

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Vergleich des Verlaufes bakterieller Infektionen des zentralen
Nervensystems bei alten und jungen Mäusen am Beispiel der
Escherichia coli- und *Streptococcus pneumoniae*-Meningitis**

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von
Anja Manig
aus
Leipzig
Göttingen 2014

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

I. Berichterstatterin: PD Dr. med. S. Schütze

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Weig

Tag der mündlichen Prüfung: 01.04.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Bakterielle Infektionen im Alter.....	1
1.2 Pathophysiologie bakterieller ZNS-Infektionen.....	3
1.3 Altersbedingte Veränderungen des Immunsystems.....	8
1.4 Ziel der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien.....	15
2.1.1 Geräte.....	15
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	15
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.4 Antikörper und Kits.....	16
2.1.5 Lösungen.....	17
2.1.5.1 Lösungen für ELISA.....	17
2.1.5.2 Eosin-G-Gebrauchslösung.....	17
2.1.5.3 HCl-Alkohol-Lösung.....	17
2.1.6 Computerprogramme.....	17
2.2 Mäuse.....	17
2.3 Bakterien.....	18
2.3.1 <i>E. coli</i>	18
2.3.2 <i>S. pneumoniae</i>	18
2.4 Versuchsabläufe.....	19
2.4.1 24-Stunden-Versuch.....	19
2.4.2 Überlebensversuch über 15 Tage.....	19
2.5 Infektion.....	20
2.6 Monitoring.....	21
2.6.1 Gewicht.....	21
2.6.2 Klinischer Score.....	21
2.6.3 Motorische Testung.....	21
2.7 Gewebepreparation und Aufarbeitung.....	22
2.7.1 Präparation des Gehirns.....	22

2.7.2 Einbettung der rechten Gehirnhälfte und Anfertigung von Gewebsschnitten.....	23
2.7.3 Präparation der Milz.....	23
2.7.4 Homogenisierung des Kleinhirns und der Milz.....	24
2.7.5 Blutentnahme.....	24
2.7.6 Gewinnung von Serum.....	24
2.8 Bestimmung der Bakterienkonzentrationen.....	24
2.9 ELISA.....	25
2.10 Histologie.....	26
2.10.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	26
2.10.2 Chlorazetatesterase-Färbung.....	27
2.10.3 Beurteilung der histologischen Schnitte mithilfe des meningealen Inflammationsscores.....	27
2.11 Statistik.....	29
3 Ergebnisse.....	31
3.1 Intrazerebrale <i>E. coli</i> -Infektionen bei jungen und alten Mäusen.....	31
3.1.1 Klinische Symptome und Entzündungsparameter im Verlauf einer intrazerebralen <i>E. coli</i> -Infektion.....	31
3.1.1.1 Überleben.....	31
3.1.1.2 Gewicht.....	32
3.1.1.3 Klinische Symptomatik.....	32
3.1.1.4 Motorische Fähigkeiten.....	33
3.1.1.5 Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut.....	34
3.1.1.6 Zytokinkonzentrationen im Serum 24 Stunden nach Infektion.....	36
3.1.1.7 Meningealer Inflammationsscore.....	36
3.1.2 Klinische Symptome und Entzündungsparameter in der Akutphase einer tödlichen i.c. <i>E. coli</i> -Infektion.....	40
3.1.2.1 Gewicht.....	40
3.1.2.2 Klinische Symptomatik.....	40
3.1.2.3 Motorische Fähigkeiten.....	40
3.1.2.4 Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut 24 Stunden nach Infektion.....	41
3.1.2.5 Zytokinkonzentrationen im Serum und Kleinhirnhomogenat 24 Stunden nach Infektion.....	42
3.1.2.6 Meningealer Inflammationsscore.....	44
3.1.3 Vergleich intrazerebraler <i>E. coli</i> -Infektionen alter und junger TLR9-defizienter Mäuse.....	46
3.1.3.1 Gewicht.....	46

3.1.3.2 Klinische Symptomatik.....	46
3.1.3.3 Motorische Fähigkeiten.....	46
3.1.3.4 Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut 24 Stunden nach Infektion.....	48
3.1.3.5 Zytokinkonzentrationen im Serum und Kleinhirnhomogenat 24 Stunden nach Infektion.....	50
3.1.3.6 Meningealer Inflammationsscore.....	50
3.2 Intrazerebrale <i>S. pneumoniae</i> -Infektionen bei jungen und alten Mäusen.....	52
3.2.1 Klinische Symptome und Entzündungsparameter im Verlauf einer intrazerebralen <i>S. pneumoniae</i> -Infektion.....	52
3.2.1.1 Überleben.....	52
3.2.1.2 Gewicht.....	52
3.2.1.3 Klinische Symptomatik.....	53
3.2.1.4 Motorische Fähigkeiten.....	54
3.2.1.5 Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut.....	55
3.2.1.6 Meningealer Inflammationsscore.....	56
4 Diskussion.....	57
5 Zusammenfassung.....	65
6 Veröffentlichungen.....	66
7 Literaturverzeichnis.....	67
8 Anhang.....	77
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	77
8.2 Tabellenverzeichnis.....	79
8.3 Abkürzungsverzeichnis.....	79

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Infektionen im Alter

Aufgrund der Zunahme der Lebenserwartung sowie des Rückgangs der Geburtenrate altert die Bevölkerung in Deutschland. So wird laut Schätzungen der Anteil der über 65-Jährigen an der Gesamtbevölkerung von 20 % im Jahre 2008 auf 34 % im Jahre 2060 steigen. Vor allem die Zahl der Hochbetagten wird sichtlich zunehmen, so dass in 50 Jahren jeder siebte Bürger Deutschlands über 80 Jahre alt sein wird (Statistisches Bundesamt 2009). Weltweit wird der Anteil der über 60-Jährigen an der Gesamtbevölkerung von 11 % im Jahre 2009 auf 22 % im Jahre 2050 steigen (United Nations 2009). Um auf diesen demografischen Wandel einzugehen, muss sich die Medizin an die speziellen Bedürfnisse der alternden Bevölkerung anpassen.

Infektionen stellen häufige Erkrankungen im hohen Alter dar. Sie verlaufen bei älteren Menschen im Vergleich zur jüngeren Bevölkerung schwerer und gehen mit einer erhöhten Letalität einher (Werner und Kuntsche 2000). Die Gründe dafür sind vielfältig. Natürliche mechanische Barrieren wie etwa Schleimhäute sind bei älteren Menschen häufig in ihrer Funktion gestört, und chronische Komorbiditäten alter Menschen können zur Schwächung der Immunabwehr führen (Werner und Kuntsche 2000). Zudem sind die Funktionen des Immunsystems auf zellulärer und humoraler Ebene verändert.

Häufige Infektionen im Alter sind Harnwegsinfektionen, Pneumonien, Haut- und Weichteilinfektionen, intraabdominelle Infektionen wie beispielsweise Cholezystitis und Divertikulitis, Endokarditiden, Tuberkulose, Herpes Zoster und bakterielle Meningitis (Werner und Kuntsche 2000; Yoshikawa 2000). Infektionen weisen bei alten Menschen häufiger als bei jungen Menschen ein atypisches klinisches Bild mit schleichendem Verlauf und mehrdeutiger oder verminderter Symptomatik auf (Werner und Kuntsche 2000). Derartige unspezifische Symptome können Stürze, Delirium, Gewichtsverlust und generelle Schwäche sein (Gavazzi und Krause 2002). Dies führt häufig zu späten Diagnosen, verzögertem Therapiebeginn und resultiert daher oft in Komplikationen (Werner und Kuntsche 2000). Gerade deshalb sollten Infektionen im Alter nicht unterschätzt und der Grundsatz der geriatrischen Diagnostik gelten, dass Infektionen in die Differentialdiagnose einzubeziehen sind (Werner und Kuntsche 2000). Eine Hilfe in der Diagnostik kann das C-reaktive Protein (CRP) darstellen, welches bei bakteriellen

Infektionen ansteigt und bei negativem Wert den Ausschluss einer schweren bakteriellen Infektion erlaubt (Gavazzi und Krause 2002). Hingegen ist der Ausschluss einer Infektion mit Messung der Körpertemperatur nicht möglich, da Fieber bei 20 - 30 % der nachgewiesenen schweren Infektionen bei alten Menschen fehlt (Norman und Yoshikawa 1996). Eine normale Leukozytenzahl ist ebenfalls mit Vorsicht als Ausschlussparameter zu gebrauchen, da der Anstieg der Leukozytenzahl bei Infektionen im Alter fehlen kann (Werner und Kuntsche 2000).

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 spezie*s, *Chlamydia pneumoniae* und andere gramnegative Erreger (Marrie 2000).

Die bakterielle Meningitis gehört weltweit zu den zehn häufigsten zum Tode führenden Infektionskrankheiten (World Health Organization 2004). Weltweit erkranken geschätzt mindestens 1,2 Millionen Menschen pro Jahr an einer bakteriellen Meningitis (Nau *et al.* 2012). Dabei stellt die bakterielle Meningitis einen Notfall dar und sollte zur sofortigen Krankenseinweisung führen (Nau *et al.* 2012). In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich die bakterielle Meningitis zur Erkrankung der älteren Bevölkerung. Neben der erhöhten Lebenserwartung sind Gründe dafür beispielsweise die Einführungen von Impfungen gegen *H. influenzae* und *S. pneumoniae* bei Säuglingen (Cabellos *et al.* 2009). Bei der bakteriellen Meningitis im Alter ist der häufigste Erreger *S. pneumoniae*. Die Pneumokokken-Meningitis hat bei den über 60-Jährigen eine bis zu vier Mal höhere Inzidenz als bei Personen zwischen 2 und 29 Jahren (Schuchat *et al.* 1997). Die Sterblichkeit der Pneumokokken-Meningitis ist in der Gruppe der über 60-Jährigen mit 37 % deutlich höher als in der Gruppe der unter 60-Jährigen, in der sie bei 18 % liegt (Kastenbauer und Pfister 2003). Aus diesem Grund empfiehlt das Robert Koch-Institut für Personen über 60 Jahre die Impfung mit einem 23-valenten Pneumokokkenpolysaccharid-Impfstoff (Robert Koch-Institut 2012). Im Alter treten allerdings auch andere Erreger wie *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) und *H. influenzae* sowie *Listeria monocytogenes* und gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Klebsiella pneumoniae* als Auslöser von Meningitiden auf (Choi 2001). Beispielsweise ist die Inzidenz der Listerien-

Meningitis bei Personen über 60 Jahre 15 Mal höher als bei Personen zwischen 2 und 29 Jahre (Schuchat *et al.* 1997). Entsprechend den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie sollte bei Verdacht auf eine bakterielle Meningitis bei abwehrgeschwächten und älteren Patienten die adjuvante Gabe von 10 mg Dexamethason und anschließend die empirische Antibiotikagabe eines Cephalosporin der dritten Generation plus Ampicillin intravenös erfolgen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2012). Dabei präsentiert sich die bakterielle Meningitis bei älteren Menschen seltener mit der klassischen Trias Fieber, Kopfschmerz und Nackensteife, sondern oft als Kombination aus Fieber und Verwirrtheitszustand bzw. vermindertem Bewusstsein. Meningeale Reizungszeichen wie Meningismus, Kernig- und Brudzinski-Zeichen können fehlen (Werner und Kuntsche 2000; Lai *et al.* 2011; Magazzini *et al.* 2012). Des Weiteren entwickeln ältere Patienten mit bakterieller Meningitis im Verlauf öfter schwere neurologische Symptome wie Koma, epileptische Anfälle sowie Halbseitenlähmungen und weisen eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu jüngeren Patienten auf (Weisfelt *et al.* 2006; Cabellos *et al.* 2009).

1.2 Pathophysiologie bakterieller ZNS-Infektionen

Infektionen im zentralen Nervensystem (ZNS) können sich als Entzündung der Gehirn- und Rückenmarkshäute in Form einer Meningitis, im Hirnparenchym in Form einer Enzephalitis sowie in beiden Bereichen in Form einer Meningoenzephalitis darstellen. Bakterielle Erreger können auf drei verschiedenen Wegen in das ZNS gelangen: Auf dem hämatogenen Weg beispielsweise infolge einer Pneumonie bzw. Sepsis, auf dem direkten Weg bei offenen traumatischen Schädelverletzungen oder nach chirurgischen Eingriffen oder *per continuitatem* bei Sinusitis, Otitis oder Mastoiditis (Hufschmidt *et al.* 2009).

Die Pneumokokken-Meningitis entwickelt sich bei Kindern und Neugeborenen meist durch Besiedlung von *S. pneumoniae* im Nasopharynx und anschließendem Übertritt ins Blut, wobei die Infektion bei Erwachsenen meist den Weg *per continuitatem* beschreitet (Koedel *et al.* 2010). Zur Besiedelung der Nasenschleimhaut durch Pneumokokken spielt vor allem der *pneumococcal adherence and virulence factor A* (PavA) eine wichtige Rolle, der u. a. die Bindung an endotheliale Schleimhautzellen vermittelt (Pracht *et al.* 2005).

Um eine Meningitis auszulösen, muss der Erreger in den Subarachnoidalraum (SAR) gelangen, einen Bereich zwischen den Hirnhäuten Arachnoidea und Pia Mater, in dem sich der Liquor cerebrospinalis befindet. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt dabei eine natürliche Barriere zwischen dem ZNS und dem Blutkreislauf dar. Sie wird gebildet aus den Endothelzellen der Blutgefäße, den bindegewebigen Perizyten und den Astrozyten

des Gehirns. Sie schützt das ZNS vor dem Eintreten von Krankheitserregern, ist aber ebenso für den benötigten Nährstoffaustausch mittels verschiedener Transportvorgänge zuständig. Ein zweiter Weg für den Eintritt des Erregers in das ZNS kann über die Blut-Liquor-Schranke (BLS) erfolgen. Die BLS wird von den Epithelzellen des Plexus choroideus gebildet und ist ebenfalls an der Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS beteiligt (Lüllmann-Rauch 2009). Zum Überwinden der BHS bindet *E. coli* beispielsweise mit spezifischen bakteriellen Proteinen wie etwa dem *outer-membrane protein A* (OmpA) an endotheliale Rezeptoren der BHS und gelangt somit in das ZNS (Kim 2000). *S. pneumoniae* passiert die Endothelzellen mithilfe des *choline-binding protein A* (CbpA), das an den Rezeptor für den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) bindet (Ring *et al.* 1998).

Im SAR angekommen, können sich die Bakterien exponentiell vermehren. Der Grund dafür liegt u. a. darin, dass das Eintreten von immunkompetenten Zellen durch die BLS und BHS verhindert wird, kein ausreichender lymphatischer Abfluss existiert (Johnston *et al.* 2004) und der SAR eine Reihe von antiinflammatorischen und immunsuppressiven Faktoren enthält, welche die Immunabwehr unterdrücken (Nieder Korn 2006). Allerdings verfügen die den SAR umgebenden Hirnhäute, das perivaskuläre Gewebe sowie der Plexus choroideus über residente Makrophagen und dendritische Zellen (Guillemin und Brew 2004), so dass es schließlich bei hoher Konzentration des Erregers zu einer Immunantwort kommt (Koedel *et al.* 2010). Das innate Immunsystem wird dabei u. a. von durch Autolyse freigesetzten Bakterienbestandteilen wie Lipopolysaccharide (LPS) als Zellwandbestandteilen gramnegativer Bakterien, Lipoteichonsäuren als Zellwandbestandteilen grampositiver Bakterien sowie Peptidoglykanen, Pneumolysin und bakterieller Desoxyribonukleinsäure (DNA) aktiviert (Ebert *et al.* 2005; Koedel *et al.* 2010). So führen beispielsweise Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren der Zellwand von *S. pneumoniae* zu Mikroglia stimulation, Inflammation und Leukozyteninvasion (Gerber und Nau 2010). Das Exotoxin Pneumolysin des *S. pneumoniae* kann transmembrane Poren bilden (Mitchell 2000), wirkt direkt toxisch auf mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns (Zysk *et al.* 2001) und verursacht neuronalen Zelltod (Stringaris *et al.* 2002; Braun *et al.* 2007).

Die residenten immunkompetenten Zellen angrenzend an den SAR erkennen die bakteriellen Bestandteile anhand von Toll-like-Rezeptoren (*toll-like receptors* [TLR]). TLR gehören zu der Gruppe der *pattern-recognition receptors* (PRRs) und erkennen spezifische Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns* [PAMPs]), woraufhin eine Immunantwort eingeleitet wird (Akira *et al.* 2006). Der Weg dahin führt unter anderem über die Translokation des Transkriptionsfaktors

Nuklearfaktor kappa B (NF- κ B), die Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und schließlich über die Transkription von Genen für inflammatorische Zytokine (Akira *et al.* 2006). Dabei spielt das intrazelluläre Adaptermolekül *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) für den Signalweg aller TLR, außer TLR3, eine wichtige Rolle, wobei es auch MyD88-unabhängige Signalwege z. B. über das Adaptermolekül *TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β* (TRIF) gibt (Akira *et al.* 2006). Der TLR9 erkennt beispielsweise bakterielle DNA bzw. die darin enthaltene hohe Anzahl von unmethylierten Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Wiederholungen. TLR4 erkennt dagegen LPS, welche z. B. in der Zellwand von *E. coli* vorkommen sowie Pneumolysin von Pneumokokken (Akira *et al.* 2006). TLR2 reagiert u. a. auf Zellwandbestandteile von grampositiven Bakterien wie etwa Peptidoglykane und spielt eine wichtige Rolle bei der Pneumokokken-Meningitis – so zeigten TLR2-defiziente Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber *S. pneumoniae* sowie eine erhöhte intrathekale Inflammation und erhöhte Bakterienzahl im Gehirn (Echchannaoui *et al.* 2002).

Die residenten Makrophagen des ZNS, die Mikrogliazellen, spielen eine wichtige Rolle im Verlauf der bakteriellen Meningitis. Sie sind wichtig für den Schutz des Hirngewebes gegen Krankheitserreger, in dem sie diese phagozytieren, Entzündungsmediatoren ausschütten und als antigenpräsentierende Zelle fungieren (Lüllmann-Rauch 2009). Mikrogliazellen erkennen Bakterienbestandteile mittels TLR. So führt die Aktivierung von Mikrogliazellen durch TLR2-, TLR4- und TLR9-Agonisten zur Dosis-abhängigen Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Ebert *et al.* 2005). Stimuliert man Mikrogliazellen mit TLR1/2-, TLR4- und TLR9-Agonisten, so steigert dies die Phagozytoserate für *S. pneumoniae* und *E. coli* (Ribes *et al.* 2009; Ribes *et al.* 2010a). Eine Stimulation von Mikrogliazellen mit dem TLR3-Agonisten *polyinosinic-polycytidylic acid* (poly I:C) führt ebenfalls zu einer vermehrten Phagozytoserate und gesteigertem intrazellulärem Abtöten von *E. coli* sowie zur vermehrten Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen sowie NO (Ribes *et al.* 2010b). Dass die Aktivierung von Mikrogliazellen nicht nur positive Auswirkungen hat, zeigt sich in einem Experiment an murinen Neuron-Mikroglia-Kokulturen. Dabei kommt es unter Stimulation der Mikrogliazellen durch TLR1/2- und TLR4-Agonisten zur Abnahme der Vitalität der Neurone, gemessen an deren reduzierten Zahl von intakten neuronalen Ausläufern und Vernetzungen (Schütze *et al.* 2012). Die Stimulation von Mikrogliazellen mittels TLR9-Agonisten und die darauffolgende Ausschüttung von NO und TNF- α erwies sich ebenfalls als toxisch für umgebende Neurone *in vitro* (Iliev *et al.* 2004).

Ein wichtiger Schritt im Kampf gegen die bakteriellen Erreger stellt im Verlauf die Migration von Leukozyten, Vertretern der adaptiven Immunantwort, in das ZNS 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 (Täuber und Moser 1999; Nau und Brück 2002). Die Leukozytenmigration verläuft in vier Schritten: Anbindung mithilfe von Selektinen; Triggerung der Leukozyten durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β (IL-1 β), Chemokine wie IL-8, Bestandteile des Komplementsystems sowie bakterielle Zellwandbestandteile; Adhäsion durch Integrine und schließlich Emigration in den SAR (Koedel *et al.* 2002). Dass dies ein wichtiger Schritt ist, zeigt ein Mausexperiment der Pneumokokken-Meningitis, in dem Granulozyten-depletierte Mäuse eine frühere Sterblichkeit als immunkompetente Tiere aufwiesen (Mildner *et al.* 2008). Andererseits spielen aktivierte Leukozyten eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Komplikationen der bakteriellen Meningitis wie Vasospasmen, Vaskulitis und Schädigung von Hirngewebe (Echchannaoui *et al.* 2002; Gerber und Nau 2010) - denn sie setzen potentiell gewebsschädigende Stoffe wie reaktive Oxidantien und proteolytische Enzyme frei (Nussler *et al.* 1999). Reaktive Oxidantien wie Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species* [ROS]) sowie Stickstoffradikale (*reactive nitrogen intermediates* [RNI]) führen zur Bildung von Peroxinitrit, welches wiederum zu Zelltod durch Membranperoxidierung, Zerstörung von Proteinstrukturen, DNA-Schädigung sowie die Aktivierung von poly(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP) und folgendem Energieabbau und Zelltod führt (Koedel *et al.* 2002). Bei den von den Leukozyten freigesetzten proteolytischen Enzymen spielen vor allem die Matrix-Metalloproteasen (MMP) eine wichtige Rolle. Sie greifen u. a. Proteine der Extrazellulärmatrix an und sind für Inflammation, Störung der Barrierefunktion des Gehirns sowie für Zelluntergang mit verantwortlich (Gerber und Nau 2010). Es fanden sich beispielsweise bei Menschen mit bakterieller Meningitis erhöhte Werte von MMP-2 in Korrelation mit erhöhten Werten von alpha-2-Makroglobulin - einem Marker für die Funktionsstörung der BLS und der BHS (Kanoh *et al.* 2008).

Im Laufe einer Entzündung des ZNS kommt es zur Ausschüttung von löslichen Mediatoren. Zytokine bilden dabei ein komplexes Netzwerk, beeinflussen beispielsweise die Leukozytenmigration und -funktion und regulieren dadurch die inflammatorische Antwort (Täuber und Moser 1999). Dabei werden im Verlauf der bakteriellen Meningitis die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 zuerst produziert, woraufhin die

Einwanderung von Leukozyten und wiederum eine Zunahme der Zytokinausschüttung erfolgt (Täuber und Moser 1999). TNF- α kann positive wie negative Auswirkungen für den Wirtsorganismus haben. So zeigte sich beispielsweise in einem Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis, dass die TNF- α -defizienten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine erhöhte Sterblichkeit und nach überstandener Erkrankung stärkere Defizite im räumlichen Gedächtnis aufwiesen - wahrscheinlich aufgrund einer verminderten Neurogenese im Hippocampus (Gerber *et al.* 2004). Andererseits korreliert die Höhe der Ausschüttung von TNF- α im Rahmen der bakteriellen Meningitis auch mit den durch die Inflammation verursachten Komplikationen wie der Schädigung der BHS (Sharief *et al.* 1992). IL-6, welches im Maus- sowie Rattenmodell der Pneumokokken-Meningitis untersucht wurde, wies sowohl proinflammatorische Fähigkeiten wie beispielsweise eine Erhöhung der Permeabilität der BHS als auch antiinflammatorische Fähigkeiten wie die Reduktion der Leukozyteninvasion auf (Paul *et al.* 2003).

Die bakterielle Meningitis, vor allem die durch *S. pneumoniae* verursachte, kann mit verschiedenen Spätkomplikationen einhergehen, wie z. B. mit sensomotorischen Defiziten, Hörverlust und kognitiven Beeinträchtigungen (Mook-Kanamori *et al.* 2011). In einer Studie an Menschen, die eine bakterielle Meningitis 1 bis 12 Jahre zuvor überstanden hatten, zeigten sich im Vergleich zu einer Kontrollgruppe Beeinträchtigungen im Kurzzeit- und Arbeitsgedächtnis, in exekutiven Funktionen sowie in Lernfunktionen (Schmidt *et al.* 2006). Histopathologisch wurde sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch ein neuronaler Untergang durch Apoptose im Gyrus dentatus des Hippocampus sowie durch kortikale Nekrosen festgestellt (Nau *et al.* 1999). So zeigte sich, dass NO, produziert von Mikrogliazellen und Makrophagen durch die induzierbare Stickoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthase* [iNOS]), in einem Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis eine Aktivierung von Caspase-3 und einen folgenden Zelltod im Hippocampus herbeiführte (Braun 2009). Eine weitere wichtige Komplikation der bakteriellen Meningitis besteht in der Schädigung des Hirnparenchyms durch eine Vaskulitis der kleinen Blutgefäße und folgender fokaler Ischämie sowie durch venöse Thrombosen (Nau *et al.* 2004).

Damit ist erkennbar, dass die Aktivierung des Immunsystems nicht nur essentiell für die Bekämpfung des Erregers ist, sondern auch dazu beiträgt, Hirngewebe zu schädigen (Koedel *et al.* 2010).

1.3 Altersbedingte Veränderungen des Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen kann in das angeborene Immunsystem und das erworbene Immunsystem unterteilt werden. Veränderungen des Immunsystems im Alter, die im Allgemeinen mit einer Beeinträchtigung einhergehen, werden als Immuneszenz bezeichnet und betreffen sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunabwehr (Weiskopf *et al.* 2009). Diese Veränderungen zeigen sich klinisch z. B. in der schon erwähnten erhöhten Anfälligkeit älterer Menschen, an Infektionen zu erkranken, in einem verminderten Ansprechen auf Impfungen sowie in der erhöhten Inzidenz von Tumorerkrankungen (Targonski *et al.* 2007). Im Folgenden wird auf wichtige bisher bekannte Unterschiede im angeborenen und erworbenen Immunsystem alter und junger Menschen eingegangen.

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Stufe der Immunabwehr gegen Erreger. Seine Hauptbestandteile sind neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen.

Neutrophile Granulozyten scheinen während des Alterungsprozesses in der Anzahl konstant zu bleiben (Solana *et al.* 2006). Es wurde jedoch eine verringerte Phagozytoserate von neutrophilen Granulozyten von alten Menschen in Hinblick auf opsonierten *S. pneumoniae* (Simell *et al.* 2011) sowie opsonierten *E. coli* - wahrscheinlich aufgrund von verminderter Expression des Fc γ -Rezeptors CD16 (*cluster of differentiation*) – im Vergleich zur Phagozytoserate von neutrophilen Granulozyten junger Menschen entdeckt (Butcher *et al.* 2001). Veränderungen im Alter wurden auch bei anderen rezeptorvermittelten Funktionen festgestellt. So zeigen gealterte neutrophile Granulozyten z. B. eine verminderte Ausschüttung von Sauerstoffradikalen und eine reduzierte Chemotaxis und Apoptose - wahrscheinlich ein Resultat von veränderter Signaltransduktion bei erhaltener Expression von TLR und Granulozyten-Makrophagenkoloniestimulierenden Faktor (GM-CSF)-Rezeptoren (Fulop *et al.* 2004).

Dendritische Zellen stellen eine Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem dar. In *in-vitro*-Experimenten untersuchte dendritische Zellen, welche aus Blutmonozyten entwickelt wurden, zeigten verschiedene altersspezifische Veränderungen. Beispielsweise wiesen sie eine verminderte Phagozytose apoptotischer Zellen, eine reduzierte Fähigkeit zur Mikropinozytose sowie eine beeinträchtigte Migration in regionale Lymphknoten auf - wichtige Faktoren für die Antigenpräsentation und die anschließende T-Zell-Aktivierung (Agrawal *et al.* 2007).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Abtötung von virusbefallenen Zellen und Tumorzellen. Im Gegensatz zu anderen Vertretern des Immunsystems ist die Anzahl der NK-Zellen im Alter erhöht, die Zytotoxizität sowie die Interferon- γ (INF- γ)-Produktion der einzelnen Zelle ist allerdings vermindert (Weiskopf *et al.* 2009). Außerdem wiesen NK-Zellen alter gesunder Menschen ein vermindertes Ansprechen auf IL-2 in Bezug auf Proliferation auf – bei erhaltener TNF- α -Produktion und Perforin-Synthese (Solana *et al.* 1999). Die Produktion von Chemokinen unter Einfluss von IL-2 und IL-12, zwei der wichtigsten Aktivatoren der NK-Zellen, scheint im Alter zwar stimulierbar zu sein, allerdings wiesen NK-Zellen alter Menschen eine verminderte Ausschüttung von Chemokinen im Vergleich zu jüngeren Menschen auf (Mariani *et al.* 2002).

Makrophagen zählen zu den wichtigsten Initiatoren der Immunantwort, indem sie Pathogene erkennen und eliminieren sowie die resultierende Immunantwort regulieren. Bei der immunhistochemischen Bestimmung von Makrophagen-Vorstufen sowie von Makrophagen im Knochenmark scheint die Anzahl bei alten Menschen im Vergleich zu jungen Menschen verringert zu sein, welches zum Teil auf eine ebenso aufgezeigte erhöhte Apoptoserate im Knochenmark alter Menschen zurückgeführt wird (Ogawa *et al.* 2000). Daten unserer Arbeitsgruppe deuten allerdings auf das Gegenteil hin. Bei der Isolierung von Makrophagen des Peritoneums stellte sich eine höhere Anzahl bei alten Mäusen als bei jungen Mäusen dar. Eine wichtige Funktion der Makrophagen ist die Phagozytose von bakteriellen Erregern. Im Alter weisen Makrophagen in allen Schritten der Phagozytose (Adhärenz, Opsonierung und schließlich Phagozytose) Defekte auf (Kovacs *et al.* 2009). Des Weiteren verfügen Makrophagen über die Fähigkeit, Antigene für CD4-positive T-Zellen zu präsentieren und sie damit zu aktivieren. *In vitro* exprimierten aus dem Knochenmark alter Mäuse gewonnene Makrophagen im Vergleich zu denen junger Mäuse eine reduzierte Anzahl von MHCII (*major histocompatibility complex class II*)-Molekülen nach Stimulation mit INF- γ auf ihrer Oberfläche (Herrero *et al.* 2002). Außerdem bilden aktivierte Makrophagen alter Mäuse vermehrt Prostaglandin E2, welches die Expression von MHCII-Molekülen inhibiert (Plowden *et al.* 2004). Ein weiterer durch INF- γ und z. B. durch LPS stimulierter Effekt der Makrophagen ist die Abtötung von Krankheitserregern via Sauerstoff- und Stickstoffradikale. *In vitro* zeigte sich bei Makrophagen alter Mäuse im Vergleich zu denen junger Mäuse eine verminderte Produktion von NO (Kissin *et al.* 1997). Zur Erkennung des bakteriellen Erregers sowie

dessen Bekämpfung spielen die schon erwähnten TLR eine wichtige Rolle. Es zeigte sich, dass sowohl Makrophagen der Milz als auch des Peritoneums alter Mäuse signifikant weniger TLR exprimierten und weniger IL-6 und TNF- α nach Stimulation von TLR1/2, 2/6, 3, 4, 5 und 9 bildeten als Makrophagen junger Mäuse (Renshaw *et al.* 2002). Wahrscheinlich ist neben der verminderten TLR-Expression auch eine veränderte Transduktion des TLR-Signalweges auf der Ebene der MAPK an der verminderten Zytokinproduktion nach TLR-Stimulation beteiligt (Boehmer *et al.* 2005). In der Literatur besteht im Zusammenhang mit der Zytokinausschüttung alter Makrophagen eine Diskrepanz zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien. Es ist bekannt, dass ältere Menschen eine konstant vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α aufweisen, ein Zustand, den man als sogenannte *inflammaging* bezeichnet (Franceschi *et al.* 2000). So kann man auch im Mausmodell feststellen, dass im Falle einer Sepsis alte Tiere mehr Zytokine als junge Mäuse produzieren (Turnbull *et al.* 2009). Und dennoch ist die Bildung von TNF- α und IL-6 der Makrophagen von alten Mäusen *in vitro* unter Stimulation mit LPS vermindert (Boehmer *et al.* 2004). Kovacs *et al.* diskutieren, dass die Makrophagen, obwohl größtenteils für die Zytokinproduktion *in vivo* verantwortlich, zwar im Alter weniger Zytokine produzieren, wohl aber andere Zellen wie epitheliale und endotheliale Zellen sowie Leukozyten mitbeteiligt sind. Außerdem kann die veränderte Präsenz von beispielsweise Hormonen, adrenergen und cholinergen Substanzen sowie Fettsäuren im Körper des alten Menschen einen stimulierenden Effekt auf das Immunsystem haben (Kovacs *et al.* 2009).

Bei der bakteriellen Meningitis im Speziellen spielen die residenten Makrophagen des ZNS, die Mikrogliazellen, eine große Rolle. Beim gesunden erwachsenen Menschen befinden sich die Mikrogliazellen in einem ruhenden Zustand, der sich allerdings schon bei kleinen Veränderungen in der Homöostase des ZNS ändern kann - dann werden die Mikrogliazellen aktiviert, proliferieren und schützen das Hirngewebe. Dabei setzen aktivierte Mikrogliazellen Zyto- und Chemokine zur Regulation der Immunantwort frei, um eine Infektion zu kontrollieren, Zelltrümmer zu entfernen und Gewebe wiederherzustellen (Jurgens und Johnson 2012). Im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose, dem Morbus Alzheimer und von Prionenerkrankungen kommt es im ZNS zu Veränderungen, welche sich in einer chronischen, aber mäßigen Inflammation sowie einer erhöhten Reaktivität der Mikroglia äußert – es sind sogenannte *primed* oder *sensitized* Mikrogliazellen im ZNS zu finden (Perry *et al.* 2003). Zahlreiche experimentelle Versuche legen nahe, dass die mäßige Aktivierung von Mikrogliazellen auch im

natürlichen Alterungsprozess stattfindet. Beispielsweise konnte in den Gehirnen alter Mäuse eine erhöhte Expression von MHCII-Molekülen, einem Marker für aktivierte Mikrogliazellen, nachgewiesen werden (Godbout *et al.* 2005; Frank *et al.* 2006). Wenn diese Mäuse nun *in vivo* einem weiteren Stimulus des innate Immunsystems ausgesetzt sind (z. B. durch eine intraperitoneale LPS-Gabe), reagieren sie mit einer übermäßigen Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen mit einhergehenden verstärkten und verlängerten Krankheitssymptomen wie Gewichtsabnahme, Lethargie und Abnahme kognitiver sowie motorischer Funktionen (Godbout *et al.* 2005; Dilger und Johnson 2008). Auch *ex vivo* lässt sich darstellen, dass Mikrogliazellen alter Mäuse unter Stimulation mit LPS eine höhere Ausschüttung der Zytokine IL-1 β und IL-6 im Vergleich zu jüngeren Mäusen aufweisen (Frank *et al.* 2010). Jedoch gibt es auch Daten über eine verminderte Produktion von IL-6 und TNF- α nach Stimulation durch LPS von Makrophagen alter Mäuse gegenüber junger Mäuse (Renshaw *et al.* 2002). Die wichtige Funktion der Phagozytose durch Mikrogliazellen nimmt im Alter ab. So zeigte sich eine verminderte Phagozytose von Amyloid- β durch Mikrogliazellen alter Mäuse im Vergleich zu jüngeren Mäusen (Floden und Combs 2011).

	neutrophile Granulozyten	Makrophagen	Mikrogliazellen
unverändert ↔	Anzahl (Solana <i>et al.</i> 2006) Expression von TLR und GM-CSF (Fulop <i>et al.</i> 2004)		
vermindert ↓	Phagozytose (Simell <i>et al.</i> 2011) Expression von CD16 (Butcher <i>et al.</i> 2001) Produktion von Sauerstoffradikalen Chemotaxis Apoptose (Fulop <i>et al.</i> 2004)	Anzahl von Monozyten und Makrophagen im Knochenmark (Ogawa <i>et al.</i> 2000) Phagozytose (Kovacs <i>et al.</i> 2009) Expression von MHC-II-Moleküle (Herrero <i>et al.</i> 2002) Freisetzung von NO (Kissin <i>et al.</i> 1997) TLR-Expression Produktion von Zytokinen und Chemokinen <i>in vitro</i> (Renshaw <i>et al.</i> 2002)	Phagozytose (Floden und Combs 2011) Produktion von Zytokinen unter Stimulation <i>in vivo</i> (Renshaw <i>et al.</i> 2002)
erhöht ↑		Produktion von Prostaglandin E2 (Plowden <i>et al.</i> 2004)	Produktion von Zytokinen unter Stimulation <i>in vivo</i> (Godbout <i>et al.</i> 2005) (Dilger und Johnson 2008) Expression von MHC-II-Moleküle (Godbout <i>et al.</i> 2005) (Frank <i>et al.</i> 2006)

Tabelle 1: Veränderungen einiger der für ZNS-Infektionen relevanten Komponenten des innate Immunsystems im Alter.

Die erworbene Immunantwort setzt sich hauptsächlich aus den B- und T-Lymphozyten zusammen. Sie stellt die Reaktion des Körpers auf spezifische Antigene dar und unterliegt einigen alterstypischen Veränderungen.

Die Zellen des Immunsystems werden kontinuierlich von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks erneuert und dann in die Peripherie abgegeben. Im Alter verringert sich die Erneuerungsrate dieser Stammzellen, das blutbildende Gewebe im Rückenmark nimmt ab und die Produktion von pro-B-Zellen geht zurück, was in einer verminderten Anzahl von in die Blutbahn abgegebenen naiven B-Zellen resultiert (Weiskopf *et al.* 2009).

Die B-Lymphozyten bleiben zwar mit dem Alter in den Absolutzahlen im peripheren Blut konstant, jedoch verändert sich die Zusammensetzung. So kommt es zum einen zu der schon erwähnten Verringerung der Anzahl von naiven B-Lymphozyten und zum anderen aufgrund einer verminderten Apoptoserate der B-Gedächtniszellen zu einer Vermehrung bestimmter B-Zell-Klone – daraus resultiert eine Einschränkung der Vielfältigkeit der Immunantwort, welche wahrscheinlich eine Ursache für das verminderte Ansprechen älterer Menschen auf Impfungen darstellt (Weiskopf *et al.* 2009). Die Funktion der B-Lymphozyten hängt maßgeblich von der Interaktion mit anderen Immunzellen ab. Im Alter kommt es zur verminderten Expression von kostimulatorischen Signalmolekülen wie z. B. CD40 - ein wichtiges Oberflächenmerkmal für die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion (Colonna-Romano *et al.* 2003).

Eine wichtige Veränderung im Hinblick auf die Anzahl von naiven T-Lymphozyten sowie deren Rezeptordiversität ist die Involution des Thymus, welche bereits in der Jugend beginnt und im Alter von 40-50 Jahren beendet ist. Obwohl sich die Diversität der naiven T-Zellen für lange Zeit erhält, zeigt sich eine Abnahme der Vielfalt und damit eine Verkleinerung des Repertoires der T-Helferzellen bei den über 70-Jährigen (Goronzy und Weyand 2005). Naive T-Zellen weisen im Alter weitere funktionelle Veränderungen wie z. B. eine reduzierte IL-2-Produktion sowie eine Beeinträchtigung in der Differenzierung zu Effektorzellen auf (Weiskopf *et al.* 2009).

1.4 Ziel der Arbeit

Bakterielle ZNS-Infektionen treten im Alter häufiger auf und gehen hier oft mit schwereren Komplikationen und einer höheren Sterblichkeit als bei jungen Patienten einher.

Ziel der Arbeit ist es, den Verlauf der bakteriellen Meningitis bei alten und jungen Mäusen am Beispiel zweier wichtiger Erreger zu vergleichen, gegebenenfalls bestehende Unterschiede im Krankheitsverlauf aufzudecken und zu untersuchen, warum diese bestehen.

Zu diesem Zweck sollen jeweils alte und junge Mäuse mit den Erregern *E. coli* und *S. pneumoniae* intrazerebral infiziert und der Verlauf der Erkrankung über 15 Tage kontrolliert und dokumentiert werden. Dabei soll das Augenmerk klinisch vor allem auf den Gesundheitszustand, das Gewicht und die motorischen Fähigkeiten der Mäuse gelegt werden. Zum Zeitpunkt des Todes bzw. nach Opferung der überlebenden Mäuse sollen die Bakterienkonzentrationen im Blut, in der Milz und im Kleinhirn bestimmt sowie Zytokinkonzentrationen im Serum und Kleinhirn gemessen werden. Um einen direkten Vergleich des klinischen Status und der Entzündungsparameter zu einem festen Zeitpunkt zu ermöglichen, sollen 24 Stunden nach einer Infektion mit einer zu 100 % zum Tode führenden Dosis von *E. coli* junge und alte Mäuse geopfert und die Bakterien- und Zytokinkonzentrationen verglichen werden.

Durch ein besseres Verständnis der Ursachen für die im Alter verminderte Fähigkeit, Infektionen abzuwehren und zu bewältigen, könnten neue Strategien für die Therapie und Prävention bakterieller Infektionen des ZNS bei alten Menschen entwickelt werden. Potentielle Strategien könnten im Verlauf in einem Mausmodell, das die Situation beim Menschen gut widerspiegelt, getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Einbettautomat	Thermo Scientific Excelsior ES, Hudson, NH, USA
Eingießstation	Shandon HistoCentre 2, Frankfurt, Deutschland
Inkubator	Memmert Typ BE200, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Olympus BX51, Hamburg, Deutschland
Mikroplatten-Reader	Tecan Multi-plate reader, Männedorf, Schweiz
Schlittenmikrotom	Leica SM2000R, Bensheim, Deutschland
Vortex	IKA MS1 Works, Staufen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

1,5-ml- und 2-ml-Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
15-ml-Röhrchen	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
1-ml-Insulinspritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
50-ml-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einbettkassetten	KABE, Nümbrecht, Deutschland
Mehrkanalpipette	ErgoOne USA Scientific, Ocala, FL, USA
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (l = 75 mm, d = 1,15 mm ± 0,05 mm)	Braun, Melsungen, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Schafsblut-Agarplatten	Universitätsmedizin Göttingen, Institut für

	Mikrobiologie, Deutschland
Subkutan-Nadel 26 G x 1/2" (0,45x12 mm)	Braun, Melsungen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Aqua bidest	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aquatex	Merck, Darmstadt, Deutschland
DePeX	Serva, Heidelberg, Deutschland
Eosin G	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formalin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isotone Natrium-Chlorid (NaCl) Lösung 0,9 %	Braun, Melsungen, Deutschland
Ketamin 10 %	Medistar, Ascheberg, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Kendall, Mansfield, OH, USA
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS) Dulbecco	Biochrom, Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylazin 2 %	Riemser, Greifswald (Insel Riems), Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin HRP conjugate	Biosource Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Antikörper und Kits

Mouse TNF- α ELISA Kit	Biolegend, San Diego, CA, USA
Mouse IL-6 ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Mouse KC ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Mouse IL-10 ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase Kit	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland

2.1.5 Lösungen

2.1.5.1 Lösungen für ELISA

Die Lösungen wurden laut Vorschrift des Herstellers hergestellt. Bei dem Wasch-Puffer wurde 0,5 g Tween 20 auf 1 Liter PBS gegeben. Das Reagent Diluent 1 bestand aus 1 g BSA und 100 ml PBS. Die Stopplösung bestand aus 1 N Schwefelsäure. Das HRP-Diluent wurde aus 40 ml Wasch-Puffer, 40 mg BSA und 1 µl Streptavidin HRP conjugate produziert.

2.1.5.2 Eosin-G-Gebrauchslösung

Zuerst wurde mit 2 g Eosin, 40 ml Aqua bidest und 160 ml 95 %-igem Ethanol eine Eosin-G-Stammlösung hergestellt. Zur Herstellung der Eosin-G-Gebrauchslösung wurde die Stammlösung mit Aqua bidest 1:10 verdünnt und anschließend ein Tropfen Essigsäure hinzugegeben.

2.1.5.3 HCl-Alkohol-Lösung

Zur Herstellung von HCl-Alkohol-Lösung wurden 2,5 ml 25 % Salzsäure mit 75 ml Aqua bidest und 175 ml Isopropanol vermischt.

2.1.6 Computerprogramme

GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
--------------------	---------------------------------------

2.2 Mäuse

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 Raumtemperatur, einer relativen Luftfeuchte von 55% sowie Beachtung des Tag/Nacht-Zyklus in Gemeinschaftskäfigen mit maximal 7 Mäusen in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universität Göttingen untergebracht. Die Mäuse

erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Insgesamt wurden 242 Mäuse (125 junge, 117 alte) in die Versuche integriert und es wurde stets auf eine gleichmäßige Geschlechterverteilung geachtet. Des Weiteren wurden Mäuse aus dem Versuch ausgeschlossen, die a) offensichtlich nicht an der gesetzten Infektion verstarben, sondern an einer anderen Erkrankung (beispielsweise Hautentzündung) bzw. b) nach der Narkose zur intrazerebralen Infektion nicht wieder das Bewusstsein erlangten und demnach an den Folgen der Narkose verstarben.

Verschiedene Mausstämme kamen für die Tierversuche zum Einsatz. Es wurden Mäuse des Stammes C57BL/6N untersucht, die aus der Zucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen sowie des Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin Göttingen stammten oder über die kommerziellen Züchter Janvier (Le Genest Saint Isle, Frankreich) und Charles River (Wilmington, MA, USA) geordert wurden. Des Weiteren wurden C57BL/6xSJL-Mäuse über den kommerziellen Züchter Janvier geordert. Außerdem wurden TLR9-defiziente Mäuse untersucht, welche freundlicherweise von Prof. Dr. med. H. Wagner aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene in München bereitgestellt wurden und für mindestens zehn Generationen mit dem Hintergrund C57BL/6J rückgekreuzt wurden. Ursprünglich wurden die TLR9-defizienten Mäuse von Prof. S. Akira von der Osaka Universität in Japan entwickelt und exprimieren kein funktionelles TLR9-Protein (Hemmi *et al.* 2000).

2.3 Bakterien

2.3.1 *E. coli*

E. coli ist ein gramnegatives Stäbchen. Der Stamm K1, welcher das kapsuläre Polysaccharid K1 aufweist, 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 Blutagar-Platten für 24 Stunden wurden die Bakterien in 0,9 % NaCl-Lösung überführt und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.3.2 *S. pneumoniae*

S. pneumoniae ist ein grampositives Bakterium. Der von uns verwendete bekapselte *S. pneumoniae*-Typ-3-Stamm wurde ursprünglich aus einem Patienten mit Meningitis isoliert

und uns freundlicherweise durch Prof. Dr. med. M. G. Täuber aus dem Institut für Infektionskrankheiten der Universität Bern zur Verfügung gestellt. Nach einer initialen Vermehrung über einer Passage im Kaninchen wurden die Bakterien ebenfalls auf Blutagar-Platten für 24 Stunden angezüchtet, in 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4 Versuchsabläufe

In jedem Versuch wurden die Mäuse zunächst dreimalig dem Seiltest (wie unter 2.6 beschrieben) unterzogen. Am Punkt 0 Stunden (h) erfolgte die Anästhesie und die anschließende intrazerebrale Infektion mit dem bakteriellen Erreger (wie unter 2.5 beschrieben). Es erfolgte die Tötung aller Mäuse nach 24 Stunden oder es wurde ein Monitoring über 15 Tage durchgeführt. Die Abbildung (Abb.) 1 stellt die Versuchsabläufe grafisch dar.

2.4.1 24-Stunden-Versuch

Die Mäuse wurden 12 und 24 Stunden nach Infektion mittels Wiegen, klinischem Score und Seiltestscore begutachtet. Alle Mäuse wurden 24 Stunden nach Infektion getötet, Blut entnommen und die Gewebe wie unter 2.7 beschrieben aufbereitet.

2.4.2 Überlebensversuch über 15 Tage

Die Mäuse wurden in den ersten 4 Tagen nach Infektion alle 12 Stunden sowie am 7., 10. und 14. Tag mittels Wiegen, klinischem Score und Seiltestscore kontrolliert. Die akute Phase der Infektion und Sterblichkeit an der Erkrankung umfasste in der Regel die ersten 96 Stunden nach Infektion. 24 (*E. coli*-K1) bzw. 30 (*S. pneumoniae*-SP3) Stunden nach Infektion erfolgte eine Blutentnahme. Die Gewebe der verstorbenen oder aufgrund des klinischen Scores oder zu starkem Gewichtsverlust getöteten Mäuse wurden ebenso wie unter 2.7 beschrieben aufbereitet. Alle überlebenden Mäuse wurden am 15. Tag nach Infektion getötet und ihre Gewebe aufbereitet.

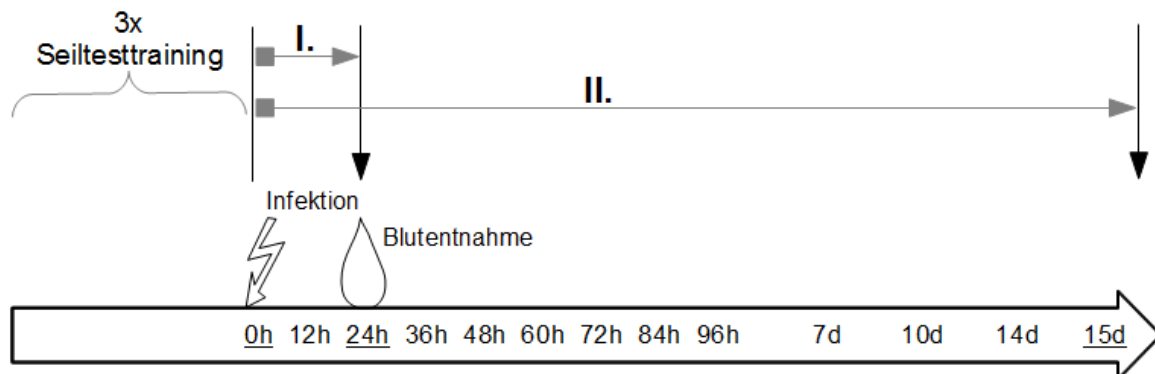


Abb. 1: **Ablauf eines Infektionsversuches.** Bei beiden Versuchsansätzen durchgeführtes dreimaliges Seiltesttraining vor intrazerebraler bakterieller Infektion am Punkt 0 Stunden. I.) 24-Stunden-Versuch: Nach 12 und 24 Stunden wurden die Mäuse mittels Wiegen, klinischem Score und Seiltest kontrolliert und es erfolgte die Blutentnahme und Opferung aller Mäuse 24 Stunden nach Infektion. II.) 15-Tage-Überlebens-Versuch: Die Mäuse wurden alle 12 Stunden innerhalb der ersten 96 Stunden, dann am 7., 10. und 14. Tag (siehe Zeitstrahl) mittels Wiegen, klinischem Score und Seiltest begutachtet. 24 Stunden (*E. coli*-K1) bzw. 30 Stunden (*S. pneumoniae*-SP3) nach Infektion erfolgte die Blutentnahme. Die Opferung aller überlebenden Mäuse erfolgte am 15. Tag nach Infektion.

2.5 Infektion

Nach einer intraperitonealen Anästhesie mit 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin sowie 10 mg/kg KG Xylazin pro Maus und der Verdünnung der Bakteriensuspension auf die gewünschte Erregerkonzentration erfolgte die intrazerebrale Infektion. Anhand einer gedachten Linie zwischen rechtem Ohr und rechtem Auge erfolgte zwischen dem vorderen und mittleren Drittel die Injektion von 10 µl Inokulum mithilfe einer 26 Gauge (G) Kanüle in das Frontalhirn. Um die Injektionstiefe oberflächlich zu halten, wurde sie mithilfe eines Abstandshalters (eine auf die Kanüle platzierte gekürzte Plastik-Schutzkappe) auf 2 mm standardisiert. In Vorversuchen wurde die Erregerdosis bestimmt, nach deren intrazerebraler Injektion 50 % der jungen Mäuse verstarben (mittlere letale Dosis 50, LD₅₀). Diese Dosis wurde für Überlebensversuche verwendet und belief sich auf 10⁵ kolonie-bildende Einheiten (*colonie forming units*, CFU) *E. coli*-K1 und 40 CFU *S. pneumoniae*-SP3 pro Maus. Für die Versuche über 24 Stunden wurde eine zu 100 % zur Erkrankung führende Dosis von *E. coli*-K1 gewählt, welche 7,5x10⁵ CFU pro Maus entsprach.

2.6 Monitoring

2.6.1 Gewicht

Die Mäuse wurden einzeln auf einer elektronischen Tischwaage gewogen und das Gewicht wurde notiert. Ab einer Gewichtsabnahme von mehr als 15 % des Ausgangsgewichtes wurden die Mäuse aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet. Eine bereits tot im Käfig aufgefundene Maus wurde nicht mehr gewogen.

2.6.2 Klinischer Score

Während eines Infektionsversuches wurde der Gesundheitszustand der Mäuse anhand eines klinischen Scores (siehe Tabelle 2) beurteilt. Ab einem klinischen Score von 3 wurden die Mäuse aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet. Lag eine Maus zum Zeitpunkt des Monitorings tot im Käfig, wurde dies notiert und der Score 4 vergeben.

Score	Klinische Symptomatik
0	Maus gesund
1	Maus kränklich, verlangsamt
2	Maus lethargisch, aber gehfähig
3	Maus lethargisch und nicht mehr gehfähig
4	Maus tot

Tabelle 2: **Klinischer Score zum Monitoring der Mäuse.**

2.6.3 Motorische Testung

Zur Überprüfung motorischer Fertigkeiten zu Beginn und im Verlauf eines Infektionsversuches wurden die Mäuse einem Seiltest unterzogen. Der Seiltest wurde erstmals von Miquel und Blasco beschrieben (Miquel und Blasco 1978). Hierzu wurde ein 60 cm langes Seil 60 cm über den Boden zwischen zwei Ständern aufgespannt. An den Enden des Seiles war jeweils eine Plattform befestigt, welche die Mäuse durch Klettern am Seil erreichen konnten. Im Vorfeld eines Infektionsversuches wurde den Mäusen mindestens dreimalig entlang des Seiles der Weg zu den Plattformen gezeigt. Mit Versuchsbeginn wurden die Mäuse nur mit den Vorderpfoten hängend auf die Mitte des Seiles platziert und die Zeit bis zum Erreichen einer Plattform gestoppt (maximal 60 Sekunden). Waren die Mäuse nicht in der Lage, durch Klettern am Seil eine der Plattformen zu erreichen, wurde die Zeit gestoppt, die die Mäuse am Seil hängen bleiben konnten, bevor sie vom Seil fielen (maximal 60 Sekunden). Die gemessenen Zeiten

wurden in einen Score umgewandelt (siehe Tabelle 3).

Maus erreicht Plattform	Score	Maus erreicht Plattform nicht (Zeit bis zum Fallen vom Seil)	Score
< 6 sec	0	> 60 sec	10
< 12 sec	1	> 54 sec	11
< 18 sec	2	> 48 sec	12
< 24 sec	3	> 42 sec	13
< 30 sec	4	> 36 sec	14
< 36 sec	5	> 30 sec	15
< 42 sec	6	> 24 sec	16
< 48 sec	7	> 18 sec	17
< 54 sec	8	> 12 sec	18
< 60 sec	9	> 6 sec	19
		< 6 sec	20

Tabelle 3: **Seiltestscore zum Monitoring der Mäuse.**

2.7 Gewebepräparation und Aufarbeitung

2.7.1 Präparation des Gehirns

Nach zervikaler Dislokation erfolgte die Abtrennung des Kopfes der Maus. Danach wurde das Fell am Kopf mit 70% Ethanol desinfiziert und anschließend die Schnauze mit einer groben Schere kurz vor den Augen abgetrennt sowie das Fell am Kopf entfernt. Anschließend wurde die Schädelkalotte mithilfe einer Pinzette vorsichtig von vorne nach hinten abgelöst und das nun freipräparierte Gehirn mitsamt Kleinhirn von der Schädelbasis entfernt und auf einem Präparierbrett abgelegt. Danach erfolgte die Aufteilung des Gehirns mithilfe eines Skalpell wie in Abb. 2 dargestellt.

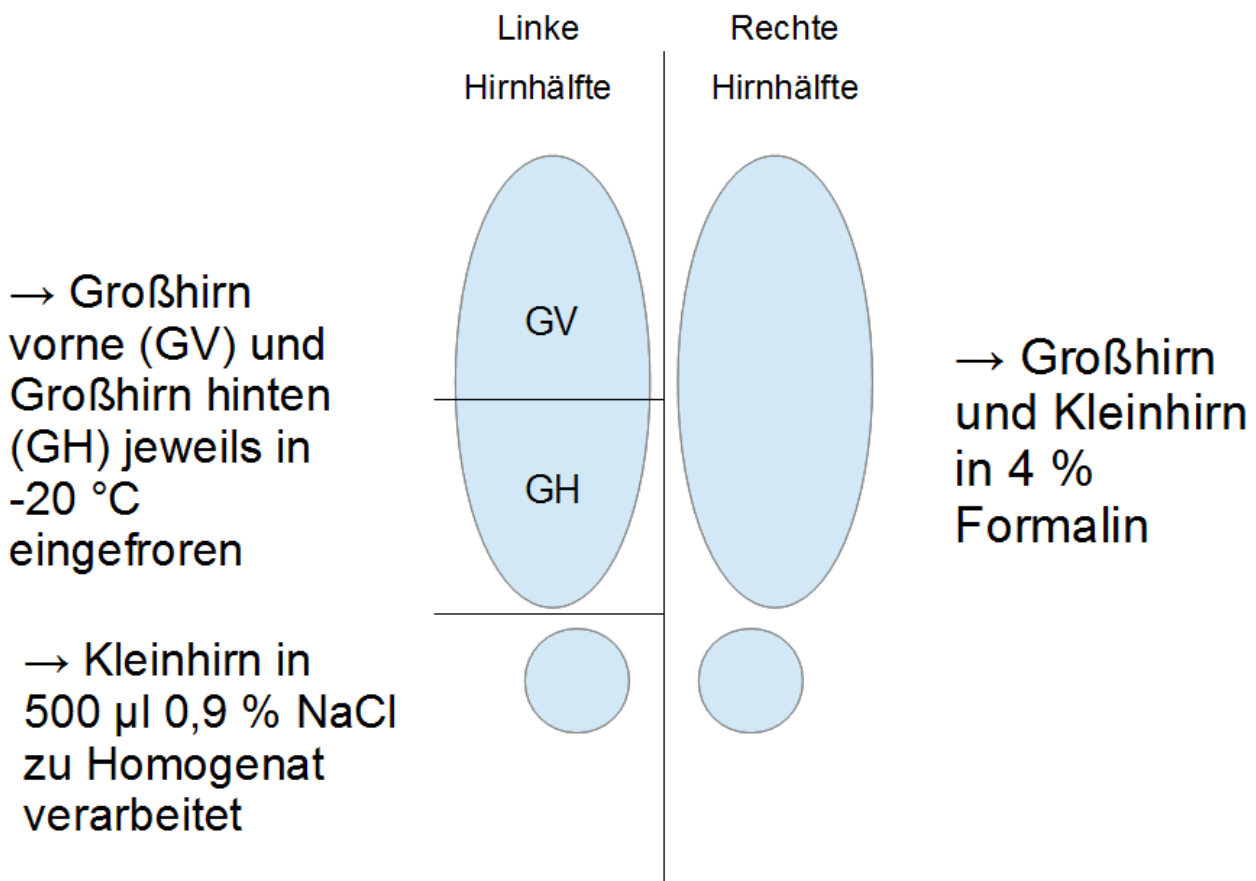


Abb. 2: **Gewebepräparation des Mäusegehirns.** Die rechte Gehirnhälfte wurde in Formalin fixiert. Die linke Gehirnhälfte wurde wie folgt aufgeteilt: Das Großhirn vorne und das Großhirn hinten wurden jeweils in Eppendorf-Cups bei -20 °C eingefroren; das Kleinhirn wurde in 500 µl 0,9 % NaCl-Eppendorf-Cup überführt und homogenisiert. Das Kleinhirnhomogenat wurde nach Quantifizierung der Bakterienzahl in -20 °C eingefroren.

2.7.2 Einbettung der rechten Gehirnhälfte und Anfertigung von Gewebsschnitten

Nachdem die gesamte rechte Gehirnhälfte inklusive Kleinhirn für mindestens 48 Stunden in 4 % Formalin fixiert wurde, erfolgte die zweistündige Herauswaschung des Formalins mittels Wasser. Anschließend wurden die Gewebstücke vollautomatisch über 16 Stunden mithilfe eines Einbettautomaten in Paraffin eingebettet. Danach wurden die mit flüssigem Paraffin durchtränkten Gewebstücke an der Eingießstation in ein Gießschälchen gelegt, erneut mit flüssigem Paraffin übergossen und so ein Paraffinblock hergestellt, wobei die Einbettkassette den Boden bildete. Von diesem Paraffinblock wurden nach dem Abkühlen mithilfe eines Mikrotoms 3 µm feine Schnitte erstellt, im 40 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf einen Objektträger gebracht.

2.7.3 Präparation der Milz

Nach Desinfektion erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle über einen linksseitigen abdominalen Schnitt. Die Milz wurde heraus präpariert und in zwei gleich große Teile

aufgeteilt. Eine Hälfte wurde zur Herstellung eines Homogenates in 500 µl 0,9 % NaCl gegeben, die andere Hälfte in Eppendorf-Cups bei -20 °C eingefroren.

2.7.4 Homogenisierung des Kleinhirns und der Milz

Zur Herstellung der Homogenate wurden die Hälfte des Kleinhirns sowie der Milz in je 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung überführt. In Vorversuchen konnte das Gewicht einer Kleinhirn- bzw. Milzhälfte auf im Durchschnitt 50 mg bestimmt werden, so dass durch die Herstellung des Homogenates eine 1:10-Verdünnung der Gewebe entstand. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung mithilfe eines Handhomogenisators aus Plastik, welcher zwischen der Anwendung an unterschiedlichen Proben desinfiziert und nachfolgend mit sterilem destilliertem Wasser abgespült wurde. Die Homogenate wurden nach Bestimmung der Bakterienkonzentration (siehe 2.8) bei -20 °C eingefroren.

2.7.5 Blutentnahme

Je nach Versuchsaufbau wurde den Mäusen 24-30 Stunden nach Infektion Blut abgenommen. Dies erfolgte aus dem rechten retrobulbären Plexus mithilfe einer Mikro-Hämatokrit-Kapillare. Dabei wurden maximal 5 Tropfen Blut gewonnen, um die Mäuse nicht zu schwächen. Anschließend erfolgte eine sofortige 1:10-Verdünnung von 10 µl des Blutes in 90 µl 0,9 % NaCl in Eppendorf-Cups, um die Gerinnung zu vermeiden. Bei Versterben der Mäuse im Verlauf des Versuches wurde nach Abtrennung des Kopfes Blut aus der Wunde gewonnen.

2.7.6 Gewinnung von Serum

Die Blutproben wurden für mindestens 30 Minuten im Kühlschrank stehen gelassen, um die Koagulation zu begünstigen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C und 3000 g. Danach wurde das Serum abpipettiert und bis zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen bei -20 °C eingefroren.

2.8 Bestimmung der Bakterienkonzentrationen

Nach Herstellung der Homogenate bzw. nach Blutentnahme erfolgten serielle 1:10-Verdünnungen in 0,9 % NaCl in 7 Schritten (wie in Abb. 3 dargestellt) und die anschließende quantitative Ausplattierung auf Schafsblut-Agarplatten. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C wurden die gewachsenen Kolonien auf den Agarplatten gezählt und daraus die Bakterienkonzentrationen in CFU/ml Kleinhirn bzw. Milz bzw. Blut bestimmt. Das Detektionslimit lag im Kleinhirn, in der Milz und im Blut bei

1.000 CFU/ml Kleinhirn bzw. Milz bzw. Blut. Bei Opferung der überlebenden Mäuse im 15 Tage-Versuch wurde das Detektionslimit im Kleinhirn und in der Milz auf 100 CFU/ml Kleinhirn bzw. Milz durch Ausplattieren von 100 μ l Homogenat erniedrigt.

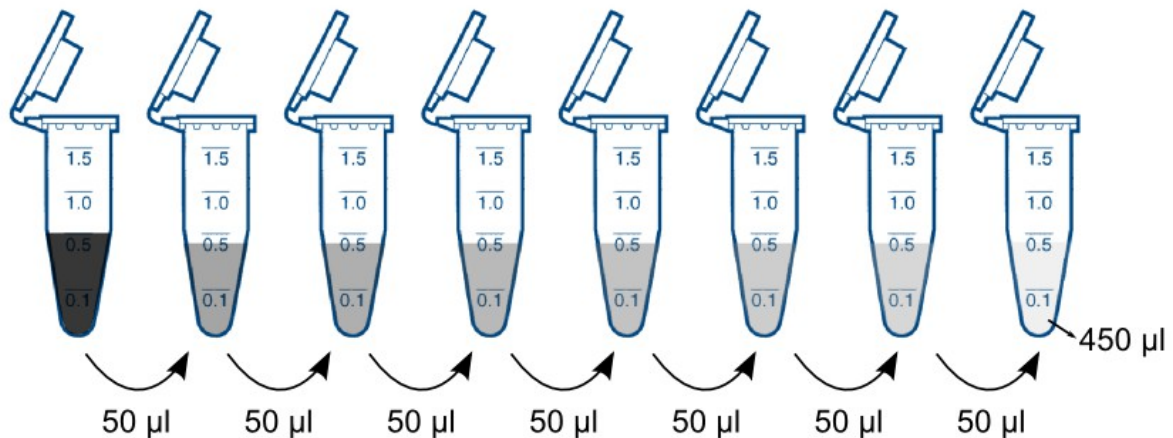


Abb. 3: **Serielle 1:10-Verdünnung der Kleinhirn- und Milzhomogenate sowie des Blutes.** Jeweils 50 μ l wurden in Eppendorf-Cups mit 450 μ l 0,9 % NaCl-Lösung überführt, anschließend vorsichtig durchmischt und erneut in 450 μ l NaCl-Lösung überführt. Anschließend erfolgte die quantitative Ausplattierung auf Schafsblutagarplatten.

2.9 ELISA

Mithilfe des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurden die Zyto- und Chemokine im Serum der Mäuse 24 bzw. 30 Stunden nach Infektion sowie in den Kleinhirn-Homogenaten quantifiziert. Dies erfolgte mittels eines nicht-kompetitiven Sandwich-ELISA, wobei ein erster Antikörper (Capture-Antikörper) das Analyt an einem 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 wurden *well*-Platten mit dem Capture-Antikörper beschichtet. Dabei wurde der Antikörper nach den Herstellerangaben für den jeweiligen ELISA angesetzt, mit PBS verdünnt und davon je 50 μ l 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 Wasch-Puffer und anschließend die Hinzugabe von 300 μ l Reagent Diluent 1 pro *well* und die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Währenddessen wurde das Analyt je nach der zu erwartenden Höhe der Zytokin- bzw. Chemokinwerte mit Reagent Diluent 1 verdünnt. 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 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 (*horseradish peroxidase*)-Diluent 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 *wells* dazugegeben und nach Beobachtung eines deutlichen blauen Farbumschlages des höchsten Standards mit je 50 µl Stopplösung pro *well* gestoppt. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei 450 nm mithilfe eines Mikroplatten-Readers innerhalb von maximal 30 Minuten. Die unterste Nachweisgrenze wurde durch den Mittelwert der Messwerte des untersten Standards für jede Messung berechnet. Werte, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurden durch den Wert der untersten Nachweisgrenze ersetzt.

2.10 Histologie

2.10.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist ein Standardverfahren, um verschiedene Strukturen eines Gewebeschnittes anzufärben. Dabei werden die namensgebenden Farbstoffe verwendet. Hämatoxylin ist ein natürlicher basischer Farbstoff, der seine färbenden Eigenschaften nach der Aufbereitung zu Hämalan entwickelt. Er färbt alle sauren (basophilen) Strukturen wie Zellkern und raues endoplasmatisches Retikulum blau. Eosin dagegen wird synthetisch hergestellt, ist sauer und färbt demnach alle basischen (eosinophilen) Strukturen wie Zellplasmaproteine rot (Lüllmann-Rauch 2009).

Die auf den Objektträger überführten Gewebeschnitte der rechten Gehirnhälfte mussten zuerst entparaffiniert werden, was mit einer Behandlung für 3 mal 10 Minuten mit Xylol erfolgte. Anschließend wurden die Schnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 %, 70 % und 50 %) rehydriert und folgend mit destilliertem Wasser gespült. Als nächstes wurden die Schnitte für 5-10 Minuten mit Mayers Hämalanlösung gefärbt, kurz mit destilliertem Wasser gespült und darauffolgend die überschüssige Farbe mithilfe von

HCl-Alkohol-Lösung ausgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut, also damit der Farbumschlag des Hämatoxylin zu blauviolett aufgrund der Erhöhung des pH-Wertes erreicht. Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin-G-Lösung für 5 Minuten unter Zugabe von Eisessig. Nun wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 90 % und 100 %) sowie anschließend 3 mal für 3 Minuten in Xylol getaucht, somit entwässert und damit das Eosin herausgespült. Abschließend erfolgte die Eindeckelung mithilfe des Eindeckmittels DePeX. Damit kann der Schnitt und die Färbung für viele Jahre erhalten bleiben.

2.10.2 Chlorazetatesterase-Färbung

Die Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase-Färbung (CAE-Färbung) gehört zu den enzymhistochemischen Färbungen. Dabei wird der Schnitt mit einem künstlichen, für ein Enzym spezifisches Substrat behandelt, wodurch am Ort der Enzymaktivität ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht (Lüllmann-Rauch 2009). Im Falle der CAE wird die Chlorazetatesterase-Aktivität, die sich vornehmlich in neutrophilen Granulozyten und schwächer ausgeprägt in Monozyten befindet, in der Farbe pink dargestellt.

Für diese Färbung kam das Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase Kit von Sigma-Aldrich zum Einsatz, wobei alle Reagenzien bereits gebrauchsfertig geliefert wurden. Die auf den Objektträger überführten Schnitte wurden vorerst mithilfe von Xylol entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe bewässert. Parallel dazu erfolgte die Erwärmung aller Reagenzien auf Raumtemperatur. Für jeweils 14 Schnitte erfolgte dann die Spülung mit 40 ml destilliertem Wasser. Darauffolgend wurde 1 ml Natriumnitrit-Lösung und 1 ml Fast-Red Violet LB Standardlösung dazugegeben und gemischt. Anschließend wurden dazu 5 ml TRIZMAL[™] 7,3 Pufferkonzentrat gegeben und gemischt. Danach erfolgte die Mischung mit 1 ml Naphthol AS-D Chlorazetat-Lösung, wobei es zu einem Rotumschlag kam. Die Schnitte wurden dann für 30 min bei 37 °C in dieser Mischung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Spülung mit destilliertem Wasser und die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Lösung Gill Nr. 3 gegengefärbt. Schließlich wurden die Schnitte mittels Aquatex eingedeckelt.

2.10.3 Beurteilung der histologischen Schnitte mithilfe des meningealen Inflammationsscores

Zur Beurteilung des Ausmaßes der Entzündung in den Mäusegehirnen erfolgte die Chlorazetatesterase-Färbung, um anschließend mittels des meningealen Inflammationsscores die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Subarachnoidalraum und

ins Hirngewebe zu quantifizieren. Dabei wurden die Schnitte der rechten Gehirnhälfte auf Höhe der hippokampalen Strukturen untersucht. Das Großhirn wurde in fünf meningeale Regionen (M1-M5) eingeteilt und in 40-facher Vergrößerung mithilfe des unter Tabelle 4 und Abb. 4 gezeigten Scores beurteilt. Vier Regionen stellten die Situation an der Konvexität des Großhirns dar, wobei M1 oberhalb des Gyrus dentatus, M2 auf Höhe des Ammonshorns, M4 am unteren Großhirnpol und M3 zwischen M2 und M4 lag. Die fünfte Region (M5) entsprach den Meningen am Eingang zur hippokampalen Fissur. Wenn die Arachnoidea auf dem Präparat nicht vorhanden war, wurde kein Wert vergeben. Anschließend erfolgte die Berechnung des Mittelwertes der Scores aller fünf Regionen.

Score	Anzahl der neutrophilen Granulozyten
0	0
1	1 bis 10
2	11 bis 50
3	über 50

Tabelle 4: **Meningealer Inflammationsscore.**

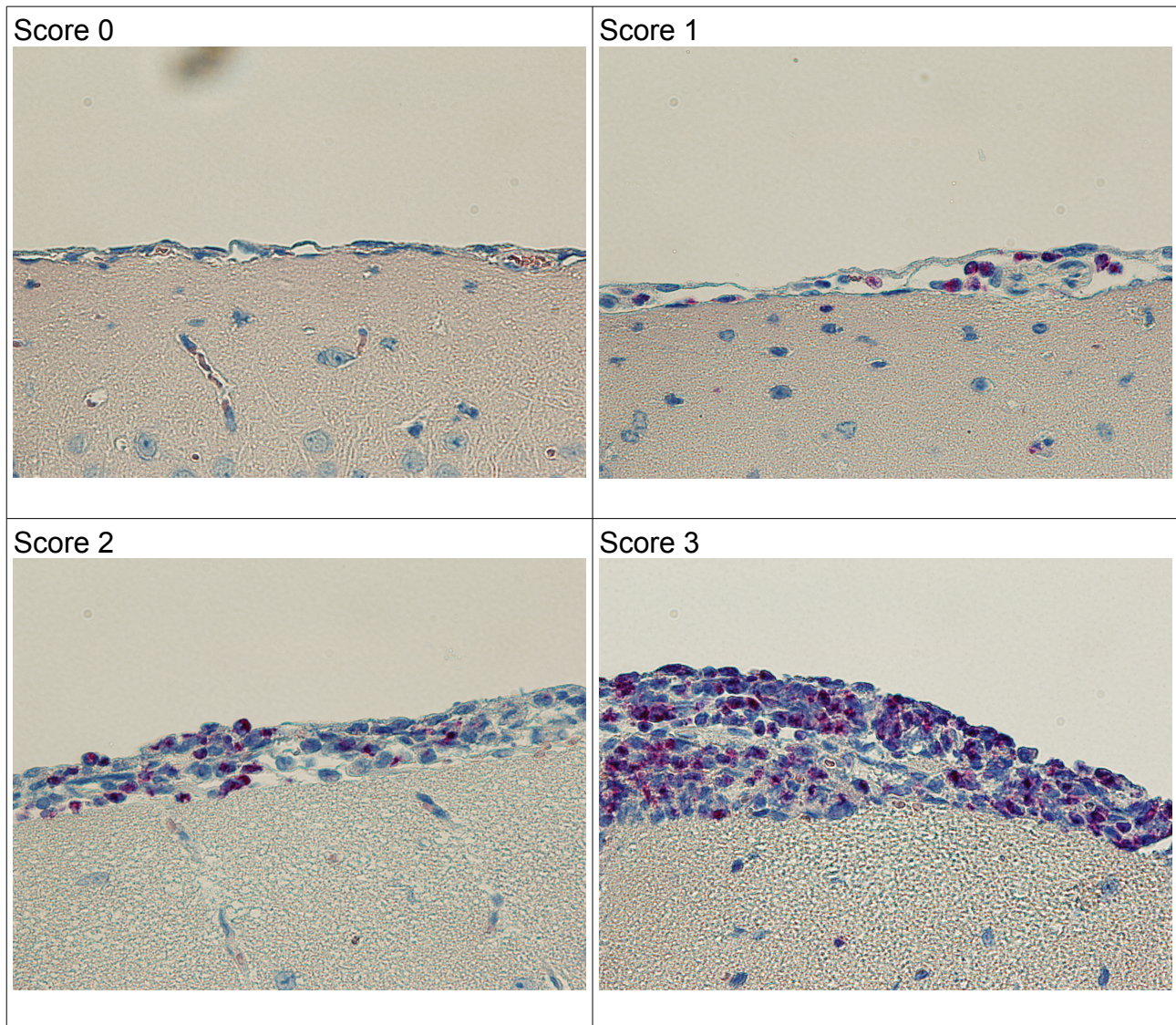


Abb. 4: **Meningealer Inflammationsscore in histologischen Schnittbildern.** Dargestellt ist die meningeale Region M1 einer Großhirnhälfte unterschiedlicher Mäuse gefärbt mittels Chloroacetatesterase-Färbung in 40-facher Vergrößerung. Dabei sind neutrophile Granulozyten pink angefärbt und ebenfalls durch ihre Kernlappung zu erkennen.

2.11 Statistik

Zur statistischen Auswertung sowie zur grafischen Darstellung der Versuche wurde die GraphPad Prism 5.0 Software verwendet. Parametrisch verteilte Daten wurden als Mittelwert plus Standardabweichung dargestellt. Ein Vergleich zweier Gruppen mit parametrisch verteilten Werten erfolgte mittels Student's-t-Test. Ein Vergleich von mehreren parametrisch verteilten Gruppen erfolgte mittels *analysis of variance* (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni-Post-Test. Nicht-parametrisch verteilte Daten wurden als Median plus 25./75. Perzentile dargestellt. Ein Vergleich zweier nicht-parametrisch verteilter Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Ein Vergleich von mehreren nicht-parametrisch verteilten Gruppen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von

Dunn's-multiple-comparison-Test. Korrelationen von nicht-parametrisch verteilten Variablen erfolgte mittels Rangkorrelation nach Spearman. Zum Vergleich der Überlebensraten zweier Gruppen wurden die Kaplan-Meier-Kurven mithilfe des Logrank-Tests verglichen. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ und *** $p<0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Intrazerebrale *E. coli*-Infektionen bei jungen und alten Mäusen

3.1.1 Klinische Symptome und Entzündungsparameter im Verlauf einer intrazerebralen *E. coli*-Infektion

Um den Verlauf einer intrazerebralen (i.c.) *E. coli*-Infektion zwischen alten und jungen Mäusen zu vergleichen, wurden in zwei unabhängigen Versuchen 22 C57BL/6N-Mäuse im Alter von $26,2 \pm 2,3$ Monaten („alte Mäuse“) und 26 C57BL/6N-Mäuse im Alter von $2,2 \pm 0,3$ Monaten („junge Mäuse“) mit je 90.000 CFU im ersten sowie 100.000 CFU *E. coli* K1 im zweiten Versuch i.c. infiziert.

3.1.1.1 Überleben

Alle an der Infektion verstorbenen Mäuse verstarben innerhalb von 96 Stunden nach Infektion, wobei die jungen Mäuse innerhalb von 54 bis 96 Stunden und die alten Mäuse innerhalb von 24 bis 84 Stunden nach Infektion verstarben. Insgesamt wiesen die alten Mäuse im Vergleich zu den jungen Mäusen eine höhere Sterblichkeit auf. So starben 16 von 22 alten Mäusen (73 %) , allerdings nur 12 von 26 jungen Mäuse (46 %) (siehe Abb. 5). Die Kaplan-Meier-Kurven der jungen und der alten Mäuse unterschieden sich signifikant (** $p=0,0025$).

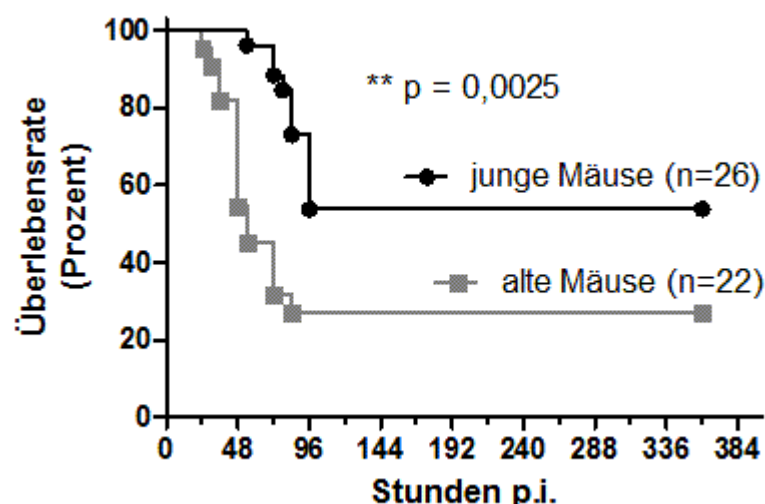


Abb. 5: Kaplan-Meier-Kurven für junge und alte Mäuse nach i.c. *E. coli*-K1-Infektion. Es fand sich ein signifikanter Unterschied (** $p=0,0025$) mit einer höheren Sterblichkeit der alten Mäuse (73 %) im Gegensatz zu den jungen Mäusen (46 %). Gemeinsame Darstellung zweier unabhängiger Versuche. Die überlebenden 14 jungen und 6 alten Mäuse wurden 15 Tage *post infectionem* (p.i.) geopfert.

3.1.1.2 Gewicht

Vor der Infektion unterschieden sich die Gewichte von jungen und alten Mäusen deutlich ($***p < 0,0001$) mit einem Ausgangsgewicht von $23,2 \pm 3,4$ g der jungen und von $32,8 \pm 5,2$ g der alten Mäuse. Beide Gruppen nahmen in der akuten Phase der Infektion an Gewicht ab, das Maximum der Gewichtsabnahme zeigte sich nach 60 h bei den jungen (Gewicht $20,1 \pm 4,6$ g) und nach 48 h bei den alten (Gewicht $27,7 \pm 5,4$ g) Mäusen. Innerhalb von 24 Stunden p.i. nahmen die alten Mäuse mehr Gewicht ab ($2,5 \pm 1,1$ g) als die jungen ($1,9 \pm 0,9$ g) Mäuse (Differenz Gewicht 0 bis 24 Stunden, $*p = 0,022$) (Abb. 6).

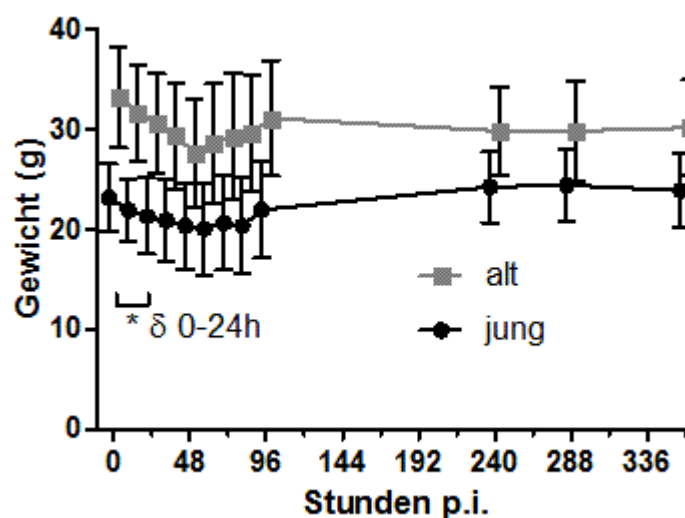


Abb. 6: **Verlauf des Gewichtes bei alten und jungen Mäusen nach Infektion mit *E. coli*-K1 i.c.** Dabei wurden die Gewichte der Mäuse bis zum Todeszeitpunkt in die Auswertung und die Abbildung einbezogen, so dass zu Anfang 22 alte und 26 junge Mäuse und ab 96 Stunden 6 alte und 14 junge Mäuse gewogen wurden. Bei den alten Mäusen zeigte sich eine signifikant höhere Abnahme des Gewichtes innerhalb von 24 Stunden im Vergleich zu den jungen Mäusen ($*p = 0,022$). Darstellung als Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

3.1.1.3 Klinische Symptomatik

Beim Vergleich der Zeiten bis zum Erreichen der verschiedenen klinischen Scores bei alten ($n = 16$) und jungen ($n = 12$) innerhalb von 96 Stunden nach Infektion verstorbenen Mäusen, zeigte sich, dass die alten Mäuse früher eine Gesundheitsverschlechterung aufwiesen als die jungen Mäuse. Die Zeit, welche bis zum Erreichen des klinischen Scores 1 verstrich, unterschied sich nicht zwischen den alten (30 [24/39] h) und jungen Mäusen (36 [36/60] h) ($p = 0,13$). Allerdings erreichten die alten Mäuse signifikant früher den Score von 2 (alt: 36 [36/60] h, jung: 60 [48/72] h, $**p = 0,0063$) sowie einen Score von 3/4 (alt: 48 [39/69] h, jung: 84 [75/96] h, $***p = 0,0003$) als die jungen Mäuse (Abb. 7).

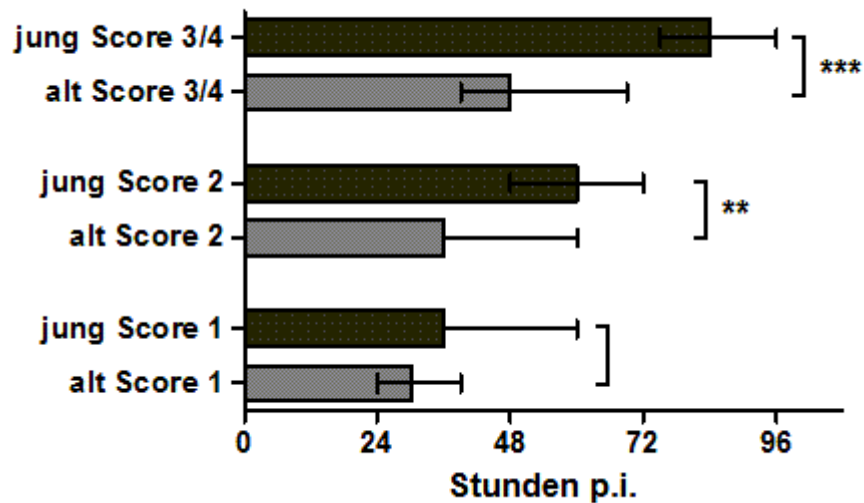


Abb. 7: **Zeit bis zum Erreichen des Scores 1, 2 oder 3/4 bei jungen und alten nach i.c. Infektion mit *E. coli*-K1 verstorbenen Mäusen.** Die alten Mäuse (n=16) erreichten signifikant früher einen klinischen Score von 2 (**p=0,0063) bzw. einen Score von 3/4 (**p=0,0003) als die jungen Mäuse (n=12). Die Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen verglichen und dargestellt als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.1.1.4 Motorische Fähigkeiten

Im Seilttest waren die alten Mäuse zu Versuchsbeginn nach Training am Punkt 0 Stunden signifikant schlechter als die jungen Mäuse mit einem Seilttestscore von 16 (10/18) der alten versus 1 (1/2) der jungen Mäuse (**p<0,0001).

Die motorischen Fähigkeiten aller erkrankten Mäuse verschlechterten sich innerhalb der akuten Infektion bis zum Tod. Im Vergleich des Seilttestscores zwischen den alten an der Infektion verstorbenen (n=16) Mäusen (17 [14/19]) mit den alten überlebenden (n=6) Mäusen (13 [8/16]) zum Zeitpunkt 0 Stunden zeigte sich, dass die an der Infektion verstorbenen alten Mäuse tendenziell schlechtere motorische Fähigkeiten zum Zeitpunkt 0 Stunden aufwiesen als die alten überlebenden Mäuse (p=0,075). Die jungen an der Infektion verstorbenen (n=12) Mäuse zeigten zum Zeitpunkt 0 Stunden (2 [1/3]) bezüglich des Seilttestscores keinen Unterschied (p=0,18) zu den jungen überlebenden (n=14) Mäusen (1 [1/1]) (Abb. 8).

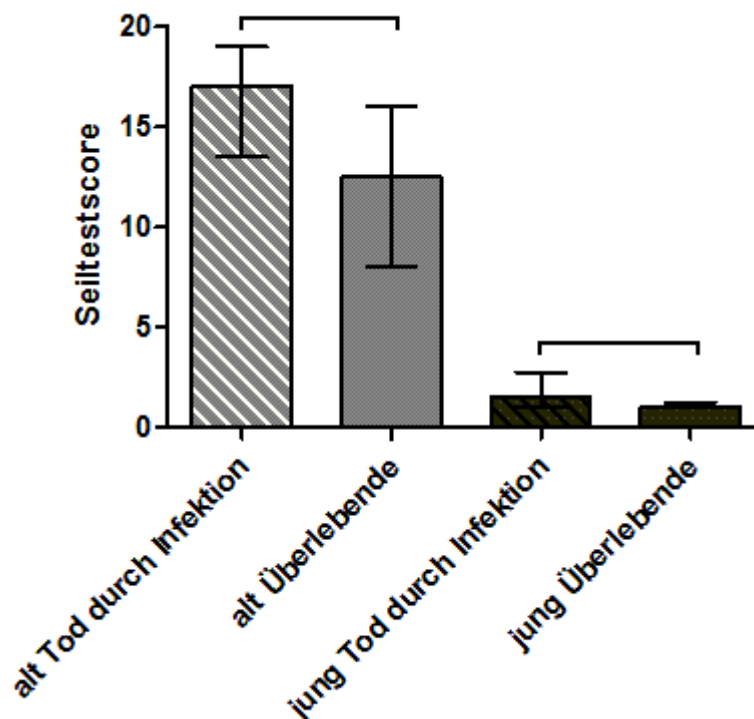


Abb. 8: Vergleich der motorischen Fähigkeiten zu Beginn des Versuches der alten an der Infektion verstorbenen und alten überlebenden Mäuse sowie der jungen an der Infektion verstorbenen und jungen überlebenden Mäuse nach i.c. Infektion mit *E. coli-K1*. Die alten an der Infektion verstorbenen Mäuse (n=16) zeigten tendenziell schlechtere motorische Fähigkeiten als die alten überlebenden Mäuse (n=6) zu Beginn des Versuches (p=0,075). Die jungen an der Infektion verstorbenen Mäuse (n=12) unterschieden sich nur minimal von den jungen überlebenden Mäusen (n=14) zu Beginn des Versuches (p=0,18). Darstellung als Medianen und 25./75. Perzentilen.

3.1.1.5 Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut

Bakterienkonzentrationen im Blut 24 Stunden nach Infektion

Bei der Hälfte der Mäuse erfolgte 24 Stunden p.i. eine Blutentnahme. Die Konzentrationen für *E. coli-K1* im Blut der alten (3.000 [999/9.500] CFU/ml) und jungen (999 [999/4.000] CFU/ml) Mäuse waren nicht signifikant unterschiedlich (p=0,12).

Bakterienkonzentrationen zum Zeitpunkt des Versterbens an der Infektion

Die Mäuse, die durch die Infektion verstarben, unterschieden sich zum Zeitpunkt des Todes weder bezüglich der Bakterienkonzentration im Kleinhirn (p=0,46) noch in der Milz (p=0,095) voneinander. So zeigten die 12 verstorbenen jungen Mäuse im Kleinhirn eine Bakterienkonzentration von 50.000.000 (2,4/89.000.000) CFU/ml; die 16 verstorbenen alten Mäuse zeigten im Kleinhirn eine Bakterienkonzentration von 28.000.000 (6.000.000/120.000.000) CFU/ml. In der Milz befanden sich Bakterienkonzentrationen bei

den jungen Mäuse von 1.900.000 (130.000/9.300.000) CFU/ml und bei den alten Mäusen von 10.000.000 (1.000.000/85.000.000) CFU/ml.

Bei 9 von 12 jungen und 12 von 16 alten an der Infektion verstorbenen Mäusen wurde nach dem Versterben Blut entnommen und quantitativ ausplattiert (siehe Abb. 9). Dabei zeigten sich bei den verstorbenen alten (5.000.000 [1.600.000/18.000.000] CFU/ml) Mäusen signifikant höhere Bakterienkonzentrationen im Blut als bei den verstorbenen jungen (10.000 [3.000/100.000] CFU/ml) Mäusen (**p=0,0014).

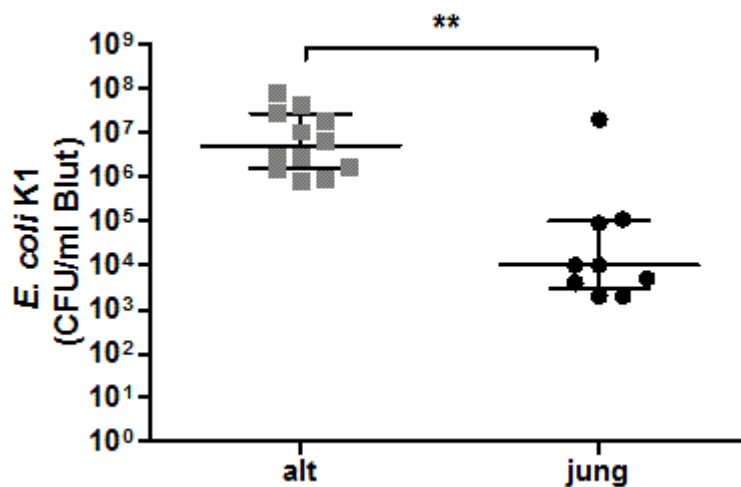


Abb. 9: **Bakterienkonzentrationen im Blut zum Zeitpunkt des Todes durch i.c. Infektion mit *E. coli*-K1 bei jungen und alten Mäusen.** Die akut verstorbenen alten Mäuse (n=12) wiesen im Blut signifikant höhere Bakterienkonzentrationen als die akut verstorbenen jungen Mäuse (n=9) auf (**p=0,0014). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

Bakterienkonzentrationen der überlebenden Mäuse nach 15 Tagen

Die überlebenden Mäuse wurden am 15. Tag p.i. geopfert. Dabei wiesen die alten Mäuse signifikant höhere Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn (Abb. 10 A) und in der Milz (Abb. 10 B) als die jungen Mäuse auf (Kleinhirn **p=0,0094, Milz **p=0,0059). So konnte bei 7 der 14 überlebenden jungen Mäuse weder im Kleinhirn noch in der Milz *E. coli*-K1 nachgewiesen werden und die übrigen überlebenden jungen Mäuse wiesen eine geringe Bakterienkonzentration von ≤ 1.000 CFU/ml auf. Bei den überlebenden alten Mäusen war hingegen nur eine von 6 Mäusen steril und die übrigen überlebenden alten Mäuse wiesen eine Bakterienkonzentration von ≥ 1.000 CFU/ml auf.

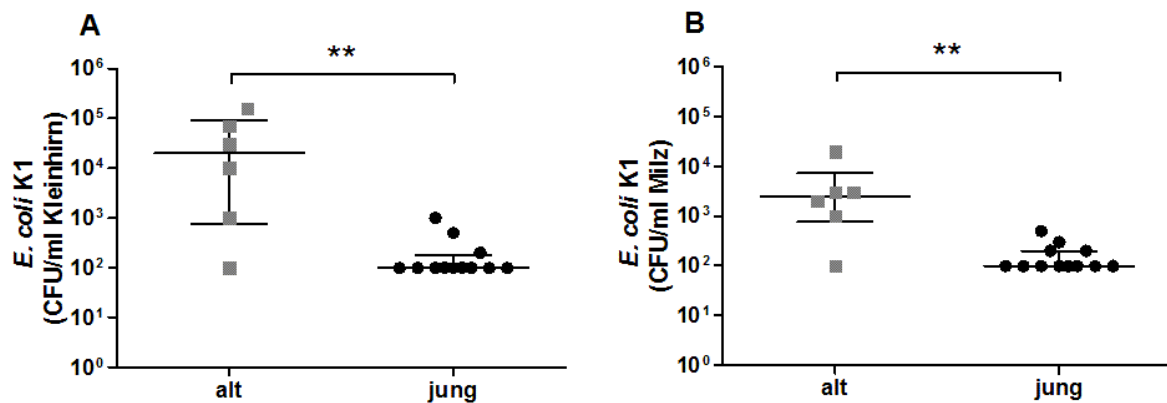


Abb. 10: **Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn (A) und der Milz (B) bei jungen und alten Mäusen 15 Tage nach Infektion mit *E. coli*-K1 i.c.** Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Bakterienkonzentrationen bei jungen ($n=12$) und alten ($n=6$) Mäusen mit höheren Werten der alten Mäuse im Kleinhirn (** $p=0,0094$) und in der Milz (** $p=0,0059$). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.1.1.6 Zytokinkonzentrationen im Serum 24 Stunden nach Infektion

Bei der Hälfte aller Mäuse wurde im Serum 24 Stunden p.i. die Zytokinkonzentration mithilfe von ELISA gemessen. Dabei fanden sich keine Unterschiede zwischen alten und jungen Mäusen.

Die IL-6-Konzentrationen im Serum bei jungen ($190,8$ [$71/1.856$] pg/ml) und alten ($307,8$ [$90,6/550,4$] pg/ml) Mäusen unterschieden sich nicht ($p=0,98$). Dabei lag die Nachweisgrenze bei 71 pg/ml Serum.

Die TNF- α -Konzentration im Serum aller jungen Mäuse sowie im Serum von 11 von 12 der alten Mäuse lag unterhalb der Nachweisgrenze von $72,4$ pg/ml Serum.

Die Konzentration von IL-10, einem antiinflammatorischen Zytokin, im Serum aller jungen und aller alten Mäuse lag unterhalb der Nachweisgrenze von 77 pg/ml Serum. Aus diesem Grund wurde in späteren Untersuchungen stattdessen das Chemokin KC (*chemokine ligand 1* [CXCL1]) gemessen.

Weitere Zytokinmessungen waren aufgrund der geringen Menge an Serum nicht möglich.

3.1.1.7 Meningealer Inflammationsscore

Der meningeale Inflammationsscore gibt die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Subarachnoidalraum und das Hirngewebe wider. Es zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn und meningealem Inflammationsscore bei jungen ($r=0,78$, *** $p<0,0001$) und alten ($r=0,71$, *** $p=0,0002$) Mäusen (siehe Abb. 11).

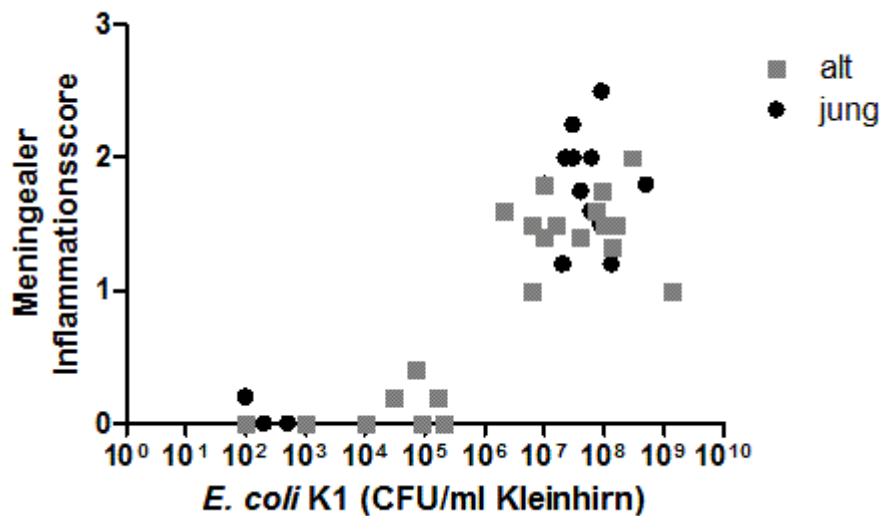


Abb. 11: **Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn mit dem zugehörigen meningealen Inflammationsscore von jungen und alten Mäusen zum Zeitpunkt des Versterbens bzw. der Opferung 15 Tage nach i.c. Infektion mit *E. coli*-K1.** Dabei besteht eine Korrelation zwischen Bakterienkonzentration und meningealem Inflammationsscore bei jungen ($n=26$, $r=0,78$, $***p<0,0001$) und alten ($n=22$, $r=0,71$, $***p=0,0002$) Mäusen. Die alten und jungen Mäuse mit niedriger Bakterienkonzentration im Kleinhirn und niedrigem meningealem Inflammationsscore entsprechen den überlebenden Mäusen.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit einem höheren meningealen Inflammationsscore der jungen an der Infektion verstorbenen (1,8 [1,5/2]) Mäuse im Gegensatz zu den alten an der Infektion verstorbenen (1,5 [1,1/1,6]) Mäuse ($*p=0,025$) sowie eine Tendenz zu erhöhten Werten des meningealen Inflammationsscores bei den alten überlebenden (0,1 [0/0,3]) im Gegensatz zu den jungen überlebenden (0 [0/0]) Mäusen ($p=0,066$) (Abb. 12).

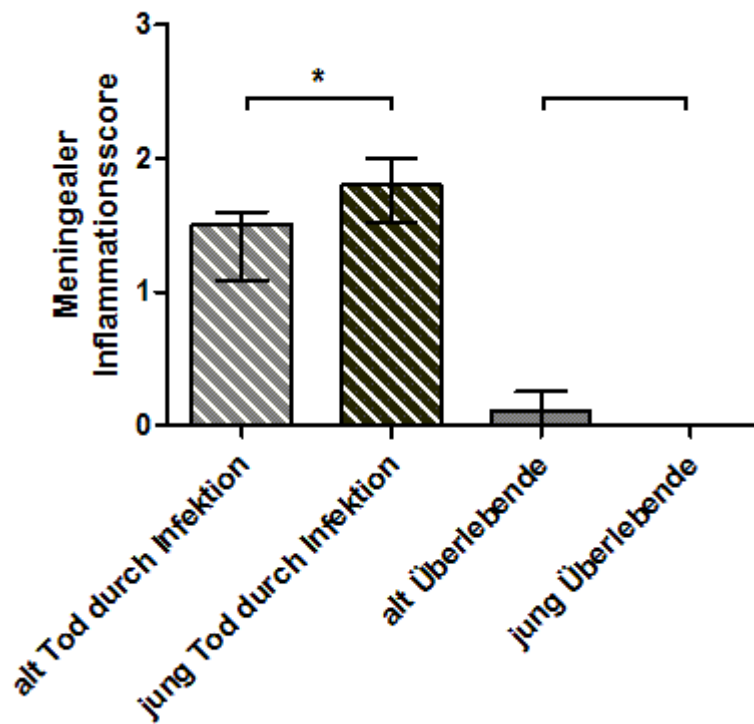


Abb. 12: **Meningealer Inflammationsscore nach i.c. Infektion mit *E. coli*-K1 von jungen und alten C57BL/6N-Mäusen.** Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den an der Infektion verstorbenen alten (n=16) und jungen (n=12) Mäusen (*p=0,025) mit einem höheren meningealen Inflammationsscore bei den jungen Mäusen. Zudem zeigte sich ein tendenziell höherer meningealer Inflammationsscore bei den alten überlebenden (n=6) als bei den jungen überlebenden (n=14) Mäusen (p=0,066). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

In Abb. 13 werden einige Besonderheiten bei der Betrachtung der histologischen Schnitte dargestellt.

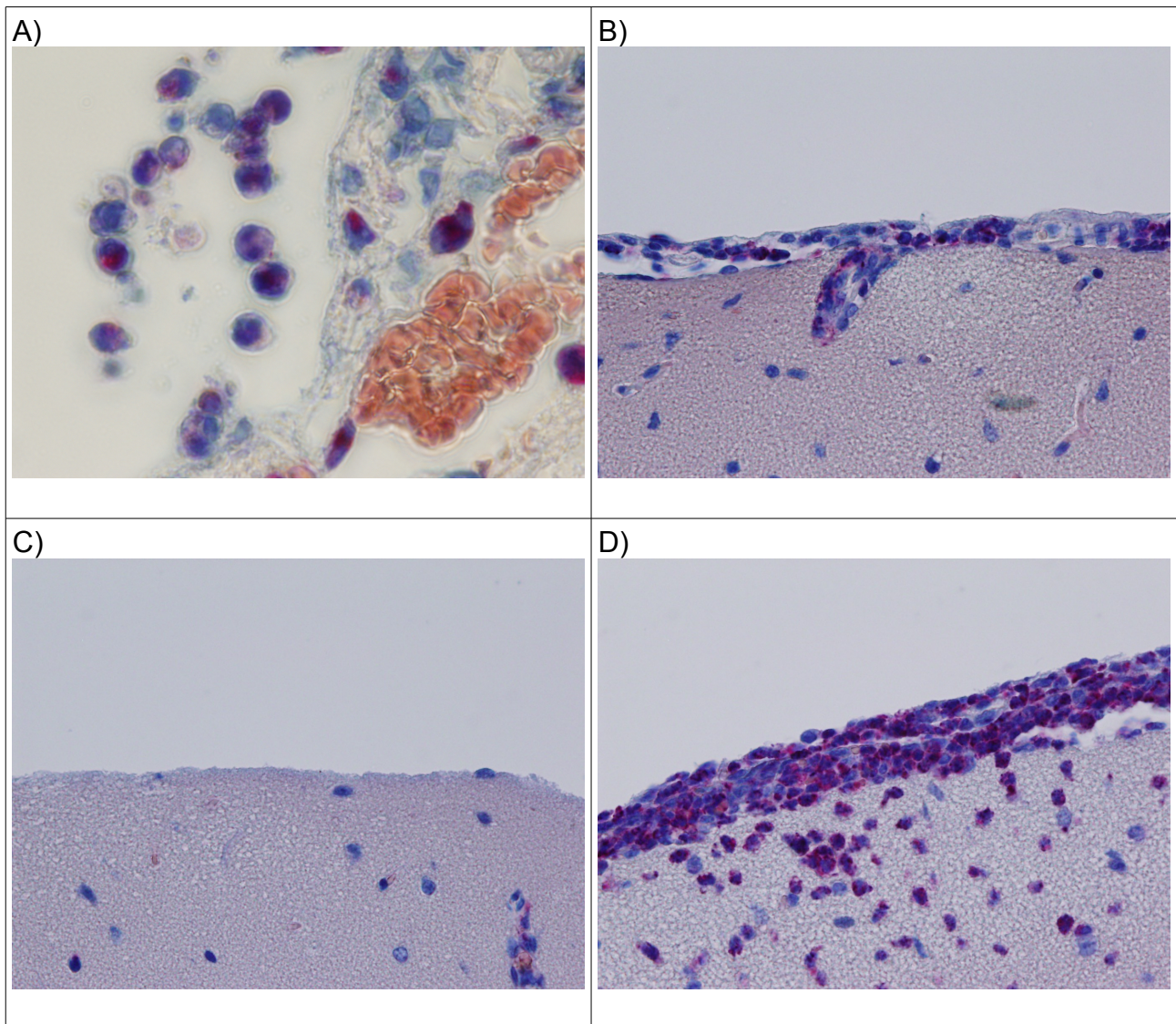


Abb. 13: **Darstellung einer Auswahl an histologischen Schnitten der rechten Großhirnhälfte der Mäuse in CAE-Färbung.** A) Dargestellt ist eine Nahaufnahme von angefärbten neutrophilen Granulozyten neben nicht angefärbten Erythrozyten (100-fache Vergrößerung). B) Dargestellt ist ein Virchow-Robin-Raum mit auf die Meningen begrenzter Einwanderung von angefärbten neutrophilen Granulozyten (40-fache Vergrößerung). C) Aufgrund der Präparation des Mäusehirnes lassen sich in dieser meningealen Region keine Meningen darstellen, somit wurde auch kein meningealer Score vergeben (40-fache Vergrößerung). D) Hier stellt sich der Übergang der Meningitis in eine Meningoenzephalitis mit Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in das Hirnparenchym dar (40-fache Vergrößerung).

3.1.2 Klinische Symptome und Entzündungsparameter in der Akutphase einer tödlichen i.c. *E. coli*-Infektion

Aufgrund des signifikant unterschiedlichen Verlaufes der *E. coli*-K1-Meningitis zwischen jungen und alten Mäusen im Überlebensversuch wurden zum besseren Verständnis des Pathomechanismus der Erkrankung in zwei unabhängigen Versuchen 36 C57BL/6N-Mäuse im Alter von $18,8 \pm 0,9$ Monaten („alte Mäuse“) und 37 C57BL/6N-Mäuse im Alter von $2,8 \pm 0,3$ Monaten („junge Mäuse“) mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von im ersten Versuch 600.000 und im zweiten Versuch 900.000 CFU *E. coli*-K1 i.c. infiziert und nach 24 Stunden geopfert.

3.1.2.1 Gewicht

Es unterschieden sich die alten (Gewicht 36 ± 6 g) und die jungen Mäuse (Gewicht $24,4 \pm 5,1$ g) im Gewicht vor der Infektion signifikant ($p^{***} < 0,0001$) voneinander (Abb. 14 A). Innerhalb der 24 Stunden verloren sowohl die jungen ($3,3 \pm 0,7$ g) als auch die alten Mäuse ($3,4 \pm 0,8$ g) an Gewicht und unterschieden sich bezüglich der Gewichtsabnahme nicht (Differenz Gewicht 0 bis 24 Stunden, $p=0,77$).

3.1.2.2 Klinische Symptomatik

Beim klinischen Score zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den alten und den jungen Mäusen (Abb. 14 B). Der klinische Zustand der alten (1 [0/2]) Mäuse verschlechterte sich innerhalb der 24 Stunden nach Infektion früher und vermehrt als der klinische Zustand der jungen (0 [0/1]) Mäuse (AUC 0 bis 24 Stunden, definierte baseline klinischer Score von 0, $^{***}p < 0,0001$).

3.1.2.3 Motorische Fähigkeiten

Zu Beginn des Versuches zeigten die alten (16 [5/19]) Mäuse im Seilttest signifikant schlechtere Leistungen ($^{***}p < 0,0001$) als die jungen (3 [2/10]) Mäuse (Abb. 14 C). Innerhalb der 24 Stunden p.i. verschlechterten sich die motorischen Fähigkeiten sowohl der alten (20 [20/20]) als auch der jungen (9 [3/18,5]) Mäuse ohne signifikanten Unterschied (Differenz Seilttestscore 0 bis 24 Stunden, $p=0,8$).

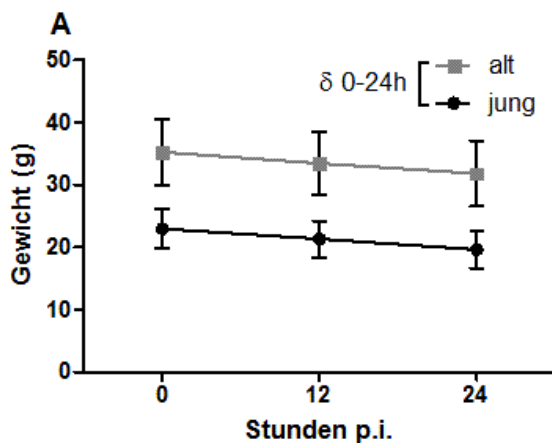
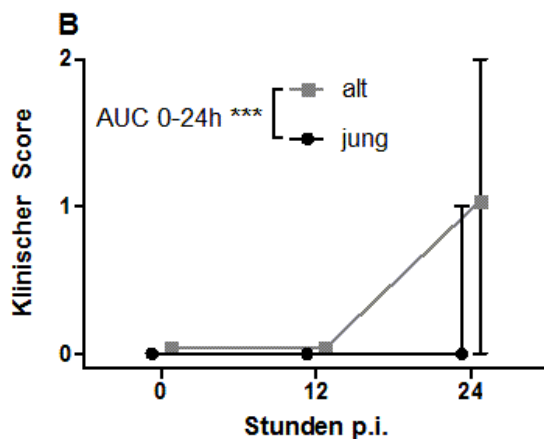
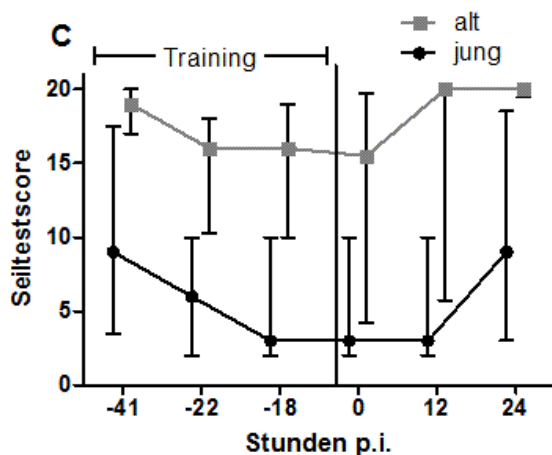


Abb. 14: Verlauf des Gewichtes (A), des klinischen Scores (B) und der motorischen Fähigkeiten (C) innerhalb von 24 h nach Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis *E. coli*-K1 i.c. bei jungen (n=37) und alten (n=36) Mäusen.

A) Bei der Gewichtsabnahme innerhalb von 24 Stunden nach Infektion unterschieden sich die alten Mäuse nicht von den jungen Mäusen ($p=0,77$). Darstellung als Mittelwerte \pm Standardabweichungen.



B) Beim klinischen Score verschlechterten sich die alten Mäuse innerhalb von 24 Stunden signifikant mehr als die jungen Mäuse (AUC 0 bis 24 Stunden, baseline klinischer Score von 0, $***p<0,0001$). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.



C) Zu Beginn des Versuches unterschieden sich die alten Mäuse im Seiltest mit schlechteren motorischen Fähigkeiten signifikant von den jungen Mäusen ($***p<0,0001$). Innerhalb von 24 Stunden zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten zwischen jungen und alten Mäusen (Differenz Seiltestscore 0 bis 24 Stunden, $p=0,8$). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.1.2.4 Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut 24 Stunden nach Infektion

Die Konzentrationen von *E. coli*-K1 im Blut 24 Stunden p.i. unterschieden sich nicht zwischen alten und jungen Mäusen ($p=0,16$). Es zeigte sich eine etwas höhere Bakterienkonzentration im Blut der jungen Mäuse mit 7.000 (999/100.000) CFU/ml im Gegensatz zu 2.000 (999/11.500) CFU/ml der alten Mäuse, dabei waren 12 von 34 alten

Mäusen und 10 von 37 jungen Mäusen steril (Abb. 15 A).

Die *E. coli*-K1-Konzentrationen in der Milz 24 Stunden p.i. waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,2$) mit einer Bakterienkonzentration von 30.000 (10.000/200.000) CFU/ml Milz bei den alten und 20.000 (9.500/60.000) CFU/ml Milz bei den jungen Mäusen. Dabei waren 1 von 35 alten Mäusen und 2 von 37 jungen Mäusen steril. Der höchste Wert der Gruppe der alten Mäuse zeigte eine Konzentration von 100.000.000 CFU/ml Milz, während in der Gruppe der jungen Mäuse nur ein Höchstwert von 2.000.000 CFU/ml Milz verzeichnet wurde (Abb. 15 B).

Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den alten und jungen Mäusen bezüglich der Bakterienkonzentration im Kleinhirn ($p=0,77$). Dabei fanden sich Bakterienkonzentrationen von 600.000 (290.000/2.000.000) CFU/ml Kleinhirn bei den alten und 800.000 (140.000/3.000.000) CFU/ml Kleinhirn bei den jungen Mäusen. Der Maximalwert lag allerdings bei den alten Mäusen höher als bei den jungen Mäusen mit 1.900.000.000 versus 100.000.000 CFU/ml Kleinhirn (Abb. 15 C).

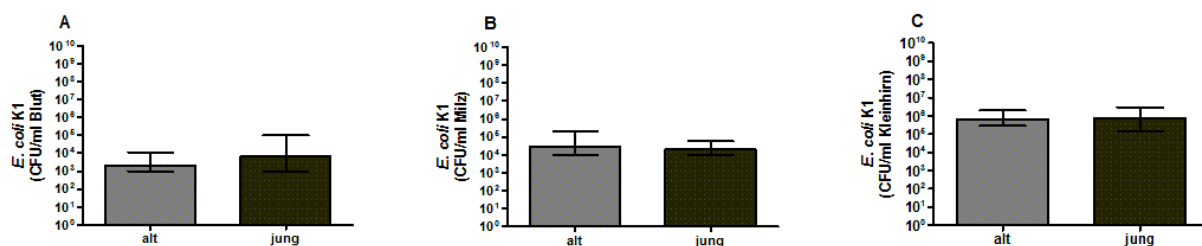


Abb. 15: **Bakterienkonzentrationen im Blut (A), in der Milz (B) und im Kleinhirn (C) 24 Stunden nach Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von *E. coli*-K1 i.c. bei jungen und alten Mäusen.** Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den alten ($n=35$) und jungen ($n=37$) Mäusen (Blut $p=0,1570$; Milz $p=0,1990$; Kleinhirn $p=0,7650$). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.1.2.5 Zytokinkonzentrationen im Serum und Kleinhirnhomogenat 24 Stunden nach Infektion

24 Stunden p.i. wurden in den Seren sowie Kleinhirnhomogenaten aller Mäuse die Konzentrationen von IL-6 und TNF- α sowie des Chemokins KC mithilfe von ELISAs gemessen.

Die Konzentration von IL-6 im Serum wies einen signifikanten Unterschied mit höheren Werten der jungen (428,4 [283/792] pg/ml) Mäuse gegenüber der alten (161,9 [94/532,2] pg/ml) Mäuse auf (** $p=0,0071$) (Abb. 16 A).

Die Konzentration von KC im Serum wies ebenfalls einen signifikanten Unterschied mit höheren Werten der jungen (1726 [929/3.390] pg/ml) gegenüber der alten (713,6 [315/1.399] pg/ml) Mäuse auf (** $p=0,0021$) (Abb. 16 B).

Die Konzentration von TNF- α im Serum wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den jungen (14,8 [14,5/14,8] pg/ml) und alten (14,8 [14,5/14,8] pg/ml) Mäusen auf ($p=0,54$), wobei 31 von 35 alten Mäusen und 28 von 37 jungen Mäusen Werte unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen (Abb. 16 C).

In den Kleinhirnhomogenaten 24 Stunden nach Infektion bestand kein Unterschied zwischen alten und jungen Mäusen bezüglich der Konzentration von IL-6 (alt: 433,2 [231/582] pg/ml, jung: 386 [226/618] pg/ml, $p=0,67$); von TNF- α (alt: 27 [18/36] pg/ml, jung: 30 [18/53] pg/ml, $p=0,46$); sowie von KC (alt: 891 [574/1.726] pg/ml, jung: 988 [620/1.399] pg/ml, $p=0,86$).

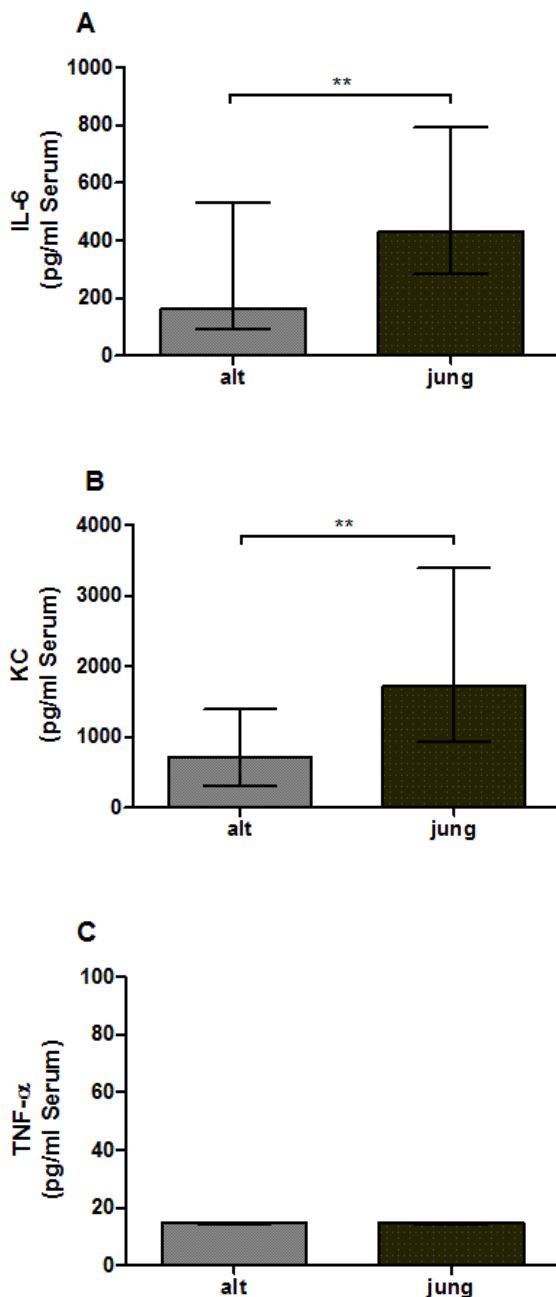


Abb. 16: **Konzentrationen von IL-6 (A), KC (B) und TNF- α (C) im Serum 24 Stunden nach Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von *E. coli*-K1 i.c. bei alten (n=36) und jungen (n=37) Mäusen.** Gemessen mittels ELISA, Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

A) Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit höheren Konzentrationen von IL-6 im Serum der jungen Mäuse (**p=0,0071) im Gegensatz zu den alten Mäusen.

B) Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit höheren Konzentrationen von KC im Serum der jungen Mäuse für KC (**p=0,0021) im Gegensatz zu den alten Mäusen.

C) Es zeigte sich kein Unterschied in den Konzentrationen für TNF- α im Serum zwischen jungen und alten Mäusen (p=0,54).

3.1.2.6 Meningealer Inflammationsscore

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den SAR und ins Hirngewebe 24 Stunden nach Infektion zwischen alten (1,75 [1,6/2]) und jungen (2 [1,6/2]) Mäusen (p=0,07) (Abb. 17).

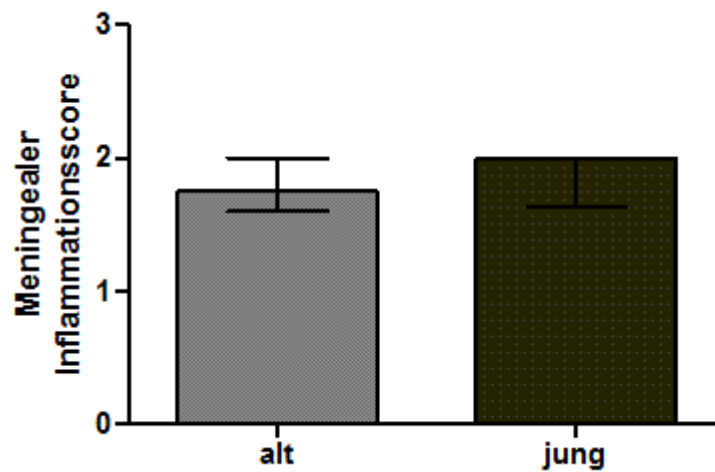


Abb. 17: **Meningealer Inflammationsscore von jungen und alten Mäusen nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von *E. coli*-K1.** Dabei zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Ausmaßes der Einwanderung von Granulozyten in den SAR und ins Hirngewebe zwischen alten (n=36) und jungen (n=37) Mäusen ($p=0,07$). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.1.3 Vergleich intrazerebraler *E. coli*-Infektionen alter und junger TLR9-defizienter Mäuse

Um die Auswirkung einer TLR9-Defizienz auf den Verlauf einer *E. coli*-K1-Meningitis zu untersuchen, wurden in zwei unabhängigen Versuchen 20 TLR9-defiziente Mäuse im Alter von $25,1 \pm 1$ Monaten („alte TLR9-defiziente Mäuse“) mit 19 TLR9-defizienten Mäusen im Alter von $3,8 \pm 1,3$ Monaten („junge TLR9-defiziente Mäuse“) mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von im ersten Versuch 500.000 und im zweiten Versuch 3.000.000 CFU *E. coli*-K1 i.c. infiziert und nach 24 Stunden geopfert.

3.1.3.1 Gewicht

Zu Beginn des Versuches unterschieden sich die Gewichte zwischen den alten (Gewicht $29,7 \pm 4,9$ g) und jungen (Gewicht $26,1 \pm 5,2$ g) Mäusen signifikant (* $p=0,032$). Innerhalb der 24 Stunden nach Infektion nahmen beide Gruppen an Gewicht ab, wobei die jungen TLR9-defizienten ($3,1 \pm 0,2$ g) Mäuse mehr Gewicht verloren als die alten TLR9-defizienten ($2,3 \pm 0,2$ g) Mäuse (Differenz Gewicht 0 bis 24 Stunden, ** $p=0,0029$) (Abb. 18 A).

3.1.3.2 Klinische Symptomatik

Beim klinischen Score zeigte sich innerhalb von 24 Stunden nach Infektion ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen den alten (2,5 [2/4]) und jungen (0 [0/1]) TLR9-defizienten Mäusen (AUC 0 bis 24 Stunden, definierte baseline klinischer Score von 0, *** $p<0,0001$). Der klinische Zustand der alten TLR9-defizienten Mäuse verschlechterte sich früher und vermehrt als der klinische Zustand der jungen TLR9-defizienten Mäuse (Abb. 18 B).

3.1.3.3 Motorische Fähigkeiten

Zu Versuchsbeginn am Punkt 0 Stunden fand sich ein signifikanter Unterschied der motorischen Fähigkeiten der jungen (3 [2/6]) TLR9-defizienten Mäuse gegenüber den alten (14 [8/17]) TLR9-defizienten Mäusen (*** $p<0,0001$). Innerhalb der 24 Stunden nach Infektion verschlechterten sich sowohl die alten (6 [2/9]) als auch die jungen (3 [1/8]) TLR9-defizienten Mäuse in ihren motorischen Fähigkeiten (Differenz Seiltestscore 0 bis 24 Stunden, $p=0,27$) (Abb. 18 C).

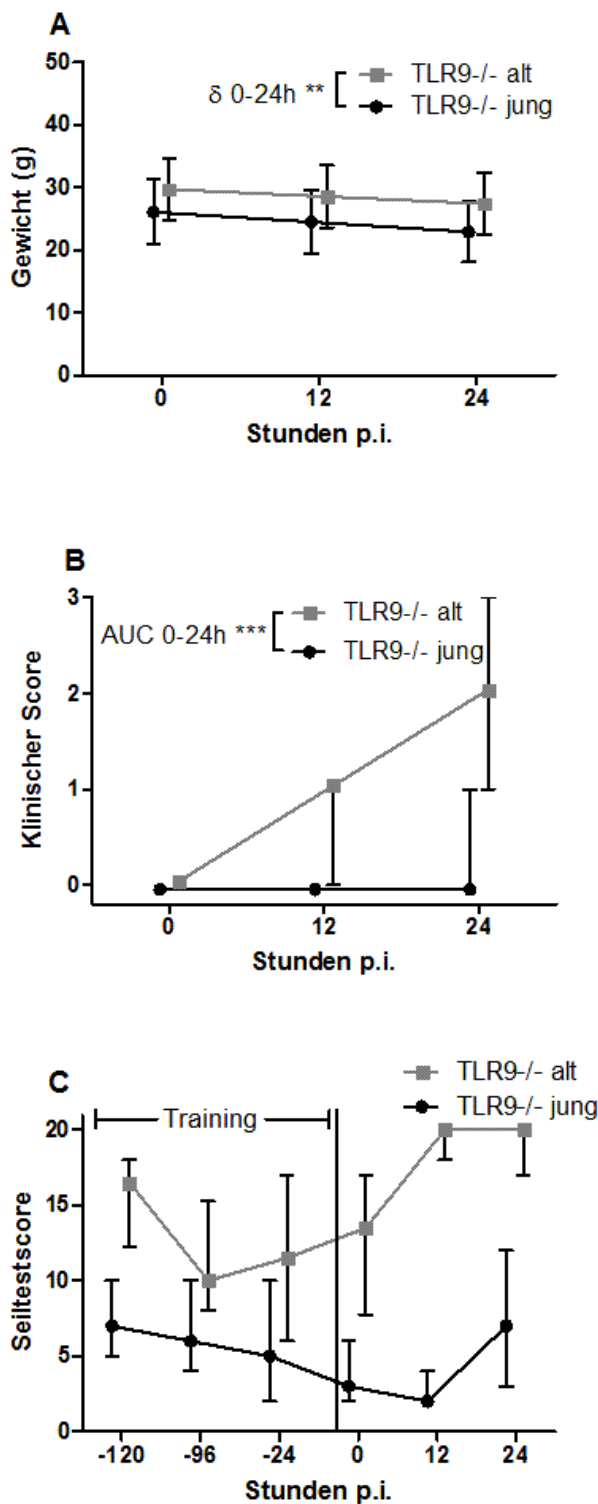


Abb. 18: Verlauf des Gewichtes (A), des klinischen Scores (B) und der motorischen Fähigkeiten (C) innerhalb von 24 Stunden nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis *E. coli*-K1 von jungen (n=19) und alten (n=20) TLR9-defizienten Mäusen.

A) Bei der Gewichtsabnahme innerhalb von 24 Stunden nach Infektion zeigte sich ein vermehrtes Abnehmen der jungen TLR9-defizienten Mäuse als der alten TLR9-defizienten Mäuse (Differenz Gewicht 0 bis 24 Stunden, **p=0,0029). Darstellung als Mittelwerte ± Standardabweichungen.

B) Der klinische Score zeigte einen signifikanten Unterschied mit früherer Verschlechterung des klinischen Zustands der alten TLR9-defizienten Mäuse im Gegensatz zu den jungen TLR9-defizienten Mäusen (AUC 0 bis 24 Stunden, baseline klinischer Score von 0, ***p<0,0001). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

C) Zu Beginn des Versuches unterschieden sich die alten Mäuse mit schlechteren motorischen Fähigkeiten von den jungen Mäusen (**p<0,0001) Innerhalb von 24 Stunden verschlechterten sich beide Gruppen in ihren motorischen Fähigkeiten (Differenz Seiltestscore 0 bis 24 Stunden, p=0,27). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.1.3.4 Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut 24 Stunden nach Infektion

Im Kleinhirn fanden sich signifikant höhere Bakterienkonzentrationen bei den alten TLR9-defizienten Mäusen mit 3.400.000 (300.000/250.000.000) CFU/ml versus 200.000 (80.000/1.000.000) CFU/ml der jungen TLR9-defizienten Mäuse (**p=0,0056). Dabei waren eine junge und keine der alten Mäuse im Kleinhirngewebe steril (Abb. 19 C).

In der Milz fanden sich höhere Konzentrationen von *E. coli*-K1 bei den alten (65.000 [6.250/800.000] CFU/ml) Mäusen als bei den jungen (7.000 [999/30.000] CFU/ml) Mäusen (*p=0,043). Dabei waren 2 von 19 jungen und 1 von 20 alten Mäusen im Milzgewebe steril (Abb. 19 B).

Ähnlich wie in der Milz fanden sich im Blut höhere Konzentrationen von *E. coli*-K1 bei den alten (30.000 [7.750/145.000] CFU/ml) Mäusen als bei den jungen (7.000 [999/30.000] CFU/ml) Mäusen (*p=0,033). Dabei waren 5 von 19 jungen und 2 von 20 alten Mäusen im Blut steril (Abb. 19 A).

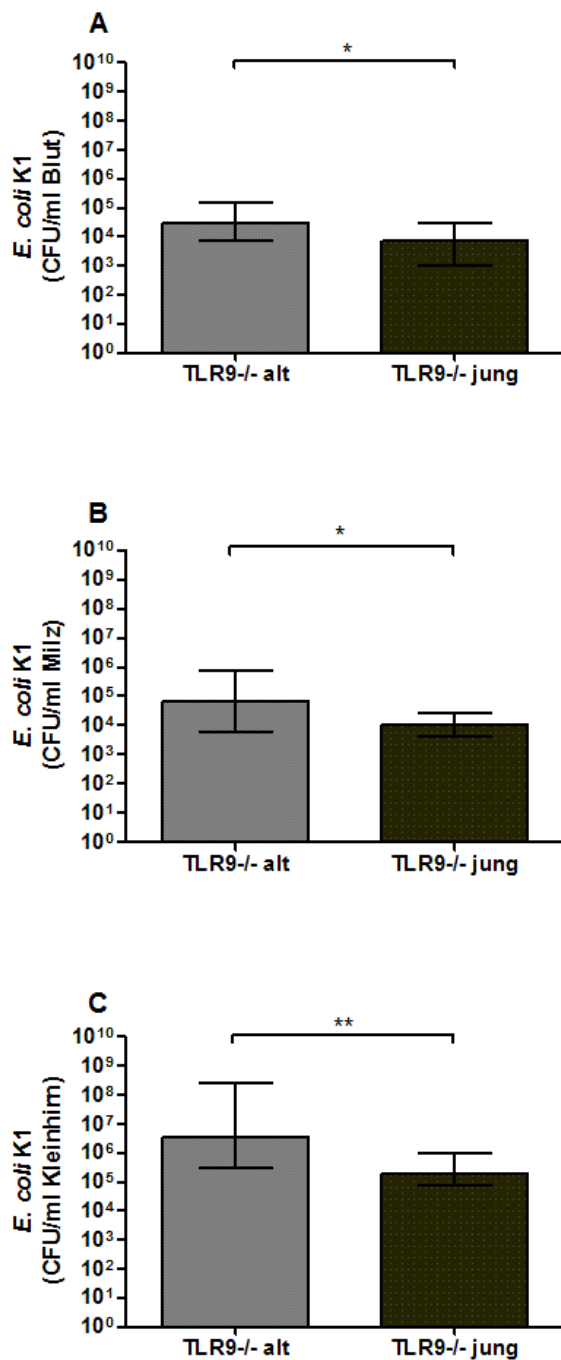


Abb. 19: Bakterienkonzentrationen im Blut (A), in der Milz (B) und im Kleinhirn (C) 24 Stunden nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis *E. coli*-K1 von jungen und alten TLR9-defizienten Mäusen. Es zeigte sich im Blut (*p=0,033), in der Milz (*p=0,043) und im Kleinhirn (**p=0,0056) eine höhere Bakterienkonzentration bei den alten TLR9-defizienten Mäusen (n=20) im Vergleich zu den jungen TLR9-defizienten Mäusen (n=19). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.1.3.5 Zytokinkonzentrationen im Serum und Kleinhirnhomogenat 24 Stunden nach Infektion

Bei allen Mäusen wurde sowohl im Serum 24 Stunden p.i. als auch im Kleinhirnhomogenat 24 Stunden p.i. Zytokinkonzentrationen mithilfe von ELISAs gemessen.

Im Serum zeigte sich weder für IL-6 (jung: 591,3 [402/925,6] pg/ml, alt: 451 [244,7/4.257] pg/ml, $p=0,76$), noch für KC (jung: 1.200 [516,3/1.634] pg/ml, alt: 1.209 [513,8/2.184] pg/ml, $p=0,77$) oder für TNF- α (jung: 72,4 [14,5/72,4] pg/ml, alt: 72,4 [14,5/87,5] pg/ml, $p=0,57$) ein Unterschied zwischen jungen und alten TLR9-defizienten Mäusen (Abb. 20).

In den Kleinhirnhomogenaten zeigte sich ebenfalls weder für IL-6 (jung: 510 [374,7/666,3] pg/ml, alt: 576 [296,3/1.465] pg/ml, $p=0,62$), noch für KC (jung: 775,5 [542,6/1.642] pg/ml, alt: 1.276 [388,3/3.750] pg/ml, $p=0,33$) oder für TNF- α (jung: 29 [24,6/44,7] pg/ml, alt: 29,3 [20,2/61,6] pg/ml, $p=0,84$) ein Unterschied zwischen jungen und alten TLR9-defizienten Mäusen (keine Abbildung).

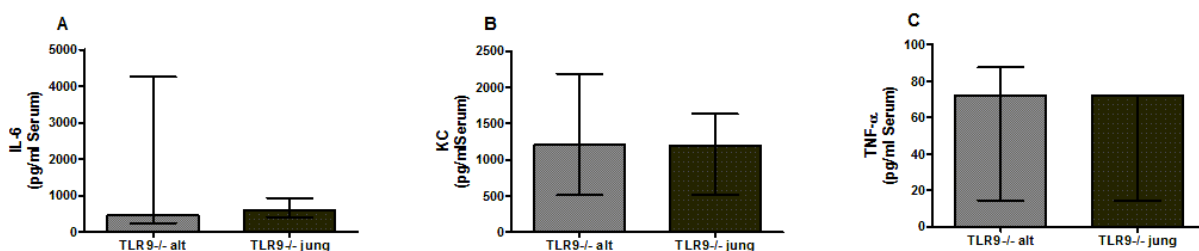


Abb. 20: Konzentrationen von IL-6 (A), KC (B) und TNF- α (C) im Serum 24 Stunden nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis *E. coli*-K1 von alten und jungen TLR9-defizienten Mäusen. Es konnte kein Unterschied zwischen den alten ($n=20$) und jungen ($n=19$) TLR9-defizienten Mäusen bezüglich der Konzentrationen von IL-6, KC oder TNF- α im Serum festgestellt werden. Gemessen mittels ELISA, Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.1.3.6 Meningealer Inflammationsscore

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in der SAR und ins Hirngewebe 24 Stunden nach Infektion zwischen alten (2 [1,8/2]) und jungen (1,8 [1,4/2]) TLR9-defizienten Mäusen ($p=0,14$) (Abb. 21).

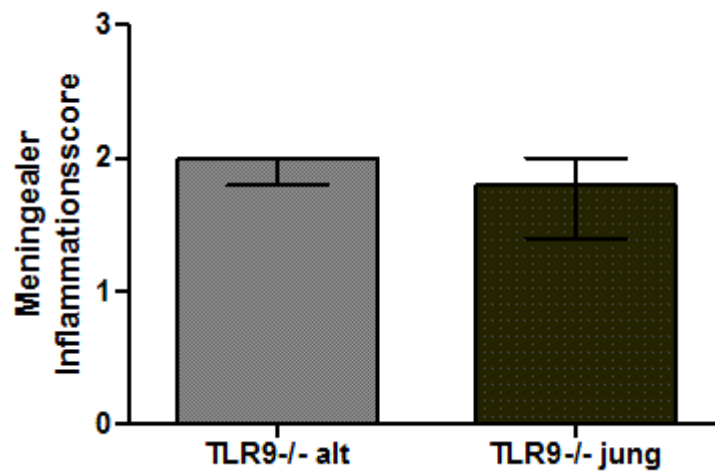


Abb. 21: **Meningealer Inflammationsscore von jungen und alten TLR9-defizienten Mäusen nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von *E. coli*-K1.** Dabei zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Ausmaßes der Einwanderung von Granulozyten in den SAR und ins Hirngewebe zwischen den alten (n=20) und jungen (n=19) TLR9-defizienten Mäusen (p=0,14). Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.2 Intrazerebrale *S. pneumoniae*-Infektionen bei jungen und alten Mäusen

3.2.1 Klinische Symptome und Entzündungsparameter im Verlauf einer intrazerebralen *S. pneumoniae*-Infektion

Um den Verlauf einer intrazerebralen *S. pneumoniae*-Infektion zwischen alten und jungen Mäusen zu vergleichen, wurden in drei unabhängigen Versuchen 19 C57BL/6xSJL-Mäuse sowie 21 C57BL/6N-Mäuse im Alter von $21,2 \pm 3,1$ Monaten („alte Mäuse“) und 25 C57BL/6xSJL-Mäuse sowie 17 C57BL/6N-Mäuse im Alter von $3,2 \pm 0,9$ Monaten („junge Mäuse“) mit je 50 CFU *S. pneumoniae*-SP3 im ersten und 70 CFU *S. pneumoniae*-SP3 im zweiten Versuch CFU i.c. infiziert.

3.2.1.1 Überleben

Alle an der Infektion verstorbenen Mäuse verstarben innerhalb von 96 h nach Infektion, wobei die alten Mäuse innerhalb von 36 und 60 Stunden p.i. und die jungen Mäuse innerhalb von 48 und 72 Stunden p.i. verstarben. Insgesamt starben 14 von 40 (35 %) alten Mäusen und 16 von 42 (38,1 %) jungen Mäusen (Abb. 22), was einen ähnlichen Verlauf im Überleben der beiden Gruppen darstellt ($p=0,98$).

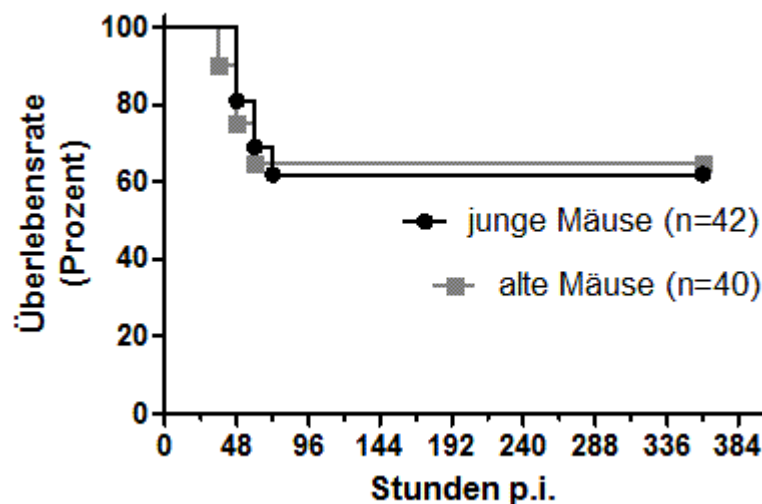


Abb. 22: Kaplan-Meier-Kurven für junge und alte Mäuse nach einer i.c. Infektion mit *S. pneumoniae*-SP3. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,98$). Gemeinsame Darstellung von drei unabhängigen Versuchen. Alle überlebenden alten [$n=26$] und jungen Mäuse [$n=26$] wurden 15 Tage p.i. geopfert.

3.2.1.2 Gewicht

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ausgangsgewichten der alten

Mäuse mit $33 \pm 5,8$ g und der jungen Mäuse mit 24 ± 3 g ($***p < 0,0001$). Beide Gruppen nahmen in der akuten Phase der Infektion an Gewicht ab, wobei das Maximum in der Gewichtsabnahme nach 36 Stunden bei den alten (Gewicht $30,4 \pm 4,9$ g) und nach 48 Stunden bei den jungen (Gewicht $22,2 \pm 3$ g) Mäusen eintrat. Die Gewichtsabnahme innerhalb von 24 Stunden nach Infektion unterschied sich nicht zwischen den alten ($1,2 \pm 0,8$ g) und den jungen ($0,9 \pm 0,6$ g) Mäusen (Differenz Gewicht 0 bis 24 Stunden, $p=0,077$) (Abb. 23).

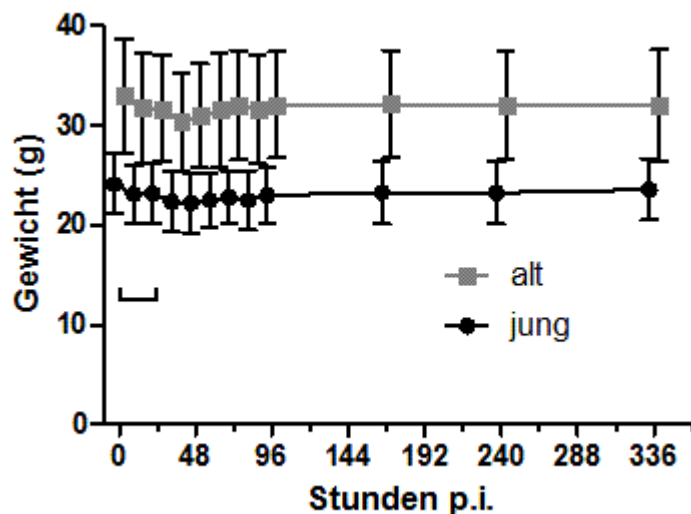


Abb. 23: **Verlauf des Gewichtes bei alten und jungen Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae*-SP3 i.c.** Dabei wurden die Gewichte der Mäuse bis zum Todeszeitpunkt in die Auswertung und die Abbildung einbezogen, so dass zu Anfang 40 alte und 42 junge Mäuse und ab 96 Stunden 26 alte und 26 junge Mäuse gewogen wurden. Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Gewichtsabnahme innerhalb von 24 Stunden zwischen den alten ($n=40$) und den jungen ($n=42$) Mäusen ($p=0,077$). Darstellung als Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

3.2.1.3 Klinische Symptomatik

Beim Vergleich der Zeit bis zum Erreichen der verschiedenen klinischen Scores zeigte sich kein Unterschied zwischen den jungen ($n=16$) und alten ($n=14$) Mäusen, welche innerhalb von 96 Stunden nach Infektion verstarben. Die Zeitpunkte an denen sowohl die alten als auch die jungen Mäuse einen Score von 1 (alt: 36 [18/36] h, jung: 36 [12/48] h, $p=0,79$), einen Score von 2 (alt: 47,5 [47/48] h, jung: 48 [48/60] h, $p=0,2$) oder einen Score von 3/4 (alt: 48 [36/60] h, jung: 60 [48/60] h, $p=0,06$) erhielten, unterschieden sich nicht (Abb. 24).

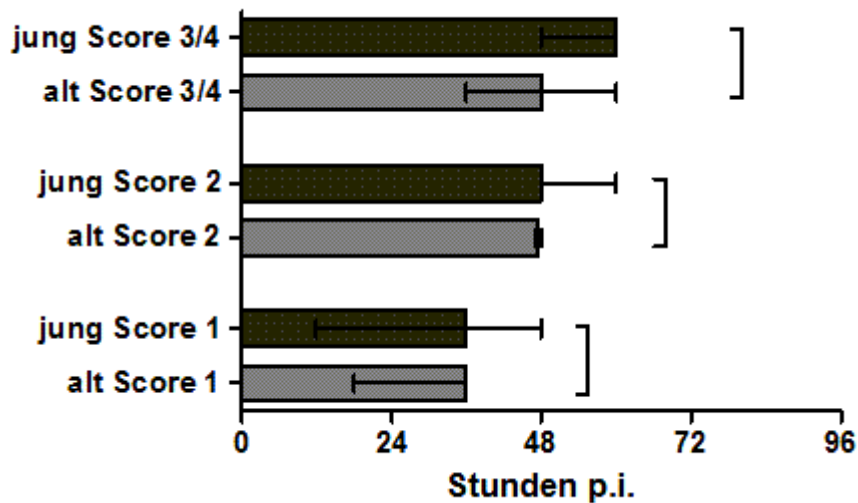


Abb. 24: Zeit bis zum Erreichen des Scores 1, 2 oder 3/4 bei jungen und alten nach i.c. Infektion mit *S. pneumoniae*-SP3 verstorbenen Mäusen. Es bestand kein Unterschied zwischen den alten (n=14) und jungen (n=16) Mäusen bezüglich der Zeit bis zum Erreichen des Scores 1 (p=0,79), des Scores 2 (p=0,2) und des Scores 3/4 (p=0,06). Die Daten wurden verglichen mittels Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen und dargestellt als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.2.1.4 Motorische Fähigkeiten

Die motorischen Fähigkeiten der alten (14 [10/18]) Mäuse fielen zu Beginn des Versuches signifikant schlechter aus als bei den jungen (6 [1/10]) Mäusen ($***p < 0,0001$). Die motorischen Fähigkeiten aller erkrankten Mäuse verschlechterten sich innerhalb der akuten Infektionsphase bis zum Tod. Zum Zeitpunkt 0 Stunden zeigte sich kein Unterschied in den motorischen Fähigkeiten zwischen den an der Infektion verstorbenen alten (14 [10/16]) Mäusen (n=14) und den überlebenden alten (14 [10/19]) Mäusen (n=26) (p=0,64). Ebenso unterschieden sich die an der Infektion verstorbenen jungen (7 [1/10]) Mäuse (n=16) nicht von den überlebenden jungen (5 [1/19]) Mäusen (n=26) (p=0,85) in den motorischen Fähigkeiten zu Beginn des Versuches (Abb. 25).

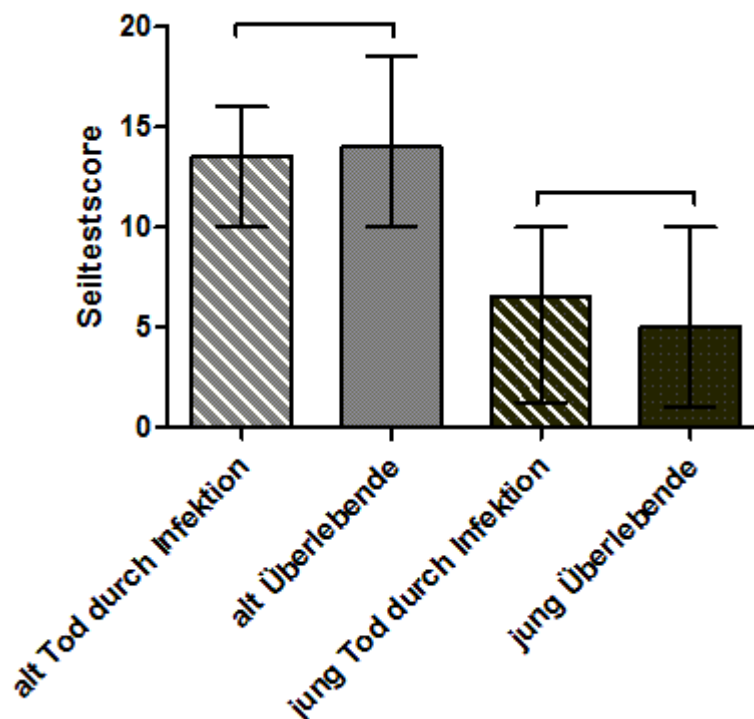


Abb. 25: Vergleich der motorischen Fähigkeiten der alten an der Infektion verstorbenen und alten überlebenden Mäuse sowie der jungen an der Infektion verstorbenen und jungen überlebenden Mäuse nach i.c. Infektion mit *S. pneumoniae*-SP3. Die alten an der Infektion verstorbenen Mäuse (n=14) unterschieden sich nicht zum Zeitpunkt des Versuchsbeginnes in den motorischen Fähigkeiten von den alten überlebenden Mäusen (n=26) (p=0,64). Die jungen an der Infektion verstorbenen Mäuse (n=16) unterschieden sich ebenfalls nicht in ihren motorischen Eigenschaften von den jungen überlebenden Mäusen (n=26) (p=0,85) zum Zeitpunkt 0 Stunden. Darstellung als Mediane und 25./75. Perzentilen.

3.2.1.5 Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn, Milz und Blut

Bakterienkonzentrationen im Blut 30 Stunden nach Infektion

Beiden Gruppen wurde 30 Stunden p.i. Blut abgenommen. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Höhe der Bakterienkonzentration zwischen alten (999 [999/8.750] CFU/ml) und jungen (999 [999/999] CFU/ml) Mäusen (p=0,19). Es waren 25 von 36 alten (69,4 %) und 32 von 41 jungen (78 %) Mäusen im Blut steril und die alten Mäusen erreichten Höchstwerte von bis zu 100.000.000 CFU/ml gegenüber Maximalwerten der jungen Mäuse von 90.000 CFU/ml.

Bakterienkonzentrationen zum Zeitpunkt des Versterbens an der Infektion

Bei den Mäusen, die akut an der Infektion verstarben, zeigte sich weder im Kleinhirn (p=0,1) zwischen jungen (110.000.000 [60.000.000/700.000.000] CFU/ml) und alten (75.000.000 [20.000.000/250.000.000] CFU/ml) Mäusen noch in der Milz (p=0,9) zwischen

jungen (300.000 [100.000/700.000] CFU/ml) und alten (350.000 [65.000/850.000] CFU/ml) Mäusen ein signifikanter Unterschied in der *S. pneumoniae*-SP3-Konzentration.

Bakterienkonzentrationen der überlebenden Mäuse nach 15 Tagen

Es konnten keine Bakterien mehr im Blut, im Kleinhirngewebe und im Milzgewebe 15 Tage nach Infektion bei den überlebenden alten (n=26) und jungen (n=26) Mäusen nachgewiesen werden.

3.2.1.6 Meningealer Inflammationsscore

Bezüglich der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den SAR und ins Hirngewebe zeigte sich sowohl bei den alten (n=40, $r=0,87$, $***p<0,0001$) als auch bei den jungen Mäusen (n=42, $r=0,9$, $***p<0,0001$) eine hohe Korrelation zwischen Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn und meningealem Inflammationsscore (Abb. 26).

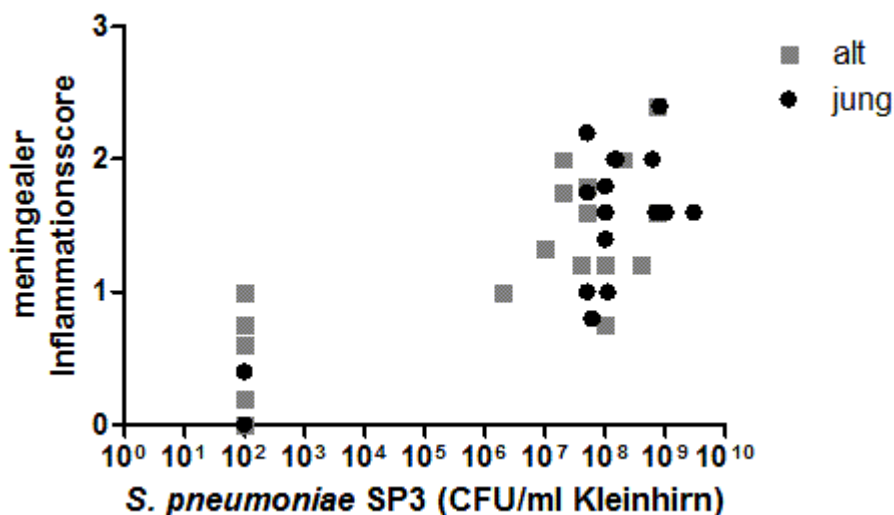


Abb. 26: **Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn mit dem zugehörigem meningealen Inflammationsscore zum Zeitpunkt des Versterbens bzw. der Opferung nach 15 Tagen nach i.c. Infektion mit *S. pneumoniae*-SP3 von jungen und alten Mäusen.** Dabei besteht eine signifikante Korrelation zwischen Bakterienkonzentration und meningealem Inflammationsscore bei jung (n=42, $r=0,9$, $***p<0,0001$) und alt (n=40, $r=0,87$, $***p<0,0001$). Die alten und jungen Mäuse mit niedriger Bakterienkonzentration und niedrigem meningealem Inflammationsscore entsprechen den überlebenden Mäusen.

In der Höhe des meningealen Inflammationsscores kam es zu keinem Unterschied zwischen den alten verstorbenen und jungen verstorbenen (alt: 1,6 [1,2/2], jung: 1,6 [1,4/2], $p=0,61$) bzw. zwischen den alten überlebenden und den jungen überlebenden Mäusen (alt: 0 [0/0], jung: 0 [0/0], $p=0,34$).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss das Alter auf den Verlauf der bakteriellen Meningitis im Mausmodell hat. Es wurden zwei wichtige Erreger der bakteriellen Meningitis hierzu ausgewählt: *E. coli* und *S. pneumoniae*.

Das gramnegative Bakterium *E. coli* ist eine der häufigsten Ursachen der bakteriellen Meningitis bei Neugeborenen (Kim 2000), aber auch im hohen Alter gehört das Bakterium zum Erregerspektrum (Choi 2001). Nach intrazerebraler Infektion mit *E. coli*-K1 zeigte sich in dieser Arbeit eine deutlich erhöhte Sterblichkeit der alten Mäuse mit 73 % im Vergleich zu den jungen Mäusen mit 46 %. Dabei wiesen die alten Mäuse eine frühere klinische Verschlechterung sowie eine erhöhte Gewichtsabnahme innerhalb von 24 Stunden nach Infektion auf. Passend dazu zeigte eine prospektive Kohortenstudie in den Niederlanden an 696 Patienten mit ambulant-erworbener bakterieller Meningitis ein vermehrtes Auftreten von Komplikationen wie Vigilanzstörungen, epileptische Anfälle und Herz-Kreislauf-Versagen und eine erhöhte Sterblichkeit bei Patienten über 60 Jahre (34 %) im Vergleich zu Patienten zwischen 17 und 59 Jahren (13 %) (Weisfelt *et al.* 2006). In einer retrospektiven Studie an 194 Patienten mit bakterieller Meningitis in Pakistan lag der Anteil der *E. coli*-Meningitis bei 7,3 % mit einer Sterblichkeit von 85,7 %. Die Gesamtsterblichkeit an der bakteriellen Meningitis durch verschiedene Erreger in dieser Studie betrug 22,1 %, wobei ein hohes Alter dabei als Prädiktor eines schlechten Krankheitsausganges identifiziert wurde: Patienten über 60 Jahre wiesen eine Sterblichkeit von 35,4 % (17/48) auf, Patienten unter 60 Jahren hingegen eine Sterblichkeit von 17,8 % (26/146) (Rabbani *et al.* 2003). Auch in Mausmodellen anderer durch *E. coli* verursachter Erkrankungen ließ sich ein schlechterer Ausgang der Erkrankung bei alten im Vergleich zu jungen Mäusen darstellen. So konnten Maddens *et al.* in einem Modell der *E. coli*-K1-Sepsis (Uterinligierung und Inokulation von 1.000 CFU *E. coli*-K1) zeigen, dass C57BL/6-Mäuse im Alter von 70-72 Wochen im Vergleich zu Mäusen im Alter von 12-14 Wochen eine erhöhte Sterblichkeit aufwiesen (43 % versus 9 %) und vermehrt die Komplikation eines akuten Nierenversagens entwickelten. Des Weiteren wiesen die alten Mäuse (50 %) im klinischen Verlauf innerhalb von 48 Stunden nach Infektion im Vergleich zu den jungen Mäusen (25 %) ein vermehrtes Auftreten von schweren Krankheitszeichen wie Lethargie und Schwäche auf (Maddens *et al.* 2012).

Die motorischen Fähigkeiten der Mäuse wurden mithilfe des Seiltestes überprüft. Dieser Test wurde von Miquel und Blasco in den 70-er Jahren entwickelt, um altersabhängige Veränderungen in der Geschicklichkeit und den motorischen Fähigkeiten von Mäusen zu evaluieren (Miquel und Blasco 1978). Wie zu erwarten, wiesen die alten Mäuse in allen Versuchen bereits vor der Infektion schlechtere Leistungen im Seiltest auf als die jungen Mäuse. Im Verlauf der *E. coli*-K1-Meningitis zeigte sich eine Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten sowohl bei den jungen als auch bei den alten Mäusen. Die alten Mäuse, die im Verlauf an der Infektion verstarben, hatten zu Beginn des Versuches tendenziell schlechtere motorische Fähigkeiten als alte Mäuse, die die Infektion überlebten. Bei den jungen Mäusen zeigte sich diesbezüglich keine Tendenz. Guayerbas *et al.* diskutieren, dass ein schlechtes Abschneiden im Seiltest mit einer kürzeren Lebenserwartung und damit einem hohen biologischen Alter der Mäuse einhergeht. Die Peritonealmakrophagen der Mäuse mit schlechter motorischer Koordination wiesen eine verminderte Phagozytosefähigkeit auf, und diese Mäuse waren anfälliger gegenüber Infektionen (Guayerbas *et al.* 2002).

Die Erregerelimination ist ein entscheidender Bestandteil der Infektionsbewältigung der bakteriellen Meningitis. In dieser Arbeit konnte anhand der höheren Bakterienkonzentrationen im Gehirn und in der Milz der überlebenden alten Mäuse im Gegensatz zu den jungen Mäusen 15 Tage nach Infektion gezeigt werden, dass die alten Mäuse *E. coli* nach Infektion schlechter eliminieren konnten. Die Erregerpersistenz kann für eine reduzierte Phagozytosefähigkeit der Zellen alter Mäuse, wie zum Beispiel Mikroglia-Zellen, Makrophagen und Granulozyten, sprechen. Diese Beobachtung lässt sich mit *in-vitro*-Daten untermauern: So ist die Phagozytoseleistung von Mikrogliazellen bezüglich Amyloid- β -42 alter Mäuse vermindert, wie beispielsweise Njie *et al.* in einem *ex-vivo*-Versuch alter (16-18 Monate) und junger (1-2 Monate) C57BL/6-Mäuse zeigen konnten. Dabei phagozytierten die Mikrogliazellen der jungen Mäuse 53 % mehr Amyloid- β -42 als die Mikrogliazellen der alten Mäuse (Njie *et al.* 2012). Zusätzlich konnten Swift *et al.* anhand von Makrophagen alter (22 Monate) und junger (8 Wochen) BALB/c-Mäuse zeigen, dass die sich in einer peripheren Exzisionswunde befindlichen Makrophagen von alten Mäusen eine verringerte Phagozytosefähigkeit von Latexkugeln sowie opsonierten Schaferythrozyten *in vitro* aufwiesen als die jungen Mäusemakrophagen (Swift *et al.* 2001). Unpublizierte Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe stellten passend dazu eine reduzierte Phagozytosefähigkeit der Mikrogliazellen und Makrophagen alter Mäuse in

Bezug auf *E. coli* im Vergleich zu den Zellen junger Mäuse *in vitro* dar. Histologisch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die meningeale Inflammation, gemessen an der Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den SAR, bei den alten überlebenden Mäusen 15 Tage nach Infektion tendenziell höher im Vergleich zu den jungen überlebenden Mäusen war. Dies ist vermutlich Folge einer längeren Persistenz von Bakterien im ZNS und einer daraus resultierenden andauernden Granulozyten-einwanderung in den SAR der alten Mäuse. Insgesamt korrelierte die Granulozytenzahl gut mit dem Bakterientiter im Kleinhirn.

Zum Zeitpunkt des Todes in Folge der *E. coli*-Meningitis bestand bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten kein Unterschied zwischen jungen und alten Mäusen bezüglich der Konzentration von *E. coli*-K1 im Kleinhirn- und Milzgewebe. Da die Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten verstorben sind, könnte dies bedeuten, dass es ab einer bestimmten *E. coli*-K1-Konzentration am Ort der Primärerkrankung und im systemischen Kreislauf zum Tod unabhängig vom Alter kommt. Jedoch fanden sich zum Zeitpunkt des Todes in Folge der *E. coli*-Meningitis im Blut höhere Konzentrationen von *E. coli*-K1 der alten Mäuse. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es durch eine mögliche reduzierte Elimination des Erregers bei den alten Mäusen früher zu einer systemischen Ausbreitung des Erregers kommen kann. Histologisch wiesen die alten Mäuse zum Zeitpunkt des Todes in Folge der *E. coli*-Meningitis eine verminderte Einwanderung von Granulozyten in den SAR im Vergleich zu den jungen Mäusen auf. Dies lässt vermuten, dass es im Alter durch eine verminderte Erkennung des Erregers durch die residenten immunkompetenten Zellen im SAR zu einer einhergehenden reduzierten Leukozytenmigration während der Erkrankung kommt.

Um den Verlauf der *E. coli*-Meningitis im Mausmodell bei alten und jungen Mäusen in der Akutphase der Erkrankung zu einem festen Zeitpunkt zu untersuchen, wurden die Mäuse mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis *E. coli*-K1 i.c. infiziert und alle Mäuse 24 Stunden nach Infektion geopfert. Dabei konnte kein Unterschied bezüglich der Bakterienkonzentration im Blut, im Kleinhirn- und im Milzgewebe zwischen jungen und alten Mäusen festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass es durch das hochkonzentrierte Inokulum bei beiden Gruppen zu einer optimalen Vermehrung der Bakterien kommen konnte.

Die Aktivierung des Immunsystems bei den alten und jungen Mäusen wurde in dieser Arbeit zusätzlich anhand der Konzentration der Zytokine IL-6, TNF- α und KC im Serum

und im Kleinhirnhomogenat evaluiert. IL-6 und TNF- α gehören zu den bei der bakteriellen Meningitis ausgeschütteten proinflammatorischen Zytokinen und bewirken die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung (Waage *et al.* 1989). Auch KC zählt zu den im Verlauf der bakteriellen Meningitis ausgeschütteten Entzündungsmediatoren (Koedel *et al.* 2010). Es zeigte sich bei der Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von *E. coli*-K1 kein Unterschied in den Zytokinkonzentrationen der Kleinhirnhomogenate 24 Stunden nach Infektion zwischen jungen und alten Mäusen. Allerdings stellte sich ein signifikanter Unterschied in den Zytokinkonzentrationen von IL-6 und KC im Serum dar. Dabei wiesen die alten Mäuse niedrigere Konzentrationen von IL-6 und KC im Vergleich zu den jungen Mäusen auf. Die systemische Ausschüttung von Entzündungsmediatoren scheint demnach bei den jungen Mäusen effektiver zu sein als bei den alten. Auch *in-vitro*-Versuche, durchgeführt an Mäusemakrophagen, konnten zeigen, dass die Makrophagen alter Mäuse deutlich weniger IL-6 und TNF- α nach Stimulation durch TLR-Agonisten wie LPS freisetzen als die Makrophagen junger Mäuse (Renshaw *et al.* 2002; Boehmer *et al.* 2004). Bisher unpublizierte Beobachtungen aus unserer Arbeitsgruppe konnten ebenfalls zeigen, dass Makrophagen und Mikrogliazellen alter Mäuse *in vitro* weniger Zytokine unter Stimulation mit TLR-Agonisten freisetzen als die Makrophagen und Mikrogliazellen junger Mäuse. Dies untermauert die in dieser Arbeit *in vivo* aufgezeigte verringerte Freisetzung von Zytokinen in das Serum alter Mäuse nach bakterieller intrazerebraler Infektion im Sinne einer reduzierten systemischen Immunreaktion. Es gibt aber auch die Beobachtung, dass alte, nicht akut an einer Infektion erkrankte, Menschen eine erhöhte Serumkonzentration von proinflammatorischen Zytokinen aufweisen, was sich in einer Art chronischer und systemischer Entzündung ohne Krankheitswert äußert – dem bereits in der Einführung erwähnten *inflammaging* (Franceschi *et al.* 2000). Es wird vermutet, dass, wenn nun ein weiterer Stimulus wie eine bakterielle Infektion hinzutritt, es zu einer überschießenden Immunreaktion kommt. Und so zeigten Turnbull *et al.* im Sepsis-Mausmodell (Ligation und Punktion des Zäkum), dass die alten Mäuse höhere Konzentrationen von IL-6, TNF- α und IL-10 als die jungen Mäuse im Serum aufwiesen (Turnbull *et al.* 2009). Diese zum Teil gegensätzlichen Beobachtungen bezüglich der Zytokinproduktion bei bakteriellen Infektionen im Alter lassen einen möglichen Therapieansatz, der auf die Modulation der Zytokinexpression abzielt, als kompliziert erscheinen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Aktivierung des Immunsystems im Rahmen einer Infektion sowohl unersetzlich für die Erregerelimination als auch ursächlich für einhergehende

Komplikationen wie Schädigung von Hirngewebe (Koedel *et al.* 2010).

Insgesamt spiegelt das in dieser Arbeit etablierte Mausmodell der *E. coli*-Meningitis gut die im Menschen beobachteten Verhältnisse wider. Darauf aufbauend können neue Strategien für die Prävention und die Therapie der bakteriellen Meningitis bei Patienten im Alter entwickelt und erprobt werden. Hierzu wäre die Steigerung der Phagozytoserate von Mikrogliazellen und Makrophagen im Alter ein Ansatz, da sich eine reduzierte Elimination des Erregers im Verlauf der bakteriellen Meningitis im Alter darstellt.

Ergänzend wurde der Verlauf der *E. coli*-Meningitis bei TLR9-defizienten alten und jungen Mäusen miteinander verglichen. Der TLR9 gehört zu den PRRs des angeborenen Immunsystems, wird durch die in der bakteriellen DNA enthaltenen CpG-Wiederholungen aktiviert und initiiert dadurch die Immunantwort (Akira *et al.* 2006). In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Bakterienkonzentration im Kleinhirn, in der Milz und im Blut 24 Stunden nach Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von *E. coli*-K1 bei den alten TLR9-defizienten Mäusen signifikant höher waren als bei den jungen TLR9-defizienten Mäusen. Die alten TLR9-defizienten Mäuse können demnach den bakteriellen Erreger sowohl lokal als auch systemisch schlechter eliminieren als die jungen TLR9-defizienten Mäuse. Im gleichen Versuchsaufbau mit C57BL/6N-Mäusen zeigte sich kein Unterschied in der Bakterienkonzentration im Kleinhirn, in der Milz und im Blut zwischen jungen und alten C57BL/6N-Mäusen. Da die Versuche an C57BL/6N-Mäusen und TLR9-defizienten Mäusen nicht parallel durchgeführt wurden, können die Experimente nicht direkt miteinander verglichen werden, dennoch ist zu vermuten, dass der TLR9 einen Einfluss auf die Resistenz gegen bakterielle Infektionen im Alter hat. So wäre eine reduzierte Erregerelimination der alten TLR9-defizienten Mäuse gut denkbar. Im Alter ist die Expression von TLR nach Stimulation durch TLR-Agonisten allgemein vermindert, wie Renshaw *et al.* anhand von Makrophagen von alten und jungen C57BL/6-Mäusen untersuchten (Renshaw *et al.* 2002). Ebenso stellten *ex-vivo*-Untersuchungen an Gehirnen alter Mäuse eine verminderte Expression von TLR9 im Vergleich zu denen junger Mäuse dar (Letiembre *et al.* 2007). Vorangehende Arbeiten haben sich bereits mit der Rolle des TLR9 bei ZNS-Infektionen im Allgemeinen auseinandergesetzt. Klein *et al.* konnten anhand einer Pneumokokken-Meningitis bei jungen Mäusen zeigen, dass TLR2/TLR4/TLR9-defiziente Mäuse keinen Unterschied im Überleben oder der Höhe der Bakterienkonzentrationen im Vergleich zu TLR2/TLR4-defizienten Mäusen aufwiesen

(Klein *et al.* 2008). Böttcher *et al.* konnten eine erhöhte mRNA-Expression von TLR2, TLR4 und TLR7 jedoch nicht von TLR9 in Gehirnen junger C57BL/6-Mäuse nach i.c. Infektion mit *E. coli*-K1 zeigen (Böttcher *et al.* 2003). Diese Arbeiten weisen auf eine untergeordnete Rolle des TLR9 bei ZNS-Infektionen hin. Andere Untersuchungen untermauern jedoch die Wichtigkeit des TLR9 bei ZNS-Infektionen. Sjölander *et al.* zeigten anhand einer Meningokokken-Meningitis bei jungen TLR9-defizienten Mäusen ein vermindertes Überleben und eine erhöhte Bakterienkonzentration im Blut im Gegensatz zu C57BL/6J-Mäusen (Sjölander *et al.* 2008). *In vitro* führte die Stimulation von jungen Mikrogliazellen mit CpG-DNA, dem Agonist für TLR9, zur Steigerung der Phagozytoserate von *E. coli*-K1 (Ribes *et al.* 2009). In neonatalen Mikrogliazellen von Ratten steigerte die Phagozytose von *E. coli* die Expression u. a. von TLR9 (Sivagnanam *et al.* 2010). Ein direkter Vergleich des Verlaufes der *E. coli*-Meningitis bei alten C57BL/6N-Mäusen und alten TLR9-defizienten Mäusen ist erforderlich, um die vermutete erhöhte Sterblichkeit und vermehrte klinische Verschlechterung der alten TLR9-defizienten Mäuse im Gegensatz zu ihren gleich alten Wildtypen zu evaluieren.

Um einen klinisch noch relevanteren Erreger der bakteriellen Meningitis im Mausmodell zu untersuchen, wurde das grampositive Bakterium *S. pneumoniae* gewählt. *S. pneumoniae* zählt zu den häufigsten Erregern der bakteriellen Meningitis. Im Alter über 60 Jahren weist die Pneumokokken-Meningitis eine bis zu viermal erhöhte Inzidenz sowie eine erhöhte Sterblichkeit auf (Schuchat *et al.* 1997; Kastenbauer und Pfister 2003). Um die Ursachen des unterschiedlichen Verlaufes der *S. pneumoniae*-Meningitis im Alter zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit alte und junge Mäuse intrazerebral infiziert und über 15 Tage untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der *E. coli*-Meningitis unterschied sich die Sterblichkeit zwischen jungen (38 %) und alten (35 %) Mäusen nicht voneinander. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede im klinischen Verlauf, einem Gewichtsverlust nach 24 Stunden sowie den motorischen Fähigkeiten im Verlauf der Infektion. Auch die Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn und in der Milz zum Zeitpunkt des akuten Versterbens unterschieden sich zwischen jungen und alten Mäusen nicht. Ebenso gab es zwischen den jungen und alten Mäusen keinen Unterschied bezüglich der Bakterienkonzentrationen im Blut 30 Stunden nach Infektion. 15 Tage nach Infektion ließ sich *S. pneumoniae*-SP3 weder bei den alten noch den jungen überlebenden Mäusen nachweisen. Wir verzichteten auf die Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum und im Kleinhirnhomogenat, da sich klinisch kein Unterschied zwischen den jungen und alten

Mäusen gezeigt hatte. Insgesamt unterschied sich der Verlauf der *S. pneumoniae*-Meningitis bei jungen und alten Mäusen in diesem Mausmodell nicht. In anderen Mausmodellen von Infektionen mit Pneumokokken kam es ebenso zu keinem Unterschied zwischen jungen und alten Mäusen. Esposito *et al.* zeigten, dass nach einer Infektion mit *S. pneumoniae*-SP3 in dem unteren respiratorischen Trakt kein Unterschied der Sterblichkeit zwischen jungen und alten C57BL/6-Mäusen bestand (Esposito *et al.* 1990). Hingegen zeigten Boyd *et al.* nach einer intranasalen Infektion mit *S. pneumoniae*, dass Mäuse im Alter von 19 bis 21 Monaten eine erhöhte Sterblichkeit und nach intratrachealer Infektion eine erhöhte Bakterienkonzentration im Lungengewebe im Vergleich zu 4 bis 5 Monate alten Mäusen aufwiesen (Boyd *et al.* 2012). Ein möglicher Grund dafür, dass wir in dieser Arbeit die klinische Situation beim Menschen mit Pneumokokken-Meningitis mit erhöhter Sterblichkeit und Komplikationsrate im Alter nicht nachstellen konnten, könnte sein, dass im hier verwendeten Mausmodell der Erreger direkt in den SAR injiziert wird. Damit lassen wir mögliche vorangehende Eliminationsmöglichkeiten (bspw. während der Kolonisation in Nasen-Rachen-Raum oder während einer Sinusitis) außer Acht. Es ist denkbar, dass die zelluläre Antwort des alten Menschen bereits in den ersten Stadien der Erregervermehrung versagt, so dass der Erreger ungehindert in das ZNS eindringen kann. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Krone *et al.*: In einem Mausmodell der intranasalen Kolonisation von *S. pneumoniae* zeigten Mäuse im Alter von 18 bis 23 Monaten im Vergleich zu Mäusen im Alter von 3 bis 4 Monaten eine verlängerte Kolonisation des Bakteriums mit einer verlängerten Dauer bis zur Beseitigung des Erregers aus dem oberen respiratorischen Trakt (Krone *et al.* 2013). Interessant wäre nun das Überleben von jungen und alten Mäusen nach Induktion einer bakteriellen Meningitis durch bspw. intranasaler Zufuhr von *S. pneumoniae* zu untersuchen.

Da sich ein deutlicher Unterschied im Verlauf und vor allem der Sterblichkeit der *E. coli*-K1-Meningitis jedoch nicht bei *S. pneumoniae*-SP3 zeigte, können wir spekulieren, dass die verminderte Resistenz gegenüber ZNS-Infektionen und die eingeschränkte Bewältigung der Erkrankung im Alter erregerspezifisch ist. Dick bekapselte Erreger wie SP3 scheinen den immunkompetenten Zellen sowohl alter als auch junger Mäuse erhebliche Schwierigkeiten zu bereiten, wohingegen ein dünn bekapselter Erreger wie *E. coli*-K1 durch das Immunsystem junger Mäuse besser zu eliminieren ist als durch das alter Mäuse. *In-vitro*-Versuche an durch TLR-Agonisten stimulierten Mikrogliazellen neugeborener Mäuse konnten zeigen, dass die Phagozytose des unbekapselten *S. pneu-*

moniae Typ R6 bis zu 10fach höher als die des bekapselten *S. pneumoniae* Serotyp 2 Typ D39 war (Ribes *et al.* 2010a). In diesem Zusammenhang wäre eine *in-vivo*-Testung der Unterschiede im Verlauf der Meningitis zwischen alten und jungen Mäusen mit dem unbekapselten *S. pneumoniae* Serotyp 2 Typ D39 nützlich zum Verständnis der unterschiedlichen Pathogenität der Erreger. Zudem wäre für zukünftige Versuche im hier verwendeten Mausmodell die Untersuchung anderer wichtiger Erreger der bakteriellen Meningitis im Alter wie beispielsweise *L. monocytogenes* sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Die bakterielle Meningitis zeigt, wie auch andere bakterielle Infektionen, bei älteren Patienten im Vergleich zu jüngeren Patienten einen schwereren Verlauf, eine höhere Komplikationsrate sowie eine erhöhte Sterblichkeit. Insbesondere vor dem Hintergrund der stetig alternden Bevölkerung ist ein besseres Verständnis dieses klinisch beobachteten Phänomens nötig.

Anhand alter und junger C57BL/6-Mäuse wurde der Verlauf der bakteriellen Meningitis für die Erreger *E. coli* und *S. pneumoniae* untersucht. Die Mäuse wurden intrazerebral mit dem jeweiligen Erreger infiziert und der Verlauf der Erkrankung mittels Gewichtskontrolle, Beurteilung des Gesundheitszustandes sowie der Einschätzung der motorischen Fähigkeiten mithilfe des Seiltests kontrolliert. Es wurden die Bakterienkonzentrationen im Blut, Kleinhirn und Milz bei Versterben bzw. nach 15 Tagen bestimmt. Des Weiteren erfolgte die Messung von Zytokinkonzentrationen im Serum und Kleinhirn mittels ELISA und die Ermittlung des Ausmaßes der meningealen Inflammation anhand der Anfärbung von neutrophilen Granulozyten in histologischen Schnitten.

Entsprechend der klinischen Beobachtung bei alten Patienten zeigte sich im Verlauf der *E. coli*-Meningitis eine erhöhte Sterblichkeit der alten Mäuse mit 73 % im Vergleich zu den jungen Mäusen mit 46 %. Es zeigte sich eine frühere klinische Verschlechterung und eine erhöhte Gewichtsabnahme der alten Mäuse. Alte Mäuse konnten den Erreger *E. coli* nach Infektion schlechter eliminieren als junge Mäuse, was möglicherweise aus einer reduzierten Phagozytosefähigkeit der Mikrogliazellen und Makrophagen im Alter resultiert. In der Akutphase einer tödlich verlaufenden Infektion zeigten alte Mäuse eine geringere Zytokinkonzentration von IL-6 und KC im Serum als Zeichen einer verminderten systemischen Entzündungsreaktion.

Bei der *S. pneumoniae*-Meningitis zeigten sich weder bezüglich der Sterblichkeit, des Krankheitsverlaufes noch der Bakterienkonzentrationen Unterschiede zwischen alten und jungen Mäusen. Die verminderte Resistenz gegenüber und die eingeschränkte Bewältigung von ZNS-Infektionen im Alter scheint daher erregerspezifisch zu sein.

In dieser Arbeit konnte die klinische Beobachtung der erhöhten Sterblichkeit und des schwereren Verlaufes der bakteriellen Meningitis im Alter anhand der *E. coli*-Meningitis im Mausmodell dargestellt werden. Anhand dieses Modells könnten neue Strategien für die Prävention und Therapie der bakteriellen Meningitis bei Patienten im Alter entwickelt und erprobt werden.

6 Veröffentlichungen

Poster:

Schütze S, **Manig A**, Ribes S, Bunkowski S, Nau R: Decreased serum levels of IL-6 and KC and faster clinical decline in aged mice during the acute phase of E. coli meningitis. 9th Congress of the European Union Geriatric Medicine Society (EUGMS) 2.-4.10.2013 in Venedig, Italien.

7 Literaturverzeichnis

- Agrawal A, Agrawal S, Gupta S (2007): Dendritic cells in human aging. *Exp Gerontol* 42, 421-426
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801
- Boehmer ED, Goral J, Faunce DE, Kovacs EJ (2004): Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *J Leukoc Biol* 75, 342-349
- Boehmer ED, Meehan MJ, Cutro BT, Kovacs EJ (2005): Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. *Mech Ageing Dev* 126, 1305-1313
- Böttcher T, von Mering null M, Ebert S, Meyding-Lamadé 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
- Boyd AR, Shivshankar P, Jiang S, Berton MT, Orihuela CJ (2012): Age-related defects in TLR2 signaling diminish the cytokine response by alveolar macrophages during murine pneumococcal pneumonia. *Exp Gerontol* 47, 507-518
- Braun J (2009): Inducible nitric oxide synthase mediates hippocampal caspase-3 activation in pneumococcal meningitis. *Int J Neurosci* 119, 455-459
- Braun JS, Hoffmann O, Schickhaus M, Freyer D, Dagand E, Bermpohl D, Mitchell TJ, Bechmann I, Weber JR (2007): Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage. *Infect Immun* 75, 4245-4254
- Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM (2001): Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol* 70, 881-886
- Cabellos C, Verdaguer R, Olmo M, Fernández-Sabé N, Císnal M, Ariza J, Gudiol F, Viladrich PF (2009): Community-acquired bacterial meningitis in elderly patients:

- experience over 30 years. *Medicine (Baltimore)* 88, 115-119
- Choi C (2001): Bacterial meningitis in aging adults. *Clin Infect Dis* 33, 1380-1385
- Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Scialabba G, Candore G, Lio D, Motta M, Malaguarnera M, Caruso C (2003): B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mech Ageing Dev* 124, 389-393
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2012): Ambulant erworbene bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis, o. Verl., o. O. 2012, 1-12
- Dilger RN, Johnson RW (2008): Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *J Leukoc Biol* 84, 932-939
- Ebert S, Gerber J, Bader S, Mühlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J Neuroimmunol* 159, 87-96
- Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R (2002): Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 186, 798-806
- Esposito AL, Poirier WJ, Clark CA (1990): In vitro assessment of chemotaxis by peripheral blood neutrophils from adult and senescent C57BL/6 mice: correlation with in vivo responses to pulmonary infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *Gerontology* 36, 2-11
- Floden AM, Combs CK (2011): Microglia demonstrate age-dependent interaction with amyloid- β fibrils. *J Alzheimers Dis* 25, 279-293
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G (2000): Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908, 244-254
- Frank MG, Barrientos RM, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, Maier SF (2006): mRNA

up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiol Aging* 27, 717-722

Frank MG, Barrientos RM, Watkins LR, Maier SF (2010): Aging sensitizes rapidly isolated hippocampal microglia to LPS ex vivo. *J Neuroimmunol* 226, 181-184

Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard K-P, Lesur O, Khalil A, Dupuis G (2004): Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 3, 217-226

Gavazzi G, Krause K-H (2002): Ageing and infection. *Lancet Infect Dis* 2, 659-666

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

Gerber J, Böttcher T, Hahn M, Siemer A, Bunkowski S, Nau R (2004): Increased mortality and spatial memory deficits in TNF-alpha-deficient mice in ceftriaxone-treated experimental pneumococcal meningitis. *Neurobiol Dis* 16, 133-138

Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW (2005): Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J* 19, 1329-1331

Goronzy JJ, Weyand CM (2005): T cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* 17, 468-475

Guayerbas N, Catalán M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M (2002): Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 134, 41-48

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

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745

- Herrero C, Sebastián C, Marqués L, Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lloberas J, Celada A (2002): Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. *Exp Gerontol* 37, 389-394
- Hufschmidt A, Lücking CH, Rauer S: *Neurologie compact*. 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009
- Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). *FASEB J* 18, 412-414
- Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C, Salmasi G, 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
- Jurgens HA, Johnson RW (2012): Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol* 233, 40-48
- Kanoh Y, Ohara T, Kanoh M, Akahoshi T (2008): Serum matrix metalloproteinase-2 levels indicate blood-CSF barrier damage in patients with infectious meningitis. *Inflammation* 31, 99-104
- Kastenbauer S, Pfister H-W (2003): Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* 126, 1015-1025
- Kim KS (2000): E. coli invasion of brain microvascular endothelial cells as a pathogenetic basis of meningitis. *Subcell Biochem* 33, 47-59
- Kissin E, Tomasi M, McCartney-Francis N, Gibbs CL, Smith PD (1997): Age-related decline in murine macrophage production of nitric oxide. *J Infect Dis* 175, 1004-1007
- Klein M, Obermaier B, Angele B, Pfister H-W, Wagner H, Koedel U, Kirschning CJ (2008): Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Infect Dis* 198, 1028-1036
- Koedel U, Scheld WM, Pfister H-W (2002): Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2, 721-736

- Koedel U, Klein M, Pfister H-W (2010): New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 23, 217-223
- Kovacs EJ, Palmer JL, Fortin CF, Fülöp Jr T, Goldstein DR, Linton P-J (2009): Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol* 30, 319-324
- Krone CL, Trzciński K, Zborowski T, Sanders EAM, Bogaert D (2013): Impaired innate mucosal immunity in aged mice permits prolonged *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Infect Immun* 81, 4615-4625
- Lai W-A, Chen S-F, Tsai N-W, Chang C-C, Chang W-N, Lu C-H, Chuang Y-C, Chien C-C, Huang C-R (2011): Clinical characteristics and prognosis of acute bacterial meningitis in elderly patients over 65: a hospital-based study. *BMC Geriatr* 11, 91
- Letiembre M, Hao W, Liu Y, Walter S, Mihaljevic I, Rivest S, Hartmann T, Fassbender K (2007): Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience* 146, 248-254
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009
- Maddens B, Vandendriessche B, Demon D, Vanholder R, Chiers K, Cauwels A, Meyer E (2012): Severity of sepsis-induced acute kidney injury in a novel mouse model is age dependent. *Crit Care Med* 40, 2638-2646
- Magazzini S, Nazerian P, Vanni S, Paladini B, Pepe G, Casanova B, Crugnola C, Grifoni S (2012): Clinical picture of meningitis in the adult patient and its relationship with age. *Intern Emerg Med* 7, 359-364
- Mariani E, Meneghetti A, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Cattini L, Facchini A (2002): Chemokine production by natural killer cells from nonagenarians. *Eur J Immunol* 32, 1524-1529
- Marrie TJ (2000): Community-acquired pneumonia in the elderly. *Clin Infect Dis* 31, 1066-1078

- Mildner A, Djukic M, Garbe D, Wellmer A, Kuziel WA, Mack M, Nau R, Prinz M (2008): Ly-6G+CCR2- myeloid cells rather than Ly-6ChighCCR2+ monocytes are required for the control of bacterial infection in the central nervous system. *J Immunol* 181, 2713-2722
- Miquel J, Blasco M (1978): A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp Gerontol* 13, 389-396
- Mitchell TJ (2000): Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 151, 413-419
- Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll null T, van de Beek null D (2011): Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev* 24, 557-591
- Nau R, Brück W (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25, 38-45
- Nau R, Soto A, Brück W (1999): Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 265-274
- Nau R, Gerber J, Bunkowski S, Brück W (2004): Axonal injury, a neglected cause of CNS damage in bacterial meningitis. *Neurology* 62, 509-511
- Nau R, Djukic M, Schütze S, Eiffert H (2012): Bakterielle Meningitis? Schon bei Verdacht sofort einweisen! *Allgemeinarzt* 9, 18-20
- Niederhorn JY (2006): See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat Immunol* 7, 354-359
- Njie EG, Boelen E, Stassen FR, Steinbusch HWM, Borchelt DR, Streit WJ (2012): Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* 33, 195.e1-195.12
- Norman DC, Yoshikawa TT (1996): Fever in the elderly. *Infect Dis Clin North Am* 10, 93-99
- Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG (1999): Leukocytes, the Janus cells in

inflammatory disease. *Langenbecks Arch Surg* 384, 222-232

Ogawa T, Kitagawa M, Hirokawa K (2000): Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. *Mech Ageing Dev* 117, 57-68

Paul R, Koedel U, Winkler F, Kieseier BC, Fontana A, Kopf M, Hartung H-P, Pfister H-W (2003): Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis. *Brain* 126, 1873-1882

Perry VH, Newman TA, Cunningham C (2003): The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 4, 103-112

Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S (2004): Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 3, 161-167

Pracht D, Elm C, Gerber J, Bergmann S, Rohde M, Seiler M, Kim KS, Jenkinson HF, Nau R, Hammerschmidt S (2005): PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* 73, 2680-2689

Rabbani MA, Khan AA, Ali SS, Ahmad B, Baig SM, Khan MA, Wasay M (2003): Spectrum of complications and mortality of bacterial meningitis: an experience from a developing country. *J Pak Med Assoc* 53, 580-583

Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S (2002): Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 169, 4697-4701

Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch U-K, 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, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch U-K, Hammerschmidt S, Nau R (2010a): 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, Adam N, Ebert S, Regen T, Bunkowski S, Hanisch U-K, Nau R (2010b): The viral TLR3 agonist poly(I:C) stimulates phagocytosis and intracellular killing of *Escherichia coli* by microglial cells. *Neurosci Lett* 482, 17-20
- Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI (1998): Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 102, 347-360
- Robert Koch-Institut (2012): *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 30, o. Verl., o. O. 2012, 283
- Schmidt H, Heimann B, Djukic M, Mazurek C, Fels C, Wallesch C-W, Nau R (2006): Neuropsychological sequelae of bacterial and viral meningitis. *Brain* 129, 333-345
- Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA (1997): Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* 337, 970-976
- Schütze S, Loleit T, Zeretzke M, Bunkowski S, Brück W, Ribes S, Nau R (2012): Additive microglia-mediated neuronal injury caused by amyloid- β and bacterial TLR agonists in murine neuron-microglia co-cultures quantified by an automated image analysis using cognition network technology. *J Alzheimers Dis* 31, 651-657
- Sharief MK, Ciardi M, Thompson EJ (1992): Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: association with tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta. *J Infect Dis* 166, 350-358
- Simell B, Vuorela A, Ekström N, Palmu A, Reunanen A, Meri S, Käyhty H, Väkeväinen M (2011): Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of *Streptococcus pneumoniae* by neutrophil phagocytosis. *Vaccine* 29, 1929-1934
- Sivagnanam V, Zhu X, Schlichter LC (2010): Dominance of *E. coli* phagocytosis over LPS in the inflammatory response of microglia. *J Neuroimmunol* 227, 111-119

- Sjölander H, Mogensen TH, Kilian M, Jonsson A-B, Paludan SR (2008): Important role for Toll-like receptor 9 in host defense against meningococcal sepsis. *Infect Immun* 76, 5421-5428
- Solana R, Alonso MC, Peña J (1999): Natural killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol* 34, 435-443
- Solana R, Pawelec G, Tarazona R (2006): Aging and innate immunity. *Immunity* 24, 491-494
- Statistisches Bundesamt (2009): Bevölkerung Deutschlands bis 2060, 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. Begleitmaterial zur Pressekonferenz am 18. November 2009 in Berlin, o. Verl., o. O. 2009, 3-49
- Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshüsemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J, Spreer A, Bähr M, Michel U, Nau R (2002): Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 11, 355-368
- Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA (2001): Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol* 117, 1027-1035
- Targonski PV, Jacobson RM, Poland GA (2007): Immunosenescence: role and measurement in influenza vaccine response among the elderly. *Vaccine* 25, 3066-3069
- Täuber MG, Moser B (1999): Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clin Infect Dis* 28, 1-11; quiz 12
- Turnbull IR, Clark AT, Stromberg PE, Dixon DJ, Woolsey CA, Davis CG, Hotchkiss RS, Buchman TG, Coopersmith CM (2009): Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis. *Crit Care Med* 37, 1018-1023
- United Nations (2009): World Population Ageing, o. Verl., o. O. 2009, 1-59
- Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T (1989): Local

production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med* 170, 1859-1867

Weisfelt M, van de Beek null D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans null J (2006): Community-acquired bacterial meningitis in older people. *J Am Geriatr Soc* 54, 1500-1507

Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B (2009): The aging of the immune system. *Transpl Int* 22, 1041-1050

Werner H, Kuntsche J (2000): [Infection in the elderly--what is different?]. *Z Gerontol Geriatr* 33, 350-356

World Health Organization (2004): The World Health Report (Annex Table 2), o. Verl., o. O. 2004, 121-125

Yoshikawa TT (2000): Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases. *Clin Infect Dis* 30, 931-933

Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, Bejo L, Kim KS, Mitchell TJ, Hakenbeck R, Heinz HP (2001): Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69, 845-852

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ablauf eines Infektionsversuches.....	20
Abb. 2: Gewebepräparation des Mäusegehirns.....	23
Abb. 3: Serielle 1:10-Verdünnung der Kleinhirn- und Milzhomogenate sowie des Blutes. .	25
Abb. 4: Meningealer Inflammationsscore in histologischen Schnittbildern.....	29
Abb. 5: Kaplan-Meier-Kurven für junge und alte Mäuse nach i.c. <i>E. coli</i> -K1-Infektion.....	31
Abb. 6: Verlauf des Gewichtes bei alten und jungen Mäusen nach Infektion mit <i>E. coli</i> -K1 i.c.....	32
Abb. 7: Zeit bis zum Erreichen des Scores 1, 2 oder 3/4 bei jungen und alten nach i.c. Infektion mit <i>E. coli</i> -K1 verstorbenen Mäusen.....	33
Abb. 8: Vergleich der motorischen Fähigkeiten zu Beginn des Versuches der alten an der Infektion verstorbenen und alten überlebenden Mäuse sowie der jungen an der Infektion verstorbenen und jungen überlebenden Mäuse nach i.c. Infektion mit <i>E. coli</i> -K1.....	34
Abb. 9: Bakterienkonzentrationen im Blut zum Zeitpunkt des Todes durch i.c. Infektion mit <i>E. coli</i> -K1 bei jungen und alten Mäusen.....	35
Abb. 10: Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn und der Milz bei jungen und alten Mäusen 15 Tage nach Infektion mit <i>E. coli</i> -K1 i.c.....	36
Abb. 11: Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn mit dem zugehörigen meningealen Inflammationsscore von jungen und alten Mäusen zum Zeitpunkt des Versterbens bzw. der Opferung 15 Tage nach i.c. Infektion mit <i>E. coli</i> -K1.....	37
Abb. 12: Meningealer Inflammationsscore nach i.c. Infektion mit <i>E. coli</i> -K1 von jungen und alten C57BL/6N-Mäusen.....	38
Abb. 13: Darstellung einer Auswahl an histologischen Schnitten der rechten Großhirnhälfte der Mäuse in CAE-Färbung.....	39
Abb. 14: Verlauf des Gewichtes, des klinischen Scores und der motorischen Fähigkeiten innerhalb von 24 h nach Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis <i>E. coli</i> -K1 i.c. bei jungen und alten Mäusen.....	41
Abb. 15: Bakterienkonzentrationen im Blut, in der Milz und im Kleinhirn 24 Stunden nach Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von <i>E. coli</i> -K1 i.c. bei jungen und alten Mäusen.....	42

Abb. 16: Konzentrationen von IL-6, KC und TNF- α im Serum 24 Stunden nach Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von <i>E. coli</i> -K1 i.c. bei alten und jungen Mäusen.....	44
Abb. 17: Meningealer Inflammationsscore von jungen und alten Mäusen nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von <i>E. coli</i> -K1.....	45
Abb. 18: Verlauf des Gewichtes, des klinischen Scores und der motorischen Fähigkeiten innerhalb von 24 Stunden nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis <i>E. coli</i> -K1 von jungen und alten TLR9-defizienten Mäusen.....	47
Abb. 19: Bakterienkonzentrationen im Blut, in der Milz und im Kleinhirn 24 Stunden nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis <i>E. coli</i> -K1 von jungen und alten TLR9-defizienten Mäusen.....	49
Abb. 20: Konzentrationen von IL-6, KC und TNF- α im Serum 24 Stunden nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis <i>E. coli</i> -K1 von alten und jungen TLR9-defizienten Mäusen.....	50
Abb. 21: Meningealer Inflammationsscore von jungen und alten TLR9-defizienten Mäusen nach i.c. Infektion mit einer zu 100 % zur Erkrankung führenden Dosis von <i>E. coli</i> -K1.....	51
Abb. 22: Kaplan-Meier-Kurven für junge und alte Mäuse nach einer i.c. Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> -SP3.....	52
Abb. 23: Verlauf des Gewichtes bei alten und jungen Mäusen nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> -SP3 i.c.....	53
Abb. 24: Zeit bis zum Erreichen des Scores 1, 2 oder 3/4 bei jungen und alten nach i.c. Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> -SP3 verstorbenen Mäusen.....	54
Abb. 25: Vergleich der motorischen Fähigkeiten der alten an der Infektion verstorbenen und alten überlebenden Mäuse sowie der jungen an der Infektion verstorbenen und jungen überlebenden Mäuse nach i.c. Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> -SP3.....	55
Abb. 26: Bakterienkonzentrationen im Kleinhirn mit dem zugehörigem meningealen Inflammationsscore zum Zeitpunkt des Versterbens bzw. der Opferung nach 15 Tagen nach i.c. Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> -SP3 von jungen und alten Mäusen.....	56

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Veränderungen einiger der für ZNS-Infektionen relevanten Komponenten des innaten Immunsystems im Alter.....	12
Tabelle 2: Klinischer Score zum Monitoring der Mäuse.....	21
Tabelle 3: Seiltestscore zum Monitoring der Mäuse.	22
Tabelle 4: Meningealer Inflammationsscore.....	28

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i> = Varianzanalyse
AUC	<i>area under the curve</i> = Fläche unter der Kurve
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
CAE-Färbung	Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase-Färbung
CbpA	<i>choline-binding protein A</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colonie forming units</i> = koloniebildende Einheiten
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CRP	C-reaktive Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
G	Gauge
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
i.c.	intrazerebral
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> = induzierbare Stickoxid-Synthase
KC	<i>chemokine ligand 1</i> (CXCL1)
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> = Haupt-histokompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
N	Stoffmenge
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuklearfaktor kappa B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OmpA	<i>outer-membrane protein A</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> = Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PARP	poly(ADP)-Ribose-Polymerase
PavA	<i>pneumococcal adherence and virulence factor A</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> = phosphatgepufferte Salzlösung
poly I:C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PRRs	<i>pattern-recognition receptors</i>
SAR	Subarachnoidalraum
TLR	<i>toll-like receptors</i> = Toll-like-Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN-β</i>

ZNS	zentrales Nervensystem
-----	------------------------

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. med. Sandra Schütze für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation. Sowohl während der experimentellen Phase als auch während des Verfassens und der Korrektur dieser Arbeit stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite und ihr Engagement für die Wissenschaft und Zuverlässigkeit sucht in jederlei Hinsicht seinesgleichen. Ich danke besonders Prof. Dr. med. Nau für die wissenschaftliche Beratung und nützlichen Denkanstöße.

Ich möchte mich bei Stephanie Bunkowski für ihre Hilfsbereitschaft, Geduld und Unterstützung in der experimentellen Phase der Arbeit bedanken.

Für die gegenseitige Hilfe und das angenehme Arbeitsklima bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden Marie Luise Onken, Annika Kauffmann, Catharina Dießelberg, Sandra Redlich, Martha Töpfer, Sharon Christa Arcilla, Tanja Meister und Jörn Riegelmann. Darüber hinaus möchte ich Dr. Sandra Ribes und Dr. Marija Djucic für die gute Zusammenarbeit und konstruktiven Ratschläge danken. Dr. Vytautas Gapšys danke ich für die Hilfe in technischen Fragen und sein ansteckendes Interesse für die Forschung, ohne das diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Teresa Manig danke ich sehr für die motivierenden Worte und das Korrekturlesen.

Lebenslauf

Am 14.04.1986 wurde ich, Anja Manig, als Tochter von Andrea und Hartmut Manig in Leipzig geboren.

Ich besuchte die 98. Grundschule Leipzig/Grünau von 1992 - 1996 und wechselte dann auf das Neue-Nikolai-Gymnasium Leipzig, um dort im Jahre 2004 das Abitur abzulegen.

In dem darauffolgenden Jahr arbeitete ich als AuPair in Jacksonville, Florida, USA. Ich begann das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen im Sommersemester 2006. Die Famulaturen leistete ich in der Gynäkologie, der Anästhesie, der Inneren Medizin, der Radiologie, der Chirurgie und der Neurologie in Deutschland sowie in Indien und Rumänien ab. Im Praktischen Jahr belegte ich das Wahlfach Neurologie und konnte ein halbes Tertial der Inneren Medizin in Australien absolvieren. Neben dem Studium arbeitete ich als studentische Tutorin im Fach Biochemie sowie als pflegerische Hilfskraft im Aufwachraum des Krankenhauses Neu-Bethlehem in Göttingen. Im Sommer 2012 legte ich das Staatsexamen in Regelstudienzeit ab.

Mit den Vorbereitungen meiner Experimente begann ich im Herbst 2011 und konnte mich nach bestandenem Staatsexamen vollständig auf die Arbeit an meiner Promotion in der Arbeitsgruppe für Neuroinfektiologie unter der Leitung von PD Dr. med. Sandra Schütze und Prof. Dr. med. Roland Nau konzentrieren. Seit April 2013 arbeite ich als Assistenzärztin in der Abteilung für Klinische Neurophysiologie der Universitätsmedizin Göttingen.