.2.2 Gewinnung und Anzucht der Mikrogliazellen

Primärkulturen von Mikrogliazellen wurden aus Gehirnen neugeborener C57Bl/6-Mäuse präpariert, deren Eltern entweder eine Vitamin-D-defiziente oder eine Vitamin-D-normale Diät erhalten hatten und nicht älter als drei Tage waren (p 0-3). Als erstes wurde das Nährmedium DMEM+FCS+PS im Wasserbad erwärmt. Für 10 gewonnene Gehirne wurde ein Eppendorf-Cup DNAse und ein Eppendorf-Cup Trypsin bereitgestellt. Alle folgenden Schritte wurden unter der sterilen Abzugshaube ausgeführt. Um Verunreinigung möglichst gering zu halten, wurden alle Flüssigkeiten am Flaschenhals sprühdesinfiziert, am Bunsenbrenner kurz erhitzt und steril abgefüllt. Zunächst wurde je eine Flasche (Fassungsvermögen 25 ml) mit zwei Gehirnen, 10 ml PBS und 10 ml Poly L-Lysin befüllt. Für die Präparation wurde ein Glas mit Alkohol (70 %) und Tuch zur Säuberung des Präparierbestecks bereitgelegt. Nun wurde eine Styroporplatte mit Parafilm bespannt und eine Schale mit Abdeckung für die Mäusekadaver bereitgestellt. Zunächst begann die Gewinnung der Mausgehirne, hierbei wurde darauf geachtet, dass nur gleiche Pinzetten bei gleichem Muttertier verwendet wurden. Nach zervikaler Dislokation erfolgte die Dekapitation der Maus. Anschließend erfolgte die Sprühdesinfektion des Kopfes mit Alkohol (70 %) sowie Fixierung des Kopfes durch eine Nadel. Zunächst wurden Kopfhaut, Schädelkalotte und Dura mater mit Pinzetten entfernt und das freigelegte Gehirn durch eine Schaufelpinzette in die mit PBS befüllte Petrischale im Eisbad gelegt. Nach jeder Präparation wurde das Präparierbesteck desinfiziert. Anschließend erfolgte die mikroskopische Entfernung der Pia mater. Hierbei wurde darauf geachtet, das Gehirn von Meningen und Blutgefäßen zu befreien. Dem gewonnenen Material wurden 10 ml PBS und 100 µl Trypsin pro Gehirn hinzugefügt und die Suspension fünf Minuten im 37 °C Wasserbad verwahrt. Die Trypsinreaktion wurde mit 1 ml DMEM+FCS+PS pro Gehirn gestoppt. Anschließend wurden 40 µl DNAse pro Gehirn hinzugefügt und die Flasche für 10 min bei 900 rpm 4° C zentrifugiert. Während dieser Zeit wurden die vorbereiteten Nährflaschen dreimal mit 10 ml Aqua destilliert und einmal mit 5 ml DMEM gewaschen und abschließend jede Flasche mit 10 ml DMEM befüllt. Der Überstand der zentrifugierten Flaschen wurde verworfen, das übrige Pellet mit DMEM+FCS+PS gelöst und diese Suspension in eine T75-Brutflasche gefüllt. Anschließend wurden die Flaschen bei 37 °C und 5 % CO2 im Brutschrank verwahrt. Am ersten Tag nach der Zellgewinnung wurden die Brutflaschen dreimal mit je 10ml DPBS und einmal mit 5ml DMEM+FCS+PS gewaschen und mit neuem Nährmedium gefüttert. Um ein Austrocknen zu vermeiden, sollten die

Flaschen möglichst kurz geöffnet werden. Am dritten und siebten Tag nach der Präparation wurden die Brutflaschen neu befüllt. Hierzu wurden die oben beschriebenen Bedingungen geschaffen, das Nährmedium der Flaschen entfernt und mit 10-12 ml DMEM+FCS+PS neu befüllt. Waren am zehnten Tag nach der Zellgewinnung unter dem Mikroskop ersichtlich bereits genügend Zellen gewachsen, konnte mit der Ernte begonnen werden. War dies nicht der Fall, wurden die Zellen erneut gefüttert und das Wachstum in den darauffolgenden Tagen kontrolliert.

2.2.3 Gewinnung von Serum

Nachdem die Maus zunächst narkostisiert und anschließend dekapitiert wurde, konnte mithilfe einer Mikro-Hämatokrit-Kapillare noch austretendes Blut aus der Hauptschlagader entnommen werden und im einem Eppendorf- Gefäß aufgefangen werden. Für die Gewinnung von Serum wurden die Blutproben für mindestens 30 Minuten im Kühlschrank stehen gelassen, um die Koagulation zu fördern. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C und 3000 g. Danach wurde das Serum abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung, zum Beispiel zur Bestimmung von Zytokinen, bei -20 °C eingefroren.

2.2.4 Ernte der Mikrogliazellen

Etwa 10 bis 14 Tage nach der Präparation hatte sich der mikroskopisch sichtbare Astrozytenrasen gebildet und die Ernte konnte begonnen werden. Die Brutflaschen wurden aus dem Brutschrank genommen, auf die Motomix Schüttelplatte gesetzt und sanft an den Außenseiten beklopft. Nach 30 Minuten wurden die Flaschen von der Platte genommen und unter der sterilen Haube das Nährmedium mit den gelösten Zellen in Nährflaschen mit 10-12 ml Zellkulturmedium überführt und im Brutschrank verwahrt. Die Brutflaschen wurden bei Raumtemparatur für 20 Minuten bei 900 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit ca. 5 ml Medium zurückgelassen. Waren mehrere Flaschen gleichen Zelltyps vorhanden, wurden die Überstände suspendiert und in eine gemeinsame Flasche überführt. Als nächstes wurde ein Loch in einer 96-*well*-Platte mit 90 µl Trypanblau befüllt und 10 µl der Zellsuspension hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen wurden 10 µl der Trypanblau-Zell-Suspensionslösung auf eine mit einem Deckblatt belegte Neubauerkammer gegeben. Nach der Zellzahlbestimmung und Verdünnung wurden die Zellen in einer 96-*well*-Platte mit einer Dichte von ungefähr 50000 Zellen in 200-300 µl/*well* ausgesät. Um ein Austrocknen der Wellnäpfe zu vermeiden, wurden die restlichen Wellnäpfe mit 200 µl Zellkulturmedium gefüllt. Nach zweistündiger

Inkubation wurden die Platten für 24 h in den Brutschrank gestellt. Je nach Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit konnte die Ernte nach ein paar Tagen wiederholt werden.

2.2.5 Stimulation der Zellen

Für jedes Protein wurde zunächst die korrekte Dosierung berechnet. Diese betrugen bei LPS (TLR-4-Agonist) und P_3CSK_4 (TLR-1/2-Agonist) 1, 0,1, 0,01, 0,001 und 0,0001 µg/ml, bei Poly (I:C) (TLR-3-Agonist) und CPG (TLR-9-Agonist) 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001µg/ml. Die Konzentrationen der TLR-Agonisten wurden, basierend auf der NO-Freisetzung, die sie in den Mikrogliazellen induzierte, gewählt. Folglich wurden die niedrigsten Konzentrationen der jeweiligen TLR-Agonisten gewählt, die eine maximale NO-Freisetzung hervorgerufen hatten (Ebert et al. 2005). Zuvor war bereits gezeigt worden, dass die gewählten Konzentrationen der TLR-Agonisten die Phagozytose von *E. coli* K1 durch Mikrogliazellen erhöht hatten (Ribes et al. 2009). Um die NO-Freisetzung der Mikrogliazellen zu erhöhen, wurde Interferon-γ (100U/ml) als Kostimulator hinzugefügt. Eine Kontrollgruppe mit unstimulierten Zellen wurde allen Versuchen hinzugefügt. In diesem Experiment wurden mehrere Konzentrationen gewählt, um mittels einer Dosis-Wirkungs-Kurve den Effekt verschiedener Konzentrationen einer Stimulanz nachweisen zu können. Nachdem DMEM+FCS im Wasserbad für 20 Minuten bei 37 °C erwärmt worden war, erfolgte die Suspension und Überführung der jeweils errechneten Menge der Stimulantien in die beschrifteten Eppendorf-Cups. Um eine gute Vermischung zu erzielen, wurden diese kurz auf die Motomix-Schüttelplatte gestellt. Anschließend wurden je drei Wellnäpfe mit einer Stimulanzkonzentration befüllt. In fünf verbleibenden *wells* erfolgte nur ein Mediumwechsel mit 250 µl Medium. Diese dienten als Negativkontrolle. Zwei weitere *wells* werden für 1 Stunde in 200 µl Formalin fixiert und anschließend mit 250 µl PBS befüllt. Dieses Vorgehen diente der späteren Auszählung der gewachsenen Zellen. Die Deckplatte wurde entsprechend beschriftet und die Platte anschließend in den Brutschrank gestellt. Die Überstände der stimulierten und unstimulierten Gruppen wurden nach 24 Stunden Inkubation abpipettiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Phagozytose

DMEM+FCS wurde im Wasserbad für 20 Minuten bei 37 °C erwärmt, PBS und Aqua dest. am Flaschenhals desinfiziert, unter der sterilen Haube kurz erhitzt und in kleine Becher

abgefüllt. Als nächstes wurde das *E. coli*-Inokulum hergestellt. Zunächst wurden die Überstände der *wells* abgenommen und auf eine neue beschriftete Wellplatte überführt. Diese wurde luftdicht mit einer Paraffinfolie umschlossen und eingefroren. Später erfolgte hieraus die Messung der Zytokine. Nun wurden die stimulierten *wells* zweimal mit je 250 µl PBS pro *well* gewaschen und anschließend 250 µl *E. coli* K1 ($6x10^6$ CFU) pro *well* hinzugegeben. Die Platte wurde für 90 min. bei 37 °C und 5 %CO_2 inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Antibiotikalösung mit Gentamicin (100 µg/ml) und DMEM+FCS im Verhältnis 1:100 hergestellt. Nach 1,5 h wurde der Bakterienüberstand verworfen, die Wellnäpfe mit 250 µl PBS pro *well* gewaschen und mit je 250 µl Gentamicinlösung befüllt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 60 min. Parallel wurden die Eppendorf-Cups zum Herstellen der Verdünnungsreihen mit 90 µL und 450 µl NaCl bereitgestellt. Nach 1 h wurden die Überstände mittels Pipette entfernt und die verbleibenden Zellen zweimalig mit 250 µl PBS pro *well* gewaschen. Nach Zugabe von je 100 µl Aqua dest. je *well* kam es zur Zelllyse und die Bakterien wurden freigesetzt. Anschließend wurden die Verdünnungsreihen hergestellt. Hierzu wurden 10 µl aus dem *well* in einen 90 µl Eppendorf-Cup überführt und daraus 50 µl in ein 450 µl Eppendorf-Cup pipettiert. Der letzte Schritt wurde dreimal wiederholt. Zwischen jedem Verdünnungsschritt wurden die Eppendorf-Cups kurz auf die Motomix-Schüttelplatte gesetzt. Anschließend wurden die Verdünnungsstufen in aufsteigender Konzentration auf die Blutagarplatten aufgetragen. Das entsprach je 10 µl aus den Eppendorf-Cups und je 10 µl sowie 50 µl direkt aus dem *well*. Um ein Absterben und Austrocknen von Zellen zu verhindern, wurden immer drei *well* pro Konzentration ausplattiert und in den Inkubator gestellt. Nach 24 h wurde die Konzentrationen der auf den Platten gewachsenen Bakterien (CFU/*well)* abgelesen (Abb.2, Seite 29). Die Zahl der während der Phagozytose aufgenommenen Bakterien wurde determiniert durch quantitatives Ausplattieren von Zelllysaten auf Blutagarplatten. Die Daten wurden als *recovered bacterial colony forming units* (CFU) pro *well* (Median und 25.-/75.-Perzentile) dargestellt.

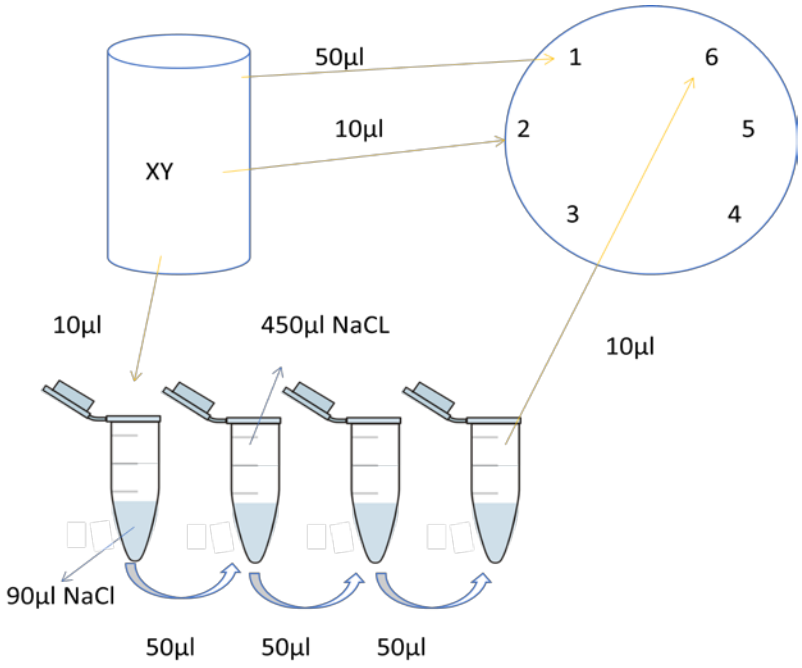

Abbildung 2 Ausplattieren der Wellnäpfe (eigene Abbildung)

Der Zylinder „XY“ stellt den Wellnapf dar. Nach Verdünnung mittels Eppendorf-Cups erfolgt die Auftragung auf die Blutagarplatte (runder Kreis rechts oben).

2.2.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mithilfe des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurden die Zyto- und Chemokine in der Mikroglia und den Makrophagen der Mäuse quantifiziert. Dies erfolgte mittels nicht-kompetitiven Sandwich-Assay, wobei ein erster Antikörper (Capture-Antikörper) das Analyt an ein Epitop bindet und danach ein zweiter markierter Antikörper (Detektions-Antikörper) ein zweites Epitop des Analytes bindet und somit quantifizieren kann. Es wurden dabei ELISA-Kits verwendet und die dazu benötigten Lösungen nach Angaben des Herstellers angesetzt. In einem ersten Schritt erfolgte die Herstellung der soliden Phase, also der *well*-Platten, welche den Capture-Antikörper gebunden haben. Dabei wurde der Antikörper laut Vorschrift des Herstellers des jeweiligen zu bestimmenden Zyto- oder Chemokines angesetzt, mit PBS verdünnt (7,5 ml PBS+ 27,5 µl Antikörper) und davon je 50 µl in ein *well* gegeben. Die Platten wurden nun über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte dann ein dreimaliger Waschvorgang mit Wash-Puffer (0,5 g Tween 20 mit 1 Liter PBS verdünnt) und anschließend die Hinzugabe von 300 µl Blockpuffer (15 ml Natriumazid + 15 g Sucrose + 3 g Rinderserumalbumin+ 300ml PBS) pro *well* und Inkubation für eine Stunde bei

Raumtemperatur. Währenddessen wurden der Zellkulturüberstand je nach der zu erwartenden Höhe der Zytokin- bzw. Chemokinwerte mit *Reagent Diluent 1* verdünnt (1 g BSA + 100ml PBS). Die Standards wurden ebenfalls mit *Reagent Diluent 1* verdünnt. Nun wurden pro *well* je 50 µl verdünntes Analyt einfach sowie die verdünnten Standards vierfach auf die Platten aufgetragen und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem weiteren dreimaligen Waschvorgang erfolgte dann die Auftragung von je 50 µl des spezifischen Detektions-Antikörpers (7,5 ml *Reagent Diluent 1* + 27,5 µl Antikörper) pro *well* und die anschließende Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Danach erfolgte ein weiterer dreimaliger Waschvorgang und das Auftragen von je 50 µl *HRP-Diluent* (*horseradish peroxidase-Diluent*, 40 ml Wasch-Puffer + 40 mg BSA + 1 µl Streptavidin HRP conjugate Biosource SNN 2004) pro *well* und eine weitere Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach dreimaligen Waschen wurden je 100 µl TMB (Tetramethylbenzidin)-Substratlösung zu den Wellnäpfe dazugegeben und nach Beobachtung eines deutlichen blauen Farbumschlages des höchsten Standards mit je 50 µl Stopplösung (1N Schwefelsäure) pro *well* gestoppt. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei 450 nm mittels Photometer innerhalb der nächsten 30 Minuten (Referenzfilter 540/570nm).

2.2.8 Messung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung

Stickstoffmonoxid wird von stimulierten Mikrogliazellen freigesetzt. In diesem Versuch wurde mittels der Griess-Reaktion indirekt die NO-Freisetzung gemessen. Es wurde das stabile Nitrit, welches aus dem sehr kurzlebigen NO entsteht, quantitativ ermittelt. Für die NO-Freisetzung wurde bei der Stimulation der Zellen 50µl Interferon γ zugesetzt. Für die Bestimmung der Akkumulation von Nitrit als Abbauprodukt in der Mikroglia wurden die wie oben beschrieben geernteten Zellen aus dem Gefrierschrank geholt und unter Zugabe von DMEM+FCS+PS im Wasserbad erwärmt. Zum Herstellen der Standardsäule wurden 8 kleine Eppendorf-Cups entsprechend beschriftet. In den ersten Eppendorf-Cup wurden 1250 µl und in die restlichen Eppendorf-Cups je 400 µl DMEM+FCS+PS pipettiert. Nun wurden in den ersten Eppendorf-Cup 10 µl Nitrit-Standard (34,5 mg Na-Nitrit auf 50 ml Aqua dest.) überführt, dieser kurz geschüttelt und aus dieser Mischung 400 µl in den nächsten Eppendorf-Cup gegeben. Aus diesem wiederum wurden erneut 400 µl entnommen und in den nächsten überführt. Dieser Vorgang wiederholt sich bis zum letzten Eppendorf-Cup. Nun wurden die Reihen 1-3 in absteigender Konzentration (A-H) mit je 50 µl pro *well* befüllt. Zuletzt wurde in jedes *well* der Standardkurve und der aufgetauten Zellen

50 µl Griess-Reagenz hinzugegeben (Abb.3, Seite 31). Die Nitrit-Messung erfolgte nun am Computer mittels Microtiterplatten-Reader mit 540 nm Testfilter.

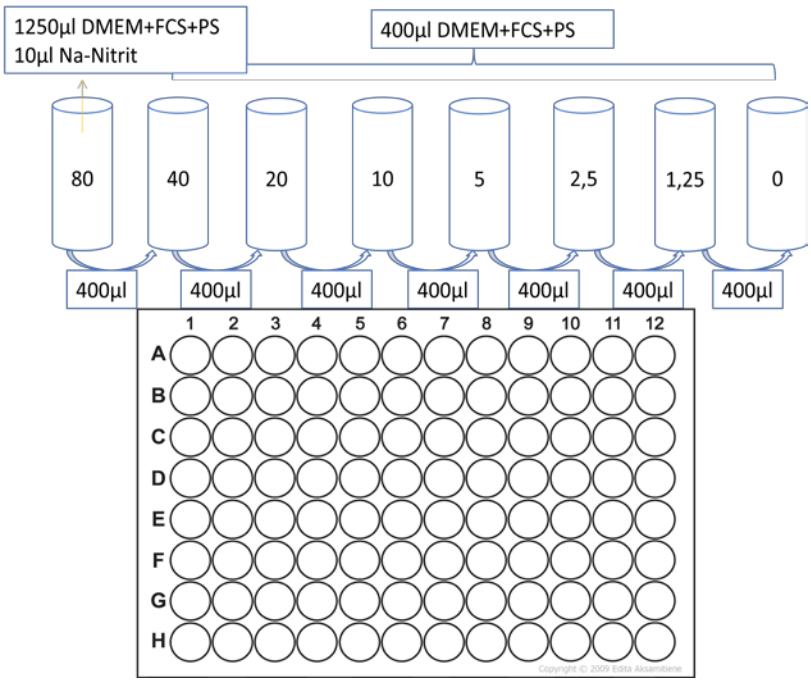

Abbildung 3 Schema der NO-Messung (eigene Abbildung)

Der Kasten (A-H, 1-12) beinhaltet die Überstände der geernteten Zellen, welche im Gefrierschrank gelagert wurden. Die Zylinder stellen die Eppendorf-Cups in absteigender Verdünnung (von links nach rechts) dar.

2.2.9 Messung der Überlebensfähigkeit der Mikroglia

Die Überlebensfähigkeit der Zellen wurde mittels WST-1 (*water soluble tetrazolium*) Zellproliferationsreagenz bestimmt. Diese Untersuchungstechnik dient dem Nachweis einer intakten Atmungskette in den Mikrogliazellen und basiert auf der Spaltung eines Tetrazoliumsalzes. Viable Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System bewirken eine enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 in das dunkelrote Formazan, welches ein lösliches Formazan produziert. Dabei erfolgt die Konversion nur in lebensfähigen Zellen. Die Zellen werden für 3 Stunden in WST-1-Reagenz inkubiert; anschließend wird der Farbumschlag in einem Spektralphotometer photometrisch quantitativ bei einer optischen Dichte von 490 nm im Genios multiplate reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die Absorbation korreliert direkt mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Als Negativkontrolle wurde

1%iges Triton X-100 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) appliziiert, welches Zelllyse ausübt.

2.2.10 Homogenisierung des Kleinhirns und der Milz

Zur Herstellung eines Homogenates wurde das Kleinhirn- und Milzgewebe in 500 µl 0,9% NaCl-Lösung überführt. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung mithilfe eines Potter-Elvehjem-Handhomogenisators, welcher zwischen der Anwendung an unterschiedlichen Proben desinfiziert und nachfolgend mit klarem Wasser abgespült wurde. Nach Herstellung der Homogenate sowie nach Blutentnahme erfolgte eine serielle 1:10-Verdünnung in acht Schritten und anschließende Ausplattierung auf Schafsblut-Agarplatten (Abb. 4, Seite 32). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die gewachsenen Kolonien auf den Agarplatten abgelesen. Die Homogenate wurden nach Bestimmung der Bakterien-konzentration (CFU/ml) bei -20 °C eingefroren.

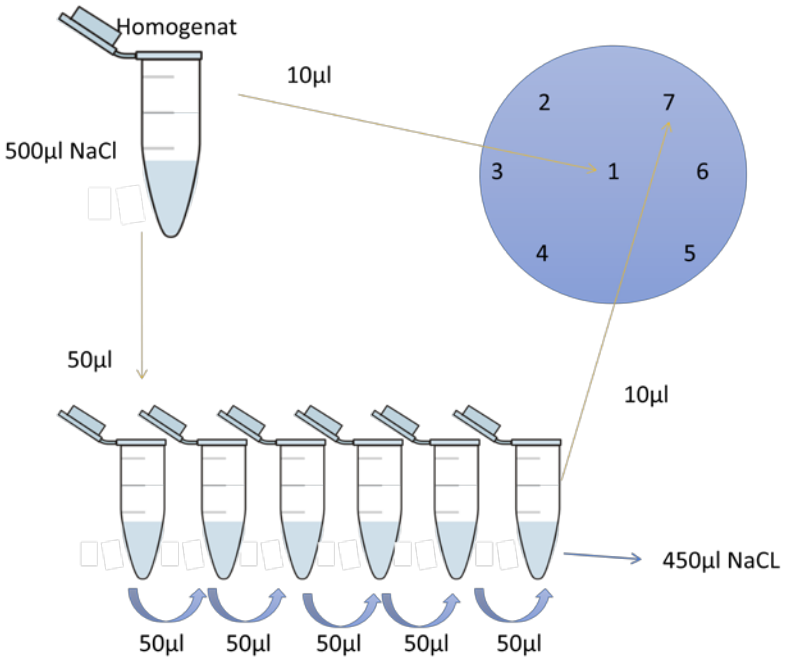

Abbildung 4 Ausplattieren der Homogenate (eigene Abbildung)

Der Zylinder oben links stellt das Homogenat dar. Nach Verdünnung mittels Eppendorf-Cups erfolgt die Auftragung auf die Blutagarplatte (runder Kreis rechts oben).

2.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung sowie zur grafischen Darstellung der Versuche wurde die GraphPad Prism 5.0 Software (GraphPad Software, San Diego, CA), SAS Software 9.3 (SAS Institute, North Carolina, USA) und STATISTICA IA verwendet. Normalverteilte Daten der Vitamin-D3-Serumkonzentration wurden mithilfe von Mittelwert ± Standard error dargestellt. Ein Vergleich zweier normalverteilter Gruppen erfolgte mittels Student's t-Test. Ein Vergleich von mehreren normalverteilten Gruppen erfolgte mittels Analysis of Variance (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni-Post-Test. Die Zytokin- und Chemokinmessung und Phagozytosedaten wurden als Mediane und in der 25.-/75.-Perzentilen dargestellt. Mittels SAS (Version 9.3) wurde der Effekt der einzelnen Konzentration innerhalb der Gruppe sowie der Gruppen untereinander (hinsichtlich der Phagozytoserate von *E. coli* K1 sowie der Zyto- und Chemokinausschüttung) gemäß zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Der Maustyp wurde als zufälliger Faktor berücksichtigt. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau (α) von 5 % angenommen und nach Korrektur für multiples Testen der Bonferroni-Test vorgenommen. Deskriptive Werte der Zellüberlebens-fähigkeit, der intarzellulären Aktivität und NO- Freisetzung wurden als Mittelwerte und Standardfehler angegeben und mittels one-way ANOVA ausgewertet. Diese Daten wurden für multiples Testen durch Bonferroni wiederholt korrigiert. Bei signifikanter Wechselwirkung wurden anschließende Paarvergleiche durchgeführt. Das bedeutet, dass ein p-Wert $\leq 0{,}05$ auf eine statistische Signifikanz hindeutet. Ein $p \leq 0{,}05$ wurde als *, ein $p \leq 0{,}01$ als ** und ein $p \leq 0{,}001$ als *** dargestellt. Die visuelle Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Graphpad Prism Software.

3 Ergebnisse

3.1 In-vitro-Versuche

Bevor die Experimente mit den aus Mäusehirnen extrahierten Mikrogliazellen begonnen werden konnten, erfolgte eine sechswöchige Ernährung der Elterntiere mit Futter, dessen Vitamin-D-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze bei normaler Kalzium- und Phosphatkonzentration lag (Vitamin-D3 < 100 IU/kg Futter). Dies führte im Vergleich zu den Mäusen welche Nahrung mit normalem Vitamin-D-Gehalt erhielten, zu signifikant niedrigeren Konzentrationen an 25-OH-Vitamin-D3 im Serum ($p < 0{,}001$). Abbildung 5 (Seite 34) stellt die Verteilung der Vitamin- D- Serumkonzentration der Mäuse dar. Die beiden Mäuse mit den niedrigsten 25-OH-Vitamin-D3 Werten in der Vitamin-D-armen Gruppe lagen unter dem Nachweislevel.

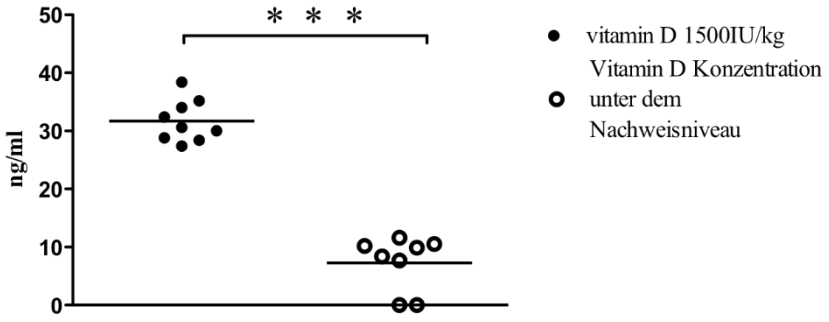

Abbildung 5 25-OH-Vitamin- D3-Konzentration im Mausserum

Die gefüllten schwarzen Kreise stellen die Population mit normaler Vitamin-D-Ernährung dar, die ungefüllten schwarzen Kreise stellen die Mäuse mit Vitamin-D-armer Ernährung dar (Abbildung aus Publikation dieser Arbeit).

3.1.1 Phagozytose stimulierter Mikrogliazellen

Im einführenden Teil dieser Arbeit (Seite 9) wurde bereits die Rolle der Mikrogliazellen als professionellen Phagozyten des zentralen Nervensystems dargestellt. Die genauen Mechanismen, welche zur Erkennung der Pathogene und Phagozytose durch Gliazellen führen, sind bisher unbekannt. Um die Rolle der TLR-Agonisten bei der Phagozytose besser verstehen zu können, wurden die kultivierten Zellen, wie im Versuchsablauf 2.2.5 (Seite 27) geschildert, mit verschiedenen TLR-Agonisten stimuliert.

Stimulus (µg/ml)	Phagozytierter *E. coli*-K1 (nach 90 min in CFU/ml)		Intrazelluläre Abtötung *E. coli*-K1 (nach 300 min in CFU/ml)	
	D +	**D -**	**D +**	**D -**
Medium	429,3 / 105	410,7 / 103	375,1 / 20,41	333,3 / 21,3***
Pam_3CSK_4 1	16253 / 3922	9133 / 2113	15033,0 / 496,7	7207 / 753,8***
Poly (I:C) 10	4160 / 606,4	1519 / 280,8	3603,0 / 130,5	1213 / 80,2***
LPS 1	21133 / 4111	7800 / 1730	18120,0 / 754,9	6271 /520,3***
CPG 10	11393 / 2259	5333 / 687,8	9340,0 / 293,2	4559 /245,6***

Tabelle 3 Intrazelluläre Abtötung von *E. coli* K1 durch Vitamin-D-suffiziente (D+) und Vitamin-D-defiziente (D-) Mikroglia.

Die intrazelluläre Abtötung durch *E. coli* K1 ist in Vitamin-D-defizienten Mikrogliazellen nach Stimulation mit hohen Konzentrationen an TLR-1/2-, -3-, -4- und -9-Agonisten verringert. Unstimulierte und stimulierte Vitamin-D-suffiziente und -defiziente Mikroglia wurden für 90 Minuten mit *E.coli* inkubiert. Die Kolonien wurden für 90 und 300 Minuten mit Gentamicin behandelt, um extrazellulär angesiedelte Bakterien zu töten. Für jede Gruppe ist die Phagozytose anhand der gewonnenen Anzahl an Bakterien nach 90 Minuten dargestellt. Die absolute Anzahl der getöteten Bakterien nach 300 Minuten ist aus der Differenz der intrazellulären Bakterien nach 60 und 300 Minuten berechnet worden. Die Daten wurden von mindestens zwei unabhängigen Experimenten (n ≥15 *wells*/Gruppe) dargestellt und mittels one way ANOVA korrigiert mit Bonferroni für multiples Testen berechnet (Abbildung aus Publikation dieser Arbeit).

Die Phagozytose von *E. coli* durch die Mikroglia, gewonnen aus Vitamin-D-arm und -normal ernährten Mäusen, wurde quantitativ verglichen. Hierzu erfolgte die zeitgleiche Inkubation der Gliazellen und Bakterien für 90 Minuten in unstimulierten und stimulierten Kulturen. Für die Stimulation wurden TLR-1/2-, -3-, -4- und -9-Agonisten ausgewählt (n = 21 *well* pro Konzentration für TLR-1/2, -4 und -9; n = 18 für TLR-3-Agonist). Die Analyse der Phagozytoserate von *E. coli* K1 durch unstimulierte Zellen zeigte eine geringere Aufnahme der Bakterien im Vergleich zu den stimulierten Kulturen (Mikrogliakultur Vitamin-D-suffizienter Mäuse: Median 50 (20;80) CFU/*well;* Mikrogliakultur Vitamin-D-defizienter Mäuse: Median 40 (20;100) CFU/*well*). 90 Minuten nach der Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten zeigte sich eine dosisabhängige vermehrte Aufnahme von *E. coli* Bakterien in beiden Mikrogliazellkulturen. Die vorherige Stimulation mit den höchsten Konzentrationen an TLR-3-, -4- oder -9-Agonisten erhöhte signifikant die Phagozytoserate von *E. coli* in Vitamin-D-normalen verglichen zu Vitamin-D-armen Mikroglia (p-Wert (adjustiert) <0,05). Ausgenommen der TLR-1/2 Agonisten (Pam_3 CSK_4), war eine Interaktion zwischen den Gruppen und Konzentrationen zu erkennen und die Phagozytoserate für alle TLR-Agonisten positiv (p≤0,05) (Tabelle 3; Seite 35). Es war ebenfalls ersichtlich, dass die

Freisetzung von Zyto- und Chemokinen, sowie die Phagozytoserate nach Inkubation der Mikrogliazellen mit verschiedenen TLR-Agonisten in beiden Gruppen abhängig von der Konzentration war. Dies galt für alle TLR-Agonisten ($p \leq 0,05$). Folglich wurden die Mikroglia konzentrationsabhängig stimuliert. Mit Ausnahme von Pam_3CSK_4, wurde eine Wechselwirkung innerhalb der Gruppe sowie Konzentration zwischen stimulierter Mikroglia und Phagozytoserate für alle TLR-Agonisten gefunden. Dies bedeutet, dass Vitamin-D-Defizienz die Phagozytose signifikant verminderte ($p < 0,05$; two-way ANOVA korrigiert mit Bonferroni für multiples Testen). Die Zytokin- und Chemokinausschüttung zeigten ebenso eine Signifikanz in Bezug auf die Wechselwirkung zwischen Gruppe und Konzentration. Dies belegt, dass eine niedrige Vitamin-D-Konzentration Einfluss auf Zytokin- und Chemokin-Freisetzung hatte. Allerdings konnte für CXCL1 und TNF-α nach Stimulation mit Poly(I:C) und CpG keine signifikante Wechselwirkung zwischen den beiden Gruppen und den Konzentrationen gezeigt werden. Durch die Stimulation mit TLR-Agonisten erhöhte sich die Anzahl der von Mikroglia aufgenommen Bakterien im Vergleich zu unstimulierten Zellen in beiden Gruppen. Nach Stimulation mit den höchsten Konzentrationen an TLR-3-, -4- und -9-Agonisten nahmen Vitamin-D-defiziente Mikrogliazellen signifikant weniger *E. coli* auf, verglichen zu der Phagozytoserate Vitamin-D-suffizienter Mikroglia (gekennzeichnet durch den Stern). Die Ergebnisse wurden graphisch in Abbildung 6 (Seite 37) illustriert. Gefüllte schwarze Zirkel stellen Vitamin-D-suffiziente Mikrogliazellen, offene graue Zirkel Vitamin-D-defiziente Zellen dar ($p < 0,05$; two-way ANOVA korrigiert mit Bonferroni für multiples Testen).

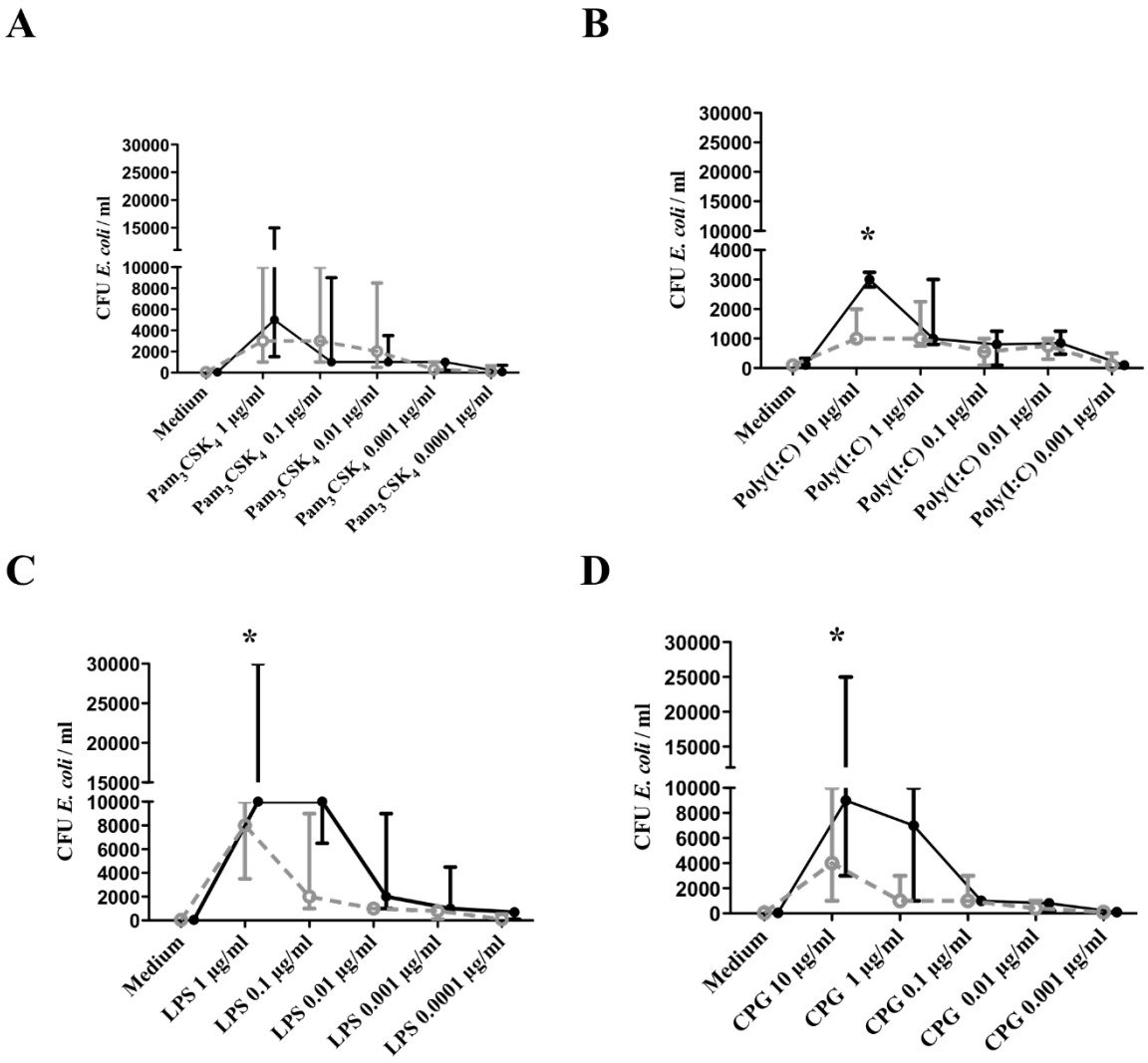

Abbildung 6 Phagozytose eines *E. coli*-K1-Stamms durch Mikroglia nach 24 h Vorstimulation mit [Pam_3CSK_4, Poly(I:C), LPS, und CpG] zu verschiedenen Konzentrationen.

Die gefüllten schwarzen Zirkel stellen Vitamin-D-suffiziente, offene graue Zirkel Vitamin-D-defiziente Mikrogliazellen dar (Abbildung aus Publikation dieser Arbeit).

3.1.2 Messung der Zytokinausschüttung

Um die Aktivierung der Mikrogliazellen durch TLR-Agonisten zu bestätigen und das Ausmaß zu erfassen, wurde die Konzentration von TNF-α, IL-6, und CXCL-1 (KC) in den Überständen der Mikrogliazellkulturen (n = 21 pro Konzentration von TLR-1/2-, -4- und -9-Agonisten und n =18 pro Konzentration des TLR-3-Agonisten) mittels ELISA (s.2.2.7; Seite 29) gemessen. Zuvor erfolgte die Stimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Pam_3CSK_4, Poly(I:C), LPS und CpG. In den Graphen A bis D in Abbildung 7 (Seite 39)

sind Interleukin (IL)-6 (Kreise), Tumornekrosefaktor (TNF)-α (Dreiecke), Chemokine (C-X-C Motiv) und Ligand 1 (CXCL1) (Quadrate) dargestellt. Nach 24 h Inkubation der Überstände aus der Mikrogliakultur wurde jede Konzentration in pg/ml angegeben. Alle Versuche schlossen eine Kontrollgruppe mit unstimulierten Zellen mit ein. In dieser Arbeit wird der Fokus auf den Maustypvergleich (Vitamin-D-reich und -arm) gelegt, alleinige Konzentrationseffekte werden zusätzlich hinzugezogen. Die Daten wurden als Median und 25.-/75.-Perzentile angegeben. Gefüllte Kreise, Dreiecke und Quadrate bilden Vitamin-D-suffiziente Mikroglia, offene Kreise, Dreiecke und Quadrate repräsentieren Vitamin-D-defiziente Mikroglia. Die Lebensfähigkeit der Mikroglia wurde durch die Exposition gegenüber TLR-1/2-, -3-, -4- und -9-Agonisten nicht beeinflusst. Nach Stimulation der Gliazellen durch verschiedene TLR-Agonisten in Vitamin-D-armen und -reichen Zellüberstände zeigte sich eine von der Konzentration abhängige Zytokin- und Chemokinfreisetzung, geltend für alle TLR-Agonisten ($p < 0,05$; two-way ANOVA korrigiert mit Bonferroni für multiples Testen). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die getesteten Konzentrationen einen stimulierenden Effekt auf die Aktivität der Mikroglia haben. Die Stimulation Vitamin-D-defizienter Mikroglia durch TLR-Agonisten führt zu verminderter TNF-α and IL-6-Freisetzung verglichen zu Vitamin-D-suffizienter Mikroglia. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied in der CXCL-1-Freisetzung ausgemacht werden, obwohl die Konzentrationen dieses Chemokins hinsichtlich aller Dosen der TLR-Agonisten bei beiden Gruppen niedriger waren. Die Inkubation der Mikroglia mit Pam_3CSK_4 (TLR-1/2) mit den Konzentrationen von 1; 0,1 und 0,01 µg/ml resultierte in signifikant niedrigeren Konzentrationen von IL-6 in Vitamin-D-armen Zellen im Vergleich zur der Gruppe mit normalem Vitamin-D-Gehalt ($p < 0,05$; Abb. 7A; Seite 39). Auch bei niedrigeren Konzentrationen von Pam_3CSK_4 (TLR-1/2) 0,001 und 0,0001 µg/ml wurde weniger IL-6 von Vitamin-D-armer Mikroglia ausgeschüttet als von Vitamin-D-reicher. Dieser Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. Die Differenz der TNF-α-Freisetzung zwischen den beiden Gruppen nach Stimulation der Mikroglia mit verschiedenen Konzentrationen an Pam_3CSK_4 (TLR-1/2) war statistisch ebenfalls nicht signifikant (Abb. 7A; Seite 39). Das Resultat der Stimulation von Gliazellen mit 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 und 0,0001 µg/ml Poly(I:C) (TLR-3) zeigte signifikante Unterschiede in der IL-6-Freisetzung zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,05$; Abb. 7B; Seite 39). Hinsichtlich der TNF-α-Freisetzung nach Stimulation mit Poly(I:C) waren nur bei einer Konzentration von 1µg/ml statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu sehen ($p < 0,05$; Abb. 7B; Seite 39). Die Stimulation der Mikroglia Vitamin-D-haltiger Mäuse mit LPS (TLR-4)

zu den Konzentrationen 1; 0,1; 0,01 und 0,001 µg/ml führte zu einer signifikant höheren IL-6- Ausschüttung im Vergleich zur Vitamin-D-armen Mikroglia (Abb. 7C; Seite 39). Die TNF-α-Freisetzung nach Stimulation der Mikroglia mit LPS 1µg/ml war signifikant niedriger in Vitamin-D-armer Mikroglia. Die Resultate nach Stimulation mit LPS zu den Konzentrationen von 0,1; 0,01; 0,001 und 0,0001 µg/ml sind in Abbildung 7C (Seite 39) dargestellt. Die Stimulation der Mikroglia mit CpG (TLR-9) in den Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µg/ml führte zu einer signifikant höheren Freisetzung von IL-6 (Abb. 7D; Seite 39) und für die Konzentrationen 1 und 0,1 µg/ml auch zu signifikant höheren Mengen von TNF-α Freisetzung ($p<0.05$; Abb. 7D; Seite 39) in Vitamin-D-reicher Mikroglia.

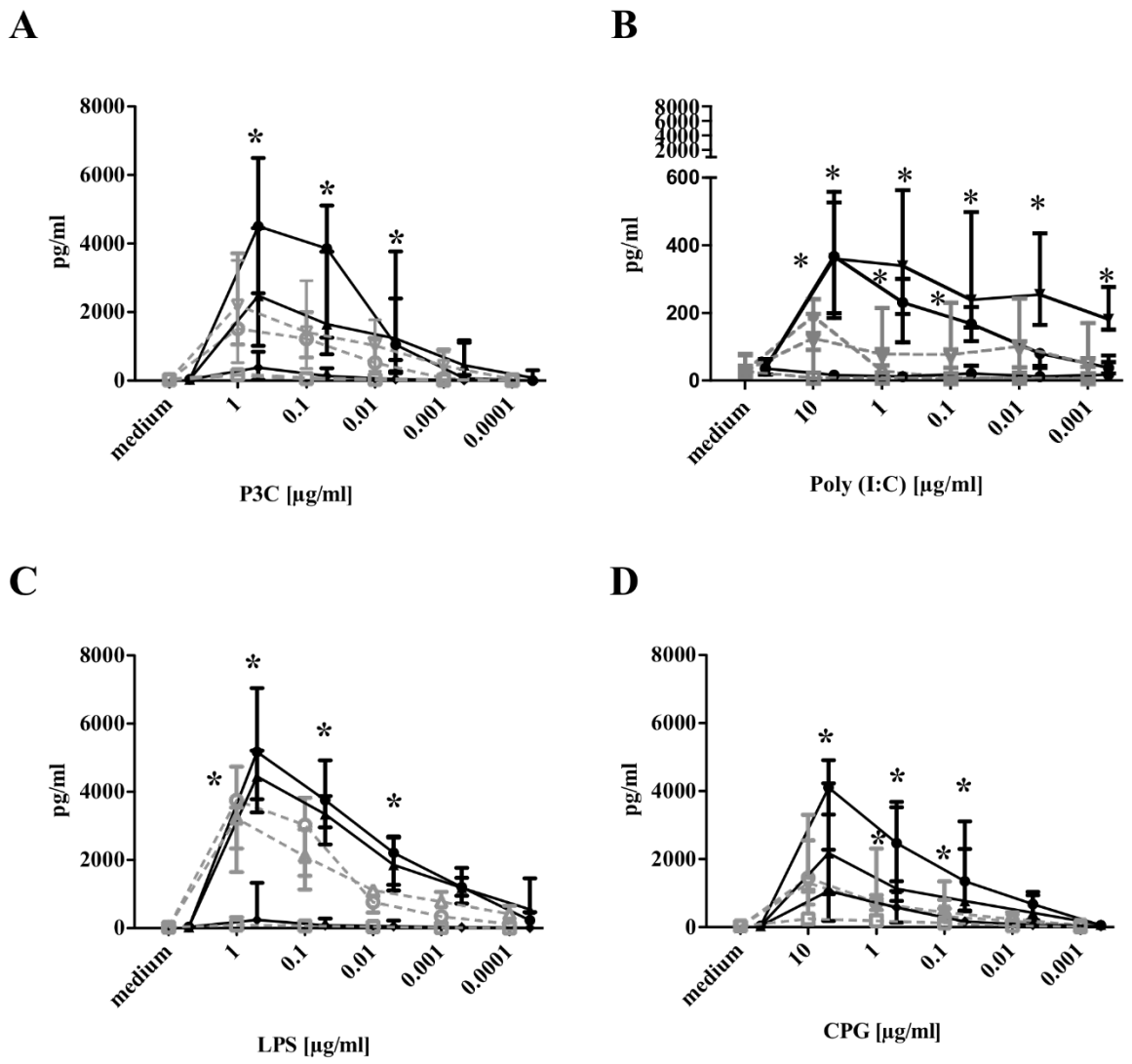

Abbildung 7 Zyto- und Chemokinfreisetzung unstimulierter und stimulierter Vitamin-D-suffizienter und -defizienter Mikroglia nach 24h Inkubation. Darstellung von Interleukin (IL)-6 (Kreise), Tumornekrosefaktor

(TNF)-α (Dreiecke) und Chemokine (C-X-C Motiv) und Ligand 1 (CXCL1) (Quadrate). A: Stimulation mit Pam_3CSK_4 ,B: Stimulation mit Poly(I:C), C: Stimulation mit LPS, D: Stimulation mit CPG. Ausgefüllte Kreise, Dreiecke und Quadrate stellen Vitamin-D-reiche Mikrogliazellen; leere Kreise, Dreiecke und Quadrate stellen Vitamin-D-arme Mikrogliazellen dar. Die statistisch signifikanten Unterschiede sind mit einem Stern markiert (Abbildung aus Publikation dieser Arbeit).

Die Interaktion in der jeweiligen Gruppe/Konzentration zwischen Vitamin-D-armen und reichen Zellkulturen sowie deren Zytokin- und Chemokinausschüttung hinsichtlich aller verwendeten TLR-Agonisten wurde in Tabelle 4 aufgeführt. Letztlich zeigte sich nur bei der Wechselwirkung nach CpG-Stimulation in der TNF-α und CXCL1-Ausschüttung unzureichende Signifikanz.

Stimulation	Zytokine/Chemokine	Konzentration	Wechselwirkung Gruppe Vitamin-D-suffizienz und -defizient/Konzentration
LPS	IL6	+	+
	TNF-α	+	+
	CXCL1	+	+
	Phagozytose	+	+

Stimulation	Zytokine/Chemokine	Konzentration	Wechselwirkung Gruppe Vitamin-D-suffizienz und -defizient/Konzentration
Pam_3CSK_4	IL6	+	+
	TNF-α	+	+
	CXCL1	+	+
	Phagozytose	+	-

Stimulation	Zytokine/Chemokine	Konzentration	Wechselwirkung Gruppe Vitamin-D-suffizienz und -defizient/Konzentration
Poly(I:C)	IL6	+	+
	TNF-α	+	+
	CXCL1	+	-
	Phagozytose	+	+

Stimulation	Zytokine/Chemokine	Konzentration	Wechselwirkung Gruppe Vitamin-D-suffizienz und -defizient/Konzentration
CpG	IL6	+	+
	TNF-α	+	-
	CXCL1	+	-
	Phagozytose	+	+

Tabelle 4 Ergebnistabelle der Phagozytoseraten anhand der Zyto- und Chemokinausschüttung nach Stimulation mit Toll- like Rezeptoren nach Anwendung der zweifaktoriellen Varianzanalyse. Signifikante Werte ($p < 0,05$) werden mit `+`, nicht signifikante ($p \geq 0,05$) mit `-`angegeben (eigene Darstellung).

3.1.3 Stickstoffmonoxid-Radikal-Freisetzung der Mikroglia

Einen Mechanismus, bei dem Vitamin D möglicherweise fähig ist, antimikrobielle Aktivität auszuüben, stellt die Abtötung von Bakterien mittels Stickstoffmonoxid dar (Kohchi et al.

2009). Der NO-Versuchsaufbau wurde in Abschnitt 2.2.8 (Seite 30) beschrieben. Pro Stimulanz wurden n = 21 Messungen durchgeführt. Wie aus bereits veröffentlichten Daten zu ersehen (Ebert S et al. 2005), induzieren hohe Konzentrationen an der TLR-Agonisten Pam_3CSK_4 (TLR-1/2), LPS (TLR-4) und CpG (TLR-9) die NO-Freisetzung aus Mikrogliazellen. Um die möglichen Mechanismen zu verstehen, inwiefern Vitamin-D-Mangel die intrazelluläre Abtötung von *E. coli* beeinflussen kann, wurde die Stickstoffmonoxid Freisetzung anhand hoher Konzentrationen der TLR-Agonisten untersucht. Es wurden diejenigen Konzentrationen ausgewählt, bei welchen gleichzeitig die höchsten Phagozytoseraten festgestellt werden konnten. Ein signifikanter Unterschied der NO-Freisetzung zwischen Vitamin-D-armen und -reichen Mikrogliazellen konnte nicht festgestellt werden.

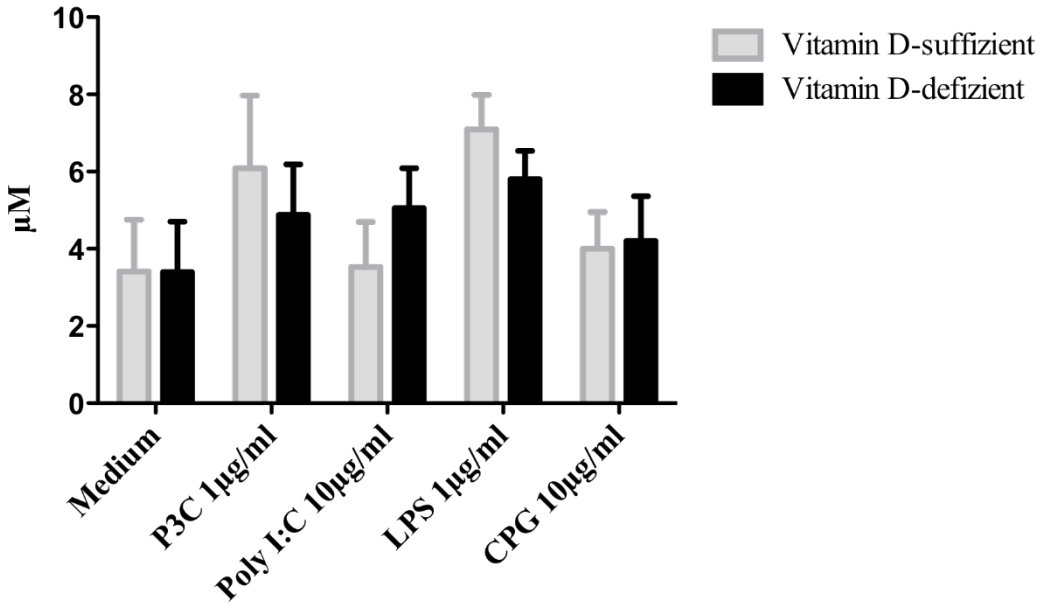

Abbildung 8 Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus der Mikroglia

Darstellung der NO-Freisetzung nach Stimulation mit hohen Konzentrationen von TLR-1/2-, -3-, -4- und -9-Agonisten. Der graue Balken stellt die Vitamin-D-reiche Gruppe, der schwarze Balken die Vitamin-D-arme Gruppe dar. Links in der Graphik ist die Kontrollgruppe (Medium) abgebildet (Abbildung aus Publikation dieser Arbeit).

Wie aus Abbildung 8 (Seite 42) ersichtlich wird, zeigt die NO-Freisetzung nach Stimulation mit hohen Konzentrationen von TLR-1/2-, -3-, -4- und -9-Agonisten keinen Unterschied zwischen Vitamin-D-defizienter und Vitamin-D-suffizienter Mikroglia. Die NO-Konzen-

trationen in den Überständen wurden mittels Mittelwert und Standardfehler angegeben. Eine Analyse der Daten erfolgte mit one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen. Danach konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Vitamin-D-suffizienter und -defizienter Mikroglia gezeigt werden.

3.1.4 Lebendzellzahl der Mikroglia

Die Konzentrationen der TLR-Agonisten, die in dieser Studie verwendet wurden, wiesen entgegen bisher veröffentlichter Daten keine Toxizität für Mikroglia auf. Stimulation von Mikroglia mit den höchsten Dosen an TLR-1/2-, -3-, -4- und -9-Agonisten resultierte nicht in einem verminderten Überleben dieser Zellen. Dies zeigte sich im Vergleich aller stimulierten und unstimulierten Gruppen.

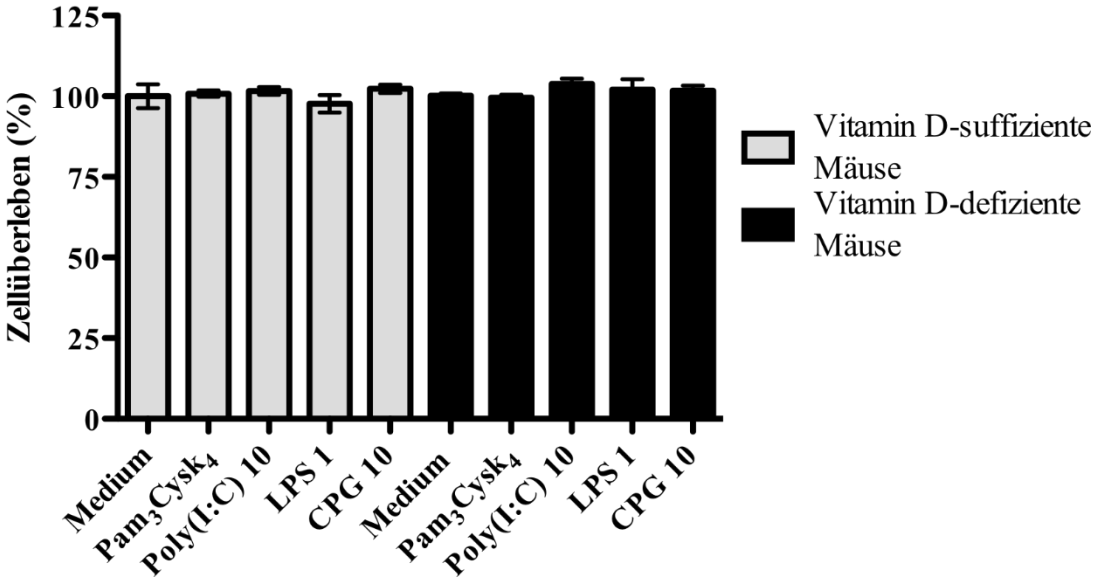

Abbildung 9 Lebendzellzahl Vitamin-D-suffizienter und Vitamin-D-defizienter Mikroglia

Graue Balken stellten Vitamin-D-reiche, schwarze Balken Vitamin-D-arme Gruppen nach Stimulation mit Pam_3CSK_4 1 µg/ml, Poly(I:C) 10 µg/ml, LPS 1 µg/ml und CPG 10 µg/ml (n = 4) dar. Zu Anfang steht jeweils die Kontrollgruppe (Medium) (Abbildung aus Publikation dieser Arbeit).

In Abbildung 9 (Seite 43) sind die Ergebnisse nach Behandlung mit Pam_3CSK_4 1 µg/ml, Poly(I:C) 10 µg/ml, LPS 1 µg/ml und CPG 10 µg/ml (n = 4) durch Median und Standardfehler graphisch dargestellt. Die Daten wurden mittels one-way ANOVA analysiert

und nach Bonferroni für multiples Testen korrigiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Tabelle 5 (Seite 44) stellt die einzelnen Ergebnisse in Zahlen dar.

Stimulanz	**Vitamin- D-suffizient**	**Vitamin- D-defizient**
Medium	100 ± 7,5%,	100 ± 1,5%;
Pam_3CSK_4 1 µg/ml	100,8 ± 1,9%,	99,5 ± 1,9%;
Poly(I:C) 10 µg/ml	101,7 ± 2,4%,	103,8 ± 3,2%;
LPS 1 µg/ml	97,7 ± 5,4%,	102,1 ± 6,4%;
CPG 10 µg/ml	102,3 ± 2,6%,	101,7 ± 3,1%.

Tabelle 5 Überlebensrate der Mikrogliazellen nach Stimulation

(Angabe in Median und Standardfehler, Abbildung aus Publikation dieser Arbeit).

4 Diskussion

Ausgangspunkte unserer Studie waren folgende Aspekte: die Induktion einer bakteriellen Meningitis durch *E. coli* unter Verwendung Vitamin-D-armer und –normalhaltiger Mikrogliazellen und deren Reaktion hinsichtlich Phagozytoserate, Zyto- und Chemokinausschüttung sowie NO-Freisetzung nach Stimulation mit TLR-Agonisten. Wir entschlossen uns, in dieser Studie das lebende gramnegative Bakterium *E. coli* zur verwenden, da auch bereits in der Vergangenheit eine Aktivierung der Mikroglia durch *E. coli* bestätigt werden konnte (Ribes et al. 2010). Die retrospektive Studie von Hoogland und Kollegen untersuchte Tierexperimente, durchgeführt von 1950 bis 2013, hinsichtlich der Reaktion von Mikrogliazellen bei entzündlichen Prozessen des Gehirns. Auch hier zeigte sich, dass lebende *E. coli*-Bakterien nach zwei Tagen, hitzegetötete Bakterien hingegen nach zwei Wochen zu einer Mikrogliaaktivierung führten (Hoogland et al. 2015). Ebenso wie das verwendete Bakterium stellt das Alter der Zellen einen wichtigen Faktor dar. Inzidenz und Mortalität einer bakteriellen Meningitis waren im Alter im Vergleich zu jüngeren Erwachsenen stark erhöht. Mikrogliazellen und Peritonealmakrophagen gealterter Mäuse phagozytierten weniger *E. coli* und setzten weniger NO, Zyto- und Chemokine frei als Zellen junger Mäuse. Dieses Ergebnis ließ sich sowohl ohne Aktivierung als auch nach Stimulation mit TLR-2-, -4- und -9-Agonisten reproduzieren (Schütze et al. 2014). Das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung bei einer systemischen entzündlichen Reaktion wird somit maßgeblich durch das Alter bestimmt (Hoogland 2015). So weist zum Beispiel Mikroglia des gealterten Gehirns eine höhere Expression proinflammatorischer Zytokine auf. Diese Veränderung führt zu einer verlängerten und verstärkten Immunantwort (Norden und Godbout 2013). In unserer Studie wurden Mikrogliazellen verwendet, die aus neugeborenen Mäusen gewonnen wurden. Die Gewinnung der Peritonealmakrophagen erfolgte aus den Elterntieren, welche einige Monate alt waren. Somit stehen die verwendeten Zellkulturen nicht unter dem Einfluss des Alters, sondern des Fehlens oder Vorhandenseins von Vitamin D. Um einen manifesten Vitamin-D-Mangel herbeizuführen, wurde die Ernährung der Mäuse in unserer Studie, wie oben beschrieben, mit Vitamin-D-armem und –normalhaltigem Futter durchgeführt. So konnten entsprechende Vergleichs-gruppen (Vitamin-D-suffizient, Vitamin-D-defizient) geschaffen werden, welche sich aufgrund der Ernährung nachweislich signifikant in ihrem Vitamin-D-Spiegel im Serum unterschieden. Die Serumkonzentration der biologisch aktiven Form des Vitamin D, $1,25(OH)_2$, wird hauptsächlich über die endokrine Regulation der 1α-Hydroxylase bestimmt

und wird nur bedarfsgerecht vom Körper synthetisiert. Einen direkten Rückschluss auf den Vitamin-D-Status erlaubt die Serumkonzentration des im Blut zirkulierenden Spiegels von 25(OH)D3, welcher insbesondere von Sonnenexposition und Ernährungszustand abhängig ist (Hewison 2012). Auch beim Menschen ist eine zu geringe Vitamin-D-Aufnahme mit der Nahrung ein Grund für einen manifesten Vitamin-D-Mangel. Dieser lässt sich ebenfalls laborchemisch mit hoher Sensitivität über den 25-Hydroxyvitamin-D-Serumspiegel nachweisen (Holick 2007). Die Ursache des Vitamin-D-Mangels ist hierdurch jedoch nicht bewiesen. So kann nicht nur eine mangelhafte Ernährung, sondern auch ungenügende UV-Exposition ursächlich für eine verminderte Vitamin-D-Produktion sein. In unserer Studie wurden die Versuchstiere in gleichem Maße Ultraviolettstrahlung ausgesetzt. Physiologisch kommt es im Rahmen der Immunantwort zur Stimulation von Mikrogliazellen durch TLR. Die Stimulation einer aktiven Immunantwort mit TLR-Agonisten stellt eine gängige und nachweislich valide Methode in der Untersuchung von verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen dar (Ebert et al. 2005). Insbesondere für LPS konnte eine erhöhte Aktivierung der Mikroglia nachgewiesen werden (Hoogland et al. 2015). Diese Methode wurde erstmals 1985 durch Isberg und Falkow an einer Zellkultur durchgeführt (Isberg und Falkow 1985). Damals wurden die phagozytierten Bakterien im Mikroskop gezählt. Ein Jahrzehnt später wurde die gleiche Methode mit primären Makrophagen durchgeführt und die Bakterien durch quantitatives Ausplattieren bestimmt (Segura et al. 1998). 2009 führten Ribes et al. diese Methode bei primären Mikrogliazellen ein. Bisher nahm man an, dass die Verwendung hoher Dosen von TLR-Agonisten zu einem vermehrten Zelluntergang führt. Ebert und Kollegen zeigten, dass -entgegen diesen Kenntnissen- aus Mäusen gewonnene Mikrogliazellen auch hohe Dosen der Stimulantien überleben können (Ebert et al. 2008). Auch in unserer Studie war die Überlebensrate der Mikrogliazellen nach Stimulation mit hohen Dosen an TLR-1/2-, -3-, -4- und -9-Agonisten nicht beeinträchtigt. Durch die in unserem Modell verwendeten Vitamin-D-defizienten Mikrogliazellen war es ebenso möglich, eine antibakterielle Aktivität von Vitamin D in physiologischen Konzentrationen nachzuweisen. Im Rahmen der Vitamin-D-Defizienz waren die Phagozytoserate und die intrazelluläre Abtötung von *E. coli* gleichbleibend oder teilweise sogar erniedrigt. Die Abtötungsrate des Bakteriums in Vitamin-D-defizienten Zellen erhöhte sich nachdem die Zellen mit TLR-1/2-, -3-, -4- und -9-Agonisten stimuliert wurden. Wir konnten zeigen, dass bei Vorliegen eines Vitamin-D-Mangels und trotz Stimulation mit hohen Dosen von TLR-1/2-, -3-, -4- und -9-Agonisten, die Fähigkeit der Mikrogliazellen reduziert ist, den Erreger zu phagozytieren und intrazellulär abzutöten. Für TLR-1/2-Agonisten und niedrigere

Konzentrationen der TLR-3-, -4- und -9-Agonisten war der Effekt des Vitamin D milde und die Unterschiede in der Phagozytoserate zwischen Vitamin-D-defizienten und -suffizienten Mikrogliazellen nach statistischer Korrektur für wiederholtes Testen individueller Konzentrationen nicht signifikant. Der Effekt war also abhängig von der Konzentration der Stimulantien. In vergangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bereits aktivierte Mikroglia das angeborene Immunsystem auf verschiedene Weise beeinflussen können. Auch wenn der genaue Mechanismus auf molekularer Ebene noch nicht abschließend erforscht ist, stellt sich heraus, dass Mikroglia sowohl neuroprotektiv als auch neurotoxisch wirken können (Hanisch und Kettenmann 2007). So erhöhte die Stimulation von Mikrogliazellen aus Mäusen mit TLR-1/2-, -3-, -4- und -9 Agonisten oder endogenen Liganden wie Fibronektin für TLR-4, die bakterielle Phagozytose und die intrazelluläre Tötung von Bakterien (Ribes et al. 2009; Ribes et al. 210; Ebert et al. 2005). Ein weiteres Beispiel für die Schlüsselfunktion der TLR im Rahmen der Immunabwehr des ZNS stellt die verstärkte Expression der TLR mRNA für TLR-2, -4 und -7 in Gehirnen junger C57BL/6-Mäuse bei der *E. coli*-Meningitis dar (Böttcher et al. 2003). Die Phagozytose hängt entscheidend vom TLR-Signalweg ab (Yates und Russell 2005). In Abwesenheit von TLR verschlechterte sich dementsprechend die Phagozytoserate von Bakterien in Phagosomen (Blander und Mezhitov 2004). Passend zu diesen Beobachtungen konnten auch wir in dieser Arbeit bestätigen, dass die Stimulation mit TLR-Agonisten zu einer erhöhten Phagozytoserate führte. Zuvor konnten Redlich et al. ebenso zeigen, dass die Stimulation von Mikrogliazellen mit TLR-Agonisten-1/2, -3, -4 und -9 die Phagozytose von *Cryptococcus neoformans* erhöhte (Redlich et al. 2013). Sind Bakterien einmal in Phagolysosomen eingeschlossen und reaktiven Sauerstoffspezies oder anderen bakteriotoxischen Komponenten ausgesetzt, unterliegen sie der bakteriellen Lyse. Ebert et al. zeigten, dass die Stimulation der Mikroglia mit TLR-Agonisten dosisabhängig ist. Außerdem ist eine effiziente Phagozytoserate reaktiver Mikrogliazellen nicht nur von der Menge aufgenommener Bakterien abhängig, sondern auch von ihrer Fähigkeit, phagozytotische Signale zu modulieren (Ebert et al. 2005). In unserer Arbeit konnte ebenfalls ein dosisabhängiger stimulierender Effekt auf die Phagozytose nachgewiesen werden. Weiterhin untersuchten wir die NO-Freisetzung in Vitamin-D-defizienten und –suffizienten Mikrogliazellen nach Stimulation mit TLR-Agonisten. In unserer Studie konnte kein Unterschied zwischen Vitamin-D-defizienten und -suffizienten Mikrogliazellen in Bezug auf die NO-Freisetzung, nachdem diese Zellen mit hohen Konzentrationen von TLR-Agonisten stimuliert wurden, festgestellt werden. In vorangehenden Studien konnte gezeigt

werden, dass Mikrogliazellen auf bakterielle und endogene Stimulantien mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Stickoxid-Radikale (NO) reagierten (Iliev et al. 2004; Ebert et al. 2005; Lotz et al. 2005). Diese Erkenntnis stützt sich auf das Ergebnis einer Studie von Garcion et al.. Der aktive Metabolit 1,25$(OH)_2$D unterdrückte in neuronalen Zellen das zur NO-Erzeugung notwendige Enzym Sticksoffmonoxid-Synthase (iNOS) (Garcion et al. 1997). Auch Hur et al. konnten nachweisen, dass Vitamin-D die NO-Freisetzung aktivierter Mikroglia hemmt und somit wahrscheinlich den potentiell neurotoxischen Effekt der Immunantwort verringert. Diese Erkenntnisse führte man auf die LPS-induzierte Hemmung der 1α-Hydroxylase und VDR zurück (Hur et al. 2014). Auch in unserer Studie wurde die Stimulation mit LPS durchgeführt, führte jedoch zu einem ausbleibenden Effekt der NO-Produktion. Wie in der Einleitung bereits dargelegt, sind Mikrogliazellen professionelle intrinsische Antigen-präsentierende Zellen im ZNS und spielen bei der Rekrutierung von Leukozyten in das Gehirn eine wichtige Rolle. Dies geschieht beispielsweise durch die Freisetzung von Zytokinen (Kettenmann et al. 2011). Bei der Betrachtung der einzelnen Konzentrationen der Zytokinausschüttung nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten konnten wir teilweise einen signifikanten Unterschied in der Ausschüttung zwischen Vitamin-D-suffizienter und –defizienter Mikroglia feststellen. Obwohl nicht alle einzelnen Konzentrationen einen statistisch signifikanten Unterschied zeigten, setzten die Vitamin-D-defizienten Mikroglia, mit Ausnahme von CXCL-1, generell eine kleinere Menge an Zytokinen und Chemokinen nach Stimulation mit TLR-Agonisten frei, als die Vitamin-D-suffiziente Gruppe. Somit scheint ein Vitamin-D-Mangel in unserem Modell der bakteriellen Meningitis eher einen hemmenden Einfluss auf die Immunabwehr zu nehmen. In jüngster Vergangenheit konnte in In-vitro-Studien gezeigt werden, dass aktivierte Mikroglia unter dem Einfluss von Vitamin-D die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-12 und TNF-α reduzieren und die Expression von IL-10 erhöhen. Hierdurch könnte es zur Abschwächung der immunvermittelten Schädigung des zentralen Nervensystems kommen (Boontanart et al. 2016). Unsere Studienergebnisse lassen sich daher mit der momentanen Studienlage nur teilweise vereinbaren, da Vitamin-D-suffiziente Mikroglia höhere Mengen an Zytokinen freisetze. Das Vitamin-D könnte somit eine justierende Rolle in der Immunantwort des zentralen Nervensystems einnehmen. Um diesbezüglich eine genauere Aussage treffen zu können, müssten weitere Studien folgen, in denen oben genannte Daten reproduziert werden können. Gertig und Hanisch fassten die Vielfalt der Mikroglia zusammen. Sie hielten fest, dass eine Dysregulation der mikroglialen Zytokinproduktion auch neurotoxisch auf die

Neuronen wirken kann (Gertig und Hanisch 2014). Weiterhin zu beachten ist allerdings, dass die Reaktion der Mikroglia nach Stimulation und die daraufhin folgende Zytokin- und Chemokinausschüttung von verschiedenen Faktoren abhängt. So ist die Reaktion je nach Art des Bakteriums (grampositiv oder gramnegativ) und den herrschenden Umweltbedingungen, wie zum Beispiel reduzierte oder normale Vitamin-D-Versorgung, unterschiedlich (Häusler et al. 2002). Eine Aussage insbesondere in Hinsicht auf die Immunreaktion bei Stimulierung durch grampositive Bakterien kann in unserer Studie nicht getroffen werden. In unserer Studie wurde die Stimulation der Mikroglia mit dem gramnegativen Bakterium *E. coli* durchgeführt. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das möglicherweise unterschiedliche Ansprechen der Zellen auf Vitamin D in In-vitro und In-vivo Studienmodellen (Peelen et al. 2011). Die Ergebnisse unserer Studie beziehen sich ausschließlich auf In-vitro Mausmodelle. Obwohl einige Studien die epidemiologische Assoziation zwischen Vitamin-D-Mangel und infektiösen Erkrankungen gezeigt haben, kann diesbezüglich laut Kearns et al. bisher keine valide Aussage getroffen werden. Im Gegensatz zur Behandlung der Osteoporose ist daher ein möglicher therapeutischer Effekt der Behandlung mit Vitamin-D bei infektiösen Erkrankungen derzeit noch nicht abschließend belegt (Kearns et al. 2015). Laut dieser retrospektiven Studie beeinflussen Faktoren wie eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Studienmodellen und individuelles Ansprechen des Organismus auf Vitamin-D die Ergebnisse. Mit steigender Resistenzrate der Bakterien ist es notwendig, die Entwicklung von Strategien zur Bekämpfung bakterieller Infektionen voranzutreiben. Eine Möglichkeit bestünde daher in einer kontrollierten Vitamin-D Substitution. Denn um eine adäquate Immunreaktion des Körpers zu gewährleisten, ist nach Ergebnissen aus unserem In-vitro-Modell eine ausreichende Serumkonzentration an Vitamin D notwendig. Bisher konnte durch In-vitro-Studien belegt werden, dass Vitamin D die Barrierefunktion der Epithelzellen, zum Beispiel in Lunge oder Gastrointestinaltrakt, aufrechterhält sowie die Einwanderung von Immunzellen fördert und somit die Immunantwort adäquat regulieren kann (Schwalfenberg 2010). Vitamin D übt seine biologische Funktion aber nicht nur durch die Beeinflussung zellulärer Prozesse aus, sondern auch durch die Beeinflussung der Genexpression (Deluca et al. 2015).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist untersucht worden, ob eine orale Vitamin-D-Supplementierung zu einer erhöhten Infektionsresistenz des Gehirns gegenüber *E. coli*-Infektionen in vitro führt. Im in-vitro-Modell der bakteriellen Meningitis wurde die Wirkung von Vitamin D3 auf die Phagozytoserate, intrazelluläre Abtötung von Erregern und Immunantwort der Mikrogliazellen nach Stimulation der Mikrogliazellen mit TLR-Agonisten untersucht. In Zusammenschau der Ergebnisse führt ein Mangel an Vitamin D bei Mikrogliazellen zu einer herabgesetzten Phagozytose und verminderten Abtötungsrate des Erregers. Liegt Vitamin D hingegen in ausreichender Konzentration vor, so kann vermutlich eine antibakterielle Wirkung erzielt werden. Durch Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten erhöhte sich die Phagozytose und intrazelluläre Abtötung von *E. coli K1* in Mikrogliazellen. Dieser Prozess kann wiederum unter Vitamin-D-defizienten Bedingungen negativ beeinflusst werden, resultierend in einer verminderten Phagozytose und intrazellulären Tötungsrate von Bakterien. Somit hängt die Immunreaktion des angeborenen Immunsystems auch von der Vitamin-D-Konzentration im Organismus ab. Hinsichtlich der NO-Freisetzung gab es in unserem In-vitro-Modell keinen signifikanten Unterschied unter Vitamin-D-suffizienten und –armen Bedingungen, sodass wir hierzu keine positive oder negative Wirkung des Vitamin D feststellen können. Der Vitamin-D-Mangel beeinflusste aber das Ausmaß der Zyto- und Chemokinfreisetzung der Mikrogliazellen während einer *E. coli*-Infektion. So wurden nach Stimulation mit TLR-Agonisten weniger Zyto- und Chemokine von Vitamin-D-defizienten Zellen ausgeschüttet als von suffizienten Zellen. Somit wird unter Vitamin-D-Mangel die Effektivität der erworbenen Immunreaktion des zentralen Nervensystems gesenkt und die Chemokinausschüttung während einer Entzündungsreaktion beeinflusst. In unseren in-vitro Untersuchungen wurde erstmals demonstriert, dass Vitamin-D-Mangel die Fähigkeit der Mikrogliazellen des Gehirns reduziert, Bakterien zu phagozytieren und intrazellulär abzutöten. Somit konnte sie die ungünstige Rolle von Vitamin-D-Mangel bei Infektionen des ZNS durch den gramnegativen Erreger *E. coli* gezeigt werden.

6 Veröffentlichung

Paper:

Djukic M, **Onken ML**, Schütze S, Redlich S, Götz A, Hanisch UK, Bertsch T, Ribes S, Hanenberg A, Schneider S, Bollheimer C, Sieber C, Nau R (2014): Vitamin d deficiency reduces the immune response, phagocytosis rate, and intracellular killing rate of microglial cells. Infect Immun. 82(6):2585-94

7 Literaturverzeichnis

Adams JS, Hewison M (2008): Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 4, 80-90

Adorini L, Penna G (2008): Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. Nat Clin Pract Rheumatol 4, 404-412

Akira S, Uematsu S, and Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124, 783-801

Aloia JF, Li- Ng M (2007): Epidemic influenza and vitamin D. Epidemiol Infect 135, 1095-1096

Aloisi F (2001): Immune Function of Microglia. Glia 36, 165-179

Annweiler C, Schott AM, Berrut G, Chauvire V, Le Gall D, Inzitari M, Beauchet O (2010): Vitamin D and Ageing: Neurological Issues. Neuropsychobiology 62,139–150

Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR (2007): Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. J. Neuroimmune Pharmacol 2, 297–312

Bacterial Meningitis. Available at: http://www.who.int/nuvi/meningitis/en/. Accessed 30.10.2013

Belhohradsky BH, Weiß M: Infektionskrankheiten. In: Koletzko B (Hrsg.): Kinder- und Jugendmedizin. 13. Auflage; Springer Verlag, München 2007, 199-240

Bergman P, Norlin AC, Hansen S, Rekha RS, Agerberth B, Björkhem-Bergman L, Ekström L, Lindh JD, Andersson J (2012): Vitamin D3 supplementation in patients with frequent respiratory tract infections: a randomised and double-blind intervention study. BMJ Open 2(6), pii: e001663

Blander JM1, Medzhitov R (2004): Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. Science 304, 1014-8

Boontanart M, Hall SD, Spanier JA, Hayes CE, Olson JK (2016): Vitamin D3 alters microglia immune activation by an IL-10 dependent SOCS3 mechanism. J Neuroimmunol 292, 126-36

Böttcher T, von Mering M, Ebert S, Meyding-Lamade U, Kuhnt U, Gerber J, Nau R (2003): Differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in experimental murine central nervous system infections. Neurosci Lett 344, 17-20

Brown J, Bianco JI, McGrath JJ, Eyles DW (2003): 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. Neurosci Lett 343, 139–143

Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002): Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 61, 1013-1021

Cabellos C, Verdaguer 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(2), 115-9

Chowdhury R[1], Kunutsor S, Vitezova A, Oliver-Williams C, Chowdhury S, Kiefte-de-Jong JC, Khan H, Baena CP, Prabhakaran D, Hoshen MB, Feldman BS, Pan A, Johnson L, Crowe F, Hu FB, Franco OH (2014): Vitamin D and risk of cause specific death: systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies. BMJ 348: g1903

Deluca GC, Kimball SM, Kolasinski J, Ramagopalan SV, Ebers GC (2013): The Role of Vitamin D in Nervous System Health and Disease. Neuropathol Appl Neurobiol. 39(5), 458-84

DGN (2015): S2k-Leitlinie Ambulant erworbene bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter. Hrsg. v. der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 07.10.2018)

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005): Vitamin D. Am J Physiol Renal Physiol. 289, F8-F28

Ebert S, Gerber J, Bader S, Mühlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dosedependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. J Neuroimmunol 159, 87-96

Engelhardt C, Cosine 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(1), 4

Evans KN, Nguyen L, Chan J, Innes BA, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M (2006): Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells. Biol Reprod 75, 816–822

Evatt ML, DeLong MR, Khazai N, Rosen A, Triche S (2008): Prevalence of vitamin d insufficiency in patients with Parkinson disease and Alzheimer disease. Arch Neurol. 65, 1348–1352

Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. (2005): Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. J Chem Neuroanat. 29, 21–30

Flicker L, MacInnis RJ, Stein MS, Scherer SC, Mead KE, Nowson CA, Thomas J, Lowndes C, Hopper JL, Wark JD (2005): Should older people in residential care receive vitamin D to prevent falls? Results of a randomized trial. J Am Geriatr Soc 53, 1881–8

Garcion E, Nataf S, Berod A, Darcy F, Brachet P (1997): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. Brain Res Mol Brain Res. 45, 255-67

Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D (2002): New clues about vitamin D functions in the nervous system. Trends Endocrinol Metab 13, 100-105

Gavazzi G, Krause KH (2002): Ageing and infection. Lancet Infect Dis 2(11), 659-66

Gerber J, Nau R (2010): Mechanisms of injury in bacterial meningitis. Curr Opin Neurol 23, 312-318

Gertig U, Hanisch UK (2014): Microglial diversity by responses and responders. Front Cell Neurosci 8, 101

Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP (2005): Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. FASEB J 19, 1067–1077

Gombart AF, Saito T, Koeffler HP (2009): Exaptation of an ancient Alu short interspersed element provides a highly conserved vitamin D-mediated innate immune response in humans and primates. BMC Genomics 10, 321

Guillemin GJ, Brew BJ (2004): Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. J Leukoc Biol 75, 388-397

Hanisch UK, Kettenmann H (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nature Neurosci 10, 1387–1394

Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002): Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. Eur J Neurosci 16, 2113-2122

Herold G: Innere Medizin 2012. Gerd Herold (Verlag), Köln 2011

Hewison M (2011a): Antibacterial effects of vitamin D. Nat Rev Endocrinol 7, 337-45

Hewison M (2011b): Vitamin D and innate and adaptive immunity. Vitam Horm 86, 23-62

Hewison M (2012): Vitamin D and immune function: an overview. Proc Nutr Soc 71, 50-61

Holick MF (2006): High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. Mayo Clin Proc. 81, 353-73

Holick MF (2007): Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 357, 266-81

Hofmann O, Weber JR (2009): Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. Ther Adv Neurol Disord 2(6), 401-412

Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beeck D (2015): Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. J Neuroinflammation 6(12), 114

Hufschmidt A, Lücking CH, Rauer S (2009): Neurologie compact. 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009

Hur J, Lee P, Kim MJ, Cho YW (2014): Regulatory Effect of 25- hydroxyvitamin D3 on Nitric Oxide Production in Activated Microglia. Korean J Physiol Pharmacol. 18(5): 397-402

Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR-9). FASEB J 18, 412-414

Isberg RR, Falkow S (1985): A single genetic locus encoded by Yersinia pseudotuberculosis permits invasion of cultured animal cells by Escherichia coli K-12. Nature 317(6034), 262-4

Janssens W, Bouillon R, Claes B, Carremans C, Lehouck A, Buysschaert I, Coolen J, Mathieu C, Decramer M, Lambrechts D (2010): Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D- binding gene. Thorax 65, 215-220

Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE et al. (2009): Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. J Transl Med 7, 28

Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C, Salmasi G, and Armstrong D (2004): Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. Cerebrospinal Fluid Res 1, 2

Kalueff AV, Tuohimaa P (2007): Neurosteroid hormone vitamin D and its utility in clinical nutrition. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 10,12–19

Kamphuis LS, Bonte-Mineur F, van Laar JA, van Hagen PM, van Daele PL (2014): Calcium and vitamin D in sarcoidosis: is supplementation safe?. J Bone Miner Res 29(11), 2498-503

Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. Cell Death Differ 13, 816-825

Kearns MD, Alvarez J, Seidel N, Tangpricha V (2015): The impact of vitamin D in infectious disease: a systematic review of controlled trials. Am J Med Sci 349(3), 245-262

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011): Physiology of microglia. Physiol Rev 91(2), 461-553

Kim KS (2000): E. coli invasion of brain microvascular endothelial cells as a pathogenetic basis of meningitis. Subcell Biochem 33, 47-59

Kim KS (2003): Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. Nature reviews. Nature Reviews Neuroscience 4, 376-385

Koedel U, Klein M, Pfister H-W (2010): New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. Curr Opin Infect Dis 23, 217-223

Koedel U, Rupprecht T, Angele B, Heesemann J, Wagner H, Pfister H, Kirschning CJ (2004): MyD88 is required for mounting a robust host immune response to Streptococcus pneumoniae in the CNS. Brain 127, 1437-1445

Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, Soma G (2009): ROS and innate immunity Anticancer Res. 29, 817-21

Lagishetty V, Misharin AV, Liu NQ, Lisse TS, Chun RF, Ouyang Y, McLachlan SM, Adams JS, Hewison M (2010): Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis. Endocrinology 151, 2423–2432

Langub MC, Herman JP, Malluche HH, Koszewski NJ (2001): Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus. Neuroscience. 104, 49–56

Littlejohns TJ, Henley WE, Lang IA, Annweiler C, Beauchet O, Chaves P, Fried L, Kestenbaum BR, Kuller LH, Langa KM et al. (2014): Vitamin D anf the risk of dementia and Alzheimer disease. Neurology 83(10), 920-928

Lotz M, Ebert S, Esselmann H, Iliev AI, Prinz M, Wiazewicz N, Wiltfang J, Gerber J, Nau R (2005): Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of Toll-like receptor-2 and -4 agonists but antagonizes Toll-like receptor-9-induced inflammation in primary mouse microglial cell cultures. J Neurochem 94(2), 289-98

Marrie TJ (2000): Community-acquired pneumonia in the elderly. Clin Infect Dis 31, 1066-1078

Masuhr KF, Neumann M: Duale Reihe Neurologie. 6. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2013

Mofredj A, Guerin JM, Leibinger F, Mamoudi R (2000): Spontaneous Escherichia coli meningitis in an adult. Scand J Infect Dis 32, 699-700

Moran LB, Duke DC, Graeber MB (2007): The microglial gene regulatory network activated by interferon-gamma. J Neuroimmunol 183, 1-6

Muzio M, Mantovani A (2001): Toll-like receptors. Microbes Infect 3, 251-255

Nagpal S, Na S, Rathnachalam R (2005): Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. Endocr Rev 26, 662-87

Nau R (2005): Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of Toll-like receptor-2 and -4 agonists but antagonizes Toll-like receptor-9 induced inflammation in primary mouse microglial cell cultures. J. Neurochem 94, 289-298

Nau R, Brück W (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. Trends Neurosci 25, 38-45

Nau R, Djukic M, Spreer A, Eiffert H (2013): Bacterial meningitis: new therapeutic approaches. Expert Rev Anti Infect Ther 11(10), 1079-95

Niederkorn JY (2006): See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. Nat Immunol 7, 354-359

Norden DM, Godbout JP (2013): Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. Neuropathol Appl Neurobiol 39(1), 19-34

Nowson CA, Margerison C (2002): Vitamin D intake and vitamin D staus of Australians. Med J Aust 177(3), 149-52

Olliver M, Spelmink L, Hiew J, Meyer-Hoffert U, Henriques-Normark B, Bergman P (2013): Immunomodulatory Effects of vitamin D on Innate and Adaptive Immune Responses to Streptococcus pneumoniae. J Infect Dis 208(9), 1474-81

Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J (2011): Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immunesystem: a review. Autoimmun Rev 10, 733-43

Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT (2013): Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. Mediators Inflamm

Redlich S, Ribes S, Schütze S, Eiffert H, Nau R (2013): Toll-like receptor stimulation increases phagocytosis of Cryptococcus neoformans by microglial cells. J Neuroinflammation 10, 71

Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (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, Adam N, Ebert S, Regen T, Bunkowski S, Hanisch U, Nau R (2010a): The viral TLR3 agonist poly(I:C) stimulates phagocytosis and intracellular killing of Escherichia coli by microglial cells. Neurosci Lett 482, 17-20

Ribes S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch UK, et al. (2010b): Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated Streptococcus pneumoniae by murine microglia. Infect Immun 78, 865-871

Ribes S, Ebert S, Regen T, Czensink D, Scheffel J, Zeug A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (2010c): Fibronectin Stimulates Escherichiia coli Phagozytosis by Microglial Cells. Glia 58, 367-376

Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2015 (Datenstand 1. März 2016). Berlin 2016

Robert Koch-Institut: Antworten des Robert Koch-Instituts auf häufig gestellte Fragen zu Vitamin D (Stand 25.1.2019)

Russo TA, Johnson JR (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes Infect 5, 449-456

Salahuddin N, Ali F, Hasan Z, Rao N, Aqeel M, Mahmood F (2013): Vitamin D accelerates clinical recovery from tuberculosis: results of the SUCCINCT Study [Supplementary Cholecalciferol in recovery from tuberculosis]. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of vitamin D supplementation in patients with pulmonary tuberculosis'. BMC Infect Dis 19(13), 22

Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW (2002): Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. J Infect Dis 186, 225-33

Schütze S, Loleit T, Zeretzke M, Bunkowski S, Brück W, Ribes S, and Nau R (2012): Additive microglia-mediated neuronal injury caused by amyloid-β and bacterial TLR agonists in murine neuron-microglia co-cultures quantified by an automated image analysis using cognition network technology. J Alzheimers Dis 31, 651-657

Schütze S, Ribes S, Kaufmann A, Manig A, Scheffel J, Redlich S, Bunkowski S, Hanisch UK, Brück W, Nau R (2014): Higher mortality and impaired elimination of bacteria in aged mice after intracerebral infection with E. coli are associated with an age-related decline of microglia and macrophage functions. Oncotarget. 5(24), 12573-92

Schwalfenberg GK (2010): A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. Mol Nutr Food Res. 55(1), 96-108

Segura MA, Cléroux P, Gottschalk M (1998): Streptococcus suis and group B Streptococcus differ in their interactions with murine macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol 21, 189195

Simard AR, Rivest S (2005): Do pathogen exposure and innate immunity cause brain diseases? Neurol Res 27, 717–725

Spina CS, Tangpricha V, Uskokovic M, Adorinic L, Maehr H, Holick MF (2006): Vitamin D and cancer. Anticancer Res 26, 2515-24

Sudarsky L (2001): Gait disorders: prevalence, morbidity, and etiology. Adv Neurol 87, 111-117

Tauber SC, Ebert S, Weishaupt JH, Reich A, Nau R, Gerber J (2009): Stimulation of Toll-like receptor 9 by chronic intraventricular unmethylated cytosine-guanine DNA infusion causes neuroinflammation and impaired spatial memory. J Neuropathol Exp Neurol 68, 1116-1124

Van de Beeck D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M (2004): Clinical Features and Prognostic Factorss in Adults with Bacterial Meningitis. N Engl J Med 351, 1849-1859

Van der Aar AM, Picavet DI, Muller FJ, de Boer L, van Capel TM, Zaat SA, Bos JD, Janssen H, George TC, Kapsenberg ML, van Ham SM, Teunissen MB, de Jong EC (2013): Langerhans cells favor skin flora tolerance through limited presentation of bacterial antigens and induction of regulatory T cells.J Invest Dermatol. 133(5), 1240-9

Wang Y, Chiang YH, Su TP, Hayashi T, Morales M, Hoffer BJ, Lin SZ (2000): Vitamin D 3 attenuates cortical infarction induced by middle cerebral arterial ligation in rats. Nuropharmacology 39, 873–880

Watkins RR1, Yamshchikov AV, Lemonovich TL, Salata RA (2011): The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. J Infect. 63(5), 321-6

Wergeland S, Torkildsen Ø, Myhr KM, Aksnes L, Mørk SJ, Bø L (2011): Dietary vitamin D3 supplements reduce demyelination in the cuprizone model. PLoS One 6(10), e26262

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2002a): Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. J Immunol 169, 6668-6672

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, et al. (2002b): Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature 420, 324-329

Yates RM, Russell DG (2005): Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. Immunity 23(4), 409-17

Yim S, Dhawan P, Ragunath C, Christakos S, Diamond G (2007): Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D (3). J Cyst Fibros 6, 403–410

Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D (2008): Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1alpha-hydroxylase knockout mice. Kidney Int. 74,170-9

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 TLR-Signaltransduktion in der immunkompetenten Zelle des Subarachnoidalraums (eigene Abbildung) 7
Abbildung 2 Ausplattieren der Wellnäpfe (eigene Abbildung) 29
Abbildung 3 Schema der NO-Messung (eigene Abbildung) 31
Abbildung 4 Ausplattieren der Homogenate (eigene Abbildung) 32
Abbildung 5 25-OH-Vitamin- D3-Konzentration im Mausserum 34
Abbildung 6 Phagozytose eines *E. coli*-K1-Stamms durch Mikroglia nach 24 h Vorstimulation 37
Abbildung 7 Zyto- und Chemokinfreisetzung 39
Abbildung 8 Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus der Mikroglia 42
Abbildung 9 Lebendzellzahl Vitamin-D-suffizienter und Vitamin-D-defizienter Mikroglia 43

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammensetzung des Vitamin- D3 armen Futters. 23
Tabelle 2 Zusammensetzung des regulären Tierfutters 24
Tabelle 3 Intrazelluläre Abtötung von *E. coli* K1 durch Vitamin-D-suffiziente (D+) und Vitamin-D-defiziente (D-) Mikroglia. 35
Tabelle 4 Ergebnistabelle der Phagozytoseraten anhand der Zyto- und Chemokinausschüttung 41
Tabelle 5 Überlebensrate der Mikrogliazellen nach Stimulation 44

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid beta
ANOVA	*Analysis of variance*
ANOVA 2way	*Two way analysis of variance*
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BSA	*Bovine serum albumin* (Rinderserumalbumin)
CFU	*Colony forming unit*
CpG	*Oligonucleotides containing unmethylated cytosine- guanosin motifs*
CXCL-1	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1
dest.	destilliert
DMEM	*Dulbecco's-modified-eagle-medium*
E. coli	*Escherichia coli*
ELISA	*Enzyme-linked-immunosorbent-assay* (Enzymimmunoassay)
FCS	*Fetal-calf-serum* (Fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HRP	*Horse radish peroxidase* (Meerrettichperoxidase)
H. influenzae	*Haemophilus influenzae*
i.c.	intrazerebral
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KC	*Keratinocyte-derived chemokine*
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharidase
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min.	Minute
MyD88	*Myeloid differentiation factor 88*

NaCl	Natriumchlorid
NFkB	Nuklearfaktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NT- 3	Neurotrophin 3
N. meningitidis	*Neisseria meningitidis*
Ompa	*Outer membrane protein A*
PAMP	*Pathogen-associated-molecular-pattern*
Pam_3CSK_4	Tripalmitoyl- Cystein
PBS	*Phosphate-buffered-saline*
Poly (I:C)	Polyinosin-Polycytidyl-Säure
PRR	*Pathogen recognition receptors*
RNI	*Reactive nitrogen intermediates*
ROS	*Reactive oxygen species*
PS	Penicillin + Streptomycin
s	Sekunde
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
S. pneumoniae	*Streptococcus pneumoniae*
SAR	Subarachnoidalraum
TGFβ	*Transforming growth factor beta*
TLR	*Toll-like-receptor*
TNFα	Tumornekrose-Faktor-alpha
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Marija Djukic für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation. Sowohl während der experimentellen Phase als auch während des Verfassens und der Korrektur stand sie mir stets zur Seite. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. med. Nau für die wissenschaftliche Beratung und konstruktive Ratschläge danken.

Zuletzt möchte ich dem gesamten wissenschaftlichen Team für die Hilfsbereitschaft, Geduld und Unterstützung danken. Insbesondere gilt mein Dank auch der Statistikabteilung für die geduldige Hilfe bei der Auswertung meiner Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 14.03.1988 wurde ich, Marie Luise Onken, in Würzburg geboren. Nach Besuch der Grundschule wechselte ich auf das Kaiser- Heinrich Gymnasium in Bamberg, um dort im Jahr 2007 das Abitur abzulegen. In dem darauffolgenden Jahr absolvierte ich mehrere Famulaturen und Praktika in medizinischen Bereichen. Das Studium der Humanmedizin begann ich zum Wintersemester 2008/09 an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Nach 3 Jahren setzte ich das Studium an die Georg-August-Universität Göttingen fort. Während des Studiums leistete ich Famulaturen in der Gynäkologie, der Unfall- und Handchirurgie sowie Orthopädie, der Anästhesie, der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, der Radiologie und Strahlentherapie, der Allgemeinmedizin und der Plastischen-, Rekonstruktiven- und Verbrennungschirurgie in Deutschland und Italien ab. Im Praktischen Jahr belegte ich das Wahlfach der Radiologie. Einen Teil des praktischen Jahres absolvierte ich an der Universtät Ruhuna in Sri Lanka (Chirurgie) und dem Kantonsspital Luzern (Innere Medizin). Während des Studiums arbeitete ich als operative Assistentin in der Abteilung der Viszeral- und der Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen. Im November 2014 legte ich das Staatsexamen in Regelstudienzeit ab. Anschließend arbeitete ich als Assistenzärztin der Unfallchirurgie im Evangelischen Krankenhaus Weende Göttingen und wechselte nach Erhalt des Common Trunk im April 2017 in der Abteilung für Plastische-, Ästhetische- und Handchirurgie der Zitha-Klinik in Luxemburg. Im Februar 2018 setzte ich meine Ausbildung zur Fachärztin in der Plastischen- Rekonstruktiven und Handchirurgie der Asklepios Klinik Harburg fort. Mit den Vorbereitungen meiner Experimente begann ich im Juli 2012 und konnte im darauffolgenden Jahr den experimentellen Teil dieser Arbeit abschließen.