

Aus dem Bereich Innere Medizin V Pneumologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung der Rolle des Vitamin D3 bei der Entstehung von
entzündlichen Erkrankungen der Lunge im murinen Modellsystem**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: Julia Niederstraßer

geb. am: 01.08.1986 in Gifhorn

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität des Saarlandes als Dissertation
am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Robert Bals
Zweitgutachter: PD Dr. Christoph Beisswenger

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
1 Summary	3
2 Einleitung	4
2 Vitamin D.....	4
2.1 VitD-Metabolismus	4
2.2 Transport des VitD	6
2.3 Zelluläre Wirkung des VitD	7
2.3.1 Zellulärer Mechanismus der Genregulation.....	7
2.4 Der physiologische Einfluss des VitD	10
2.4.1 Die Rolle des VitD im Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel und in der Knochenhomöostase	10
2.4.2 Die Rolle des VitD im Immunsystem	11
2.4.2.1 Der Einfluss des VitD auf spezifische Zellen des respiratorischen Abwehrsystems	11
2.4.2.2 Der Einfluss des VitD auf die Expression antimikrobielle Peptide ..	14
2.4.2.3 Der Einfluss des VitD auf die NF-κB-Signalwege und die Synthese verschiedener Zytokine	14
2.4.2.4 Der Einfluss des VitD auf die Reifung und Funktion von T- und B- Lymphozyten	16
2.5 Die Auswirkungen des systemischen Mangels an VitD auf physiologische Funktionen	18
2.5.1 VitD-Mangel in respiratorischen Erkrankungen	18
2.6 Die Supplementation von VitD als therapeutischer Ansatz	21

2.7 Ziel der Arbeit	23
3 Material und Methoden	24
<hr/>	
3.1 Material	24
3.1.1 Geräte, Materialien und Software	24
3.1.2 Reagenzien und Kits	25
3.1.3 Lösungen und Medien	27
3.1.4 Bakterienstämme	27
3.1.5 Zelllinien	28
3.1.6 Mauslinien	28
3.1.7 Futter und Lösungen der Mausversuche	28
3.2 Mikro-, Molekularbiologie und Biochemie	29
3.2.1 Kultivierung und Hitzeinaktivierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	29
3.2.2 Kultivierung von <i>P. aeruginosa</i> NH57388A.....	29
3.2.3 Kultivierung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> D39	30
3.2.4 Proteinquantifizierung.....	31
3.2.5 Bestimmung der Zellzahl	31
3.2.6 Differenzierung der Immunzellen.....	31
3.2.7 Bestimmung der Zellzytotoxizität.....	32
3.3 In vitro Zellkultivierung.....	33
3.3.1 Kultivierung und Stimulation der murinen Epithelzelllinie LA-4	33
3.4 In vivo Mausversuche	34
3.4.1 Intranasale Infektion	34
3.4.2 Endotracheale Intubation	35
3.4.3 Probenentnahme und –verarbeitung	35
3.5 Statistische Auswertung	37
4 Ergebnisse	38
<hr/>	
4.1 Auswirkungen eines systemischen Mangels an VitD auf die spezifische pulmonale Immunabwehr	38

4.1.1	Systemische Auswirkungen der Spezialdiäten und dessen Folgen auf ausgewählte Marker der pulmonalen Immunabwehr	38
4.1.1.1	Auswirkungen der Spezialdiäten auf das Serumlevel an 25(OH)D ₃	38
4.1.1.2	Auswirkungen der Spezialdiäten auf das Körpergewicht.....	39
4.1.1.3	Auswirkungen der Spezialdiäten auf ausgewählte Parameter der Immunabwehr der Lunge	39
4.1.2	Immunologische Auswirkungen des VitD-Mangels bei intranasalen Infektionen	41
4.1.2.1	Intranasale Lösungsmittelgabe als Kontrollexperiment	41
4.1.2.2	Intranasale Stimulation mit h. i. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1..	43
4.1.2.3	Intranasale Stimulation mit lebendigen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 für 6 h und 24 h	45
4.1.2.4	Intranasale Stimulation mit lebendigen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 für 3 d.....	47
4.1.2.5	Intranasale Stimulation mit lebendigen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NH57388A für 5 d.....	50
4.1.2.6	Intranasale Stimulation mit lebendigen <i>Streptococcus pneumoniae</i> D39 für 24 h	52
4.2	Endotracheale Applikation verschiedener Formen des VitD	56
4.2.1	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Applikation des Metaboliten 25(OH)D ₃	56
4.2.1.1	<i>In vitro</i> Auswirkungen der Supplementation von 25(OH)D ₃ auf murine Epithelzellen	56
4.2.1.2	<i>In vivo</i> Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 25(OH)D ₃ im Mausmodell	57
4.2.1.3	<i>In vivo</i> Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 25(OH)D ₃ bei akuter intranasalen <i>Streptococcus pneumoniae</i> D39 Infektion	59
4.2.1.4	<i>In vivo</i> Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten von 25(OH)D ₃ bei akuter intranasaler mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> D39 Infektion	61

4.2.2	<i>In vivo</i> Applikation des Metaboliten 1,25(OH) ₂ D ₃	65
4.2.2.1	<i>In vivo</i> Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 1,25(OH) ₂ D ₃ im Mausmodell	65
4.2.2.2	<i>In vivo</i> Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 1,25(OH) ₂ D ₃ bei akuter intranasalen <i>Streptococcus pneumoniae</i> D39 Infektion	66
4.2.2.3	<i>In vivo</i> Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 1,25(OH) ₂ D ₃ bei akuter intranasalen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Infektion.....	69
4.2.3	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Auswirkungen der Liposomen-Applikation	71
4.2.3.1	<i>In vitro</i> Auswirkungen der Liposomen-Supplementation auf murine Epithelzellen	71
4.2.3.2	<i>In vivo</i> Auswirkungen der endotrachealen Liposomen-Supplementation im Mausmodell	72
4.2.3.3	<i>In vivo</i> Auswirkungen der endotrachealen Liposomen-Supplementation bei akuter intranasalen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Infektion	74
5	Diskussion	77
5.1	Der Entzug des Cholecalciferol in der Nahrung führt zu einem Abfall des systemischen 25(OH)D ₃ Gehalts	78
5.2	Der systemische Mangel 25(OH)D ₃ beeinflusst tendenziell das Körpergewicht	79
5.3	VitD beeinflusst nicht die Ausschüttung von IL-1β und KC und der Leukozyten-Rekrutierung in den gewählten akuten Infektionen der Mausmodelle	79
5.4	VitD beeinflusst nicht das bakterielle Überleben in der Lunge in den gewählten Mausmodellen	81
5.5	Der Einfluss des VitD auf das Immunsystem scheint speziesabhängig zu sein	82
5.6	Schlussbemerkungen	83
6	Anhang	85
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	85
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	87

6.3 Literaturverzeichnis	91
6.4 Kongressbeiträge und Publikationen	112
6.4.1 Kongressbeiträge	112
6.4.2 Geplante Publikationen	112
6.5 Danksagung	113

1 Zusammenfassung

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Vitamin D₃ neben seinem Einfluss auf die Knochenbildung auch eine bedeutende Rolle im Immunsystem spielt. Daneben weisen Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen oft einen Mangel an Vitamin D₃ auf und die systemische Applikation des Vitamin D₃ kann zu einem verbesserten Gesundheitszustand dieser Patienten führen. Um das Verständnis um die Rolle des Vitamin D₃ in der pulmonalen Immunabwehr besser zu verstehen, sollte in dieser Arbeit sowohl ein systemischer Mangel als auch eine direkte pulmonale Gabe des Vitamin D₃ in Mäusen und deren Auswirkungen auf den akuten Infektionsverlauf untersucht werden.

Um den systemischen Mangel an Vitamin D₃ in den Mäusen hervorzurufen, wurden C57BL/6N Mäuse für zehn bis zwölf Wochen mit einem Futter versorgt, das entweder mit Vitamin D₃ angereichert war oder keines enthielt. Zur Untersuchung der pulmonalen Applikation wurden ebenfalls C57BL/6N Mäuse verwendet, denen verschiedene Formen des Vitamin D₃ endotracheal verabreicht wurden. Nach der Beschreibung des Grundzustandes der Tiere wurden diese mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* oder dem Lösungsmittel als Kontrolle intranasal infiziert. Nach definierten Zeitpunkten wurde sowohl die Kolonisierung als auch die Inflammation der Lunge in den akuten Infektionsmodellen untersucht.

Durch die Vitamin D₃ Mangelernährung konnten systemische Werte an der Speicherform des Vitamin D₃, 25-Hydroxy-Vitamin D₃, erreicht werden, die weit unter denen der Kontrollgruppe und unter dem messbaren Minimum lagen. Bei den Analysen der Leukozyten und der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und KC konnten jedoch keine Unterschiede zwischen der mangelernährten und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Parameter erhöhten sich zwar nach den verschiedenen Infektionsarten, aber auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden.

Zur Analyse der endotrachealen Gabe wurden verschiedene Metaboliten und Applikationsformen des Vitamin D₃ verwendet, um die hydrophoben Eigenschaften des Vitamin D₃ auszugleichen. Zum einen wurde die Speicherform, 25-Hydroxy-Vitamin D₃, sowie die biologisch aktive Form, 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃, gelöst in Ethanol verwendet. Zum anderen wurde das 25-Hydroxy-Vitamin D₃ verpackt in Liposomen appliziert, die in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Lehr [Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS), Saarbrücken, Deutschland]

hergestellt wurden. Auch hier wurde zwar ein Anstieg der untersuchten Entzündungsparameter durch die Infektionen gefunden, aber ein Einfluss des Vitamin D₃ konnte nicht festgestellt werden. Die Applikation der verschiedenen Formen des Vitamin D₃ führte zu keinen veränderten Anzahlen der Leukozyten oder der Konzentration an IL-1 β und KC in der Lunge.

In den ausgewählten akuten Infektionsmodellen führte weder der Mangel noch die endotracheale Gabe des Vitamin D₃ zu wesentlichen Veränderungen in den analysierten Parameter der spezifischen Abwehr der Lunge. Auch weitere Arbeiten zeigten, dass das Vitamin D₃ in Mäusen wohl andere physiologische Aufgaben erfüllt als im Menschen. Somit lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass das Mausmodell für die Untersuchung der immunologischen Rolle des Vitamin D₃ nicht geeignet scheint, um diese auf den Menschen zu übertragen.

1 Summary

Since the first decades of the last century Vitamin D₃ is known to be an important part of the calcium-phosphate-metabolism. But studies from the last decades revealed also the beneficial impact of Vitamin D₃ on host defense and withal, Vitamin D₃ deficiency is common in patients with chronic pulmonary disorders. The aim of the present study was to analyze the influence of Vitamin D₃ on the pulmonary host defense system during infection by analyzing a systemic deficiency and a direct pulmonary application.

C57BL/6N mice were fed on a diet with or without Vitamin D₃ for ten to twelve weeks to achieve a systemic Vitamin D₃ deficiency. In a second model, C57BL/6N mice were endotracheal intubated with different forms of the Vitamin D₃. The Vitamin D₃ deficient, the Vitamin D₃ intubated and the control mice were infected with *Pseudomonas aeruginosa* or *Streptococcus pneumoniae*. After well-defined points in time the basic state of the lung's immune defense as well as the colonization and the inflammation of the lung were analyzed after infection.

The nutritional restriction of Vitamin D₃ led to serum concentrations of 25-hydroxy-Vitamin D₃, the metabolite for systemic Vitamin D₃ storage, which were dramatically lower in mice on the Vitamin D₃ deficient diet. The deficient animals did not show significant differences in the number of leukocytes or the pulmonary concentrations of the inflammatory cytokines IL-1 β and KC. In infection experiments no differences could be observed in number of viable bacteria or the analyzed inflammatory parameters.

In the application analysis, different metabolites and forms were used. On the one hand, 25-hydroxy-Vitamin D₃ and 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ solved in ethanol were endotracheal intubated. On the other hand, Vitamin D₃ loaded liposomes were used to overcome the hydrophobic characteristics of this vitamin. These liposomes were prepared in collaboration by the group of Prof. Lehr (HIPS, Saarbrücken, Germany). Also in this part an increase in the analyzed parameter was found after infection. But no significant differences between Vitamin D₃ and solvent application were seen in the number of leukocytes and amounts of IL-1 β and KC.

In the present study a significant breach in pulmonary host defense could be observed neither in Vitamin D₃ deficient animals nor after the application of Vitamin D₃. Consistent with further studies, these results demonstrated different immunological roles of Vitamin D₃ in humans and mice. This leads to the hypothesis that the mouse model is not qualified for studies of the role of Vitamin D₃ in immune systems.

2 Einleitung

Vitamin D

Das Vitamin D gehört zu der Klasse der fettlöslichen Vitamine und kommt sowohl in Pflanzen als Vitamin D₂ (Ergocaliferol) als auch in Tieren als Vitamin D₃ (Cholecalciferol) vor. Meist wird das Wort Vitamin D als Synonym für diese beiden Formen verwendet. In dieser Arbeit jedoch steht der Begriff Vitamin D (VitD) als Oberbegriff für beide Formen des Calciferols des VitD und ihrer Metaboliten.

2.1 VitD-Metabolismus

VitD kann zum einen, wie es bei Vitaminen üblich ist, durch die Aufnahme von frischer Nahrung dem Körper zugeführt werden. Hier ist es besonders in tierischen Nahrungsmitteln in hohen Konzentrationen enthalten. Daneben liefern aber auch viele pflanzliche Produkte, wie z. B. Champignons und Avocados, eine relativ hohe Menge an VitD. Zum anderen ist der Organismus auch zu einer körpereigenen VitD-Synthese im Stande.

Ausgangsprodukt für die endogene Synthese des VitD ist das 7-Dehydroxycholesterol. Dieses wird in der Haut, vorzugsweise im Stratum spinosum und basale, durch die Einwirkung von UV-Strahlung zum Pre-Cholecalciferol synthetisiert (Rauschkolb *et al.*, 1969, Fairney *et al.*, 1979). Durch eine weitere temperaturabhängige Reaktion entsteht im nächsten Schritt das Cholecalciferol. Im Anschluss wird dieses sehr schnell mit Hilfe des VitD-Bindeproteins (DBP) durch die Blutzirkulation transloziert (Holick *et al.*, 1980) (Abb. 1).

Für die weiteren Syntheseschritte werden mitochondriale Cytochrom P450 Enzyme (Cyp) benötigt. Die erste Hydroxylierung findet exklusiv in der Leber statt (Ponchon and DeLuca, 1969b). Dabei wird das Cholecalciferol durch die 25-Hydroxylasen (hauptsächlich durch Cyp2R1) an dem 25. Kohlenstoffatom hydroxyliert (Cheng *et al.*, 2004). Zunächst wurde das Produkt 25-Hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃) als die biologisch aktive VitD-Form eingestuft (Ponchon and Deluca, 1969a). Jedoch änderte sich diese Meinung durch die Entdeckung und Charakterisierung des 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃). Dieser biologisch aktive VitD-Metabolit geht aus einer zweiten Hydroxylierung am ersten Kohlenstoffatom hervor (DeLuca, 1972). Dieser Schritt wird durch die 25-Hydroxyvitamin-D-1 α -Hydroxylase (Cyp27B1)

katalysiert (Haussler *et al.*, 1971) und findet vorrangig in den Nieren statt (Lawson *et al.*, 1969, Holick *et al.*, 1971). Die Inaktivierung des VitD wird durch die 24-Hydroxylase (Cyp24A1) katalysiert (Ohyama *et al.*, 1991). Dabei kann sie sowohl 25(OH)D₃ als auch 1,25(OH)₂D₃ an der Position 24 hydroxylieren und somit die biologische Aktivitäten inhibieren und den Abbau einleiten (Omdahl *et al.*, 2002) (Abb. 1).

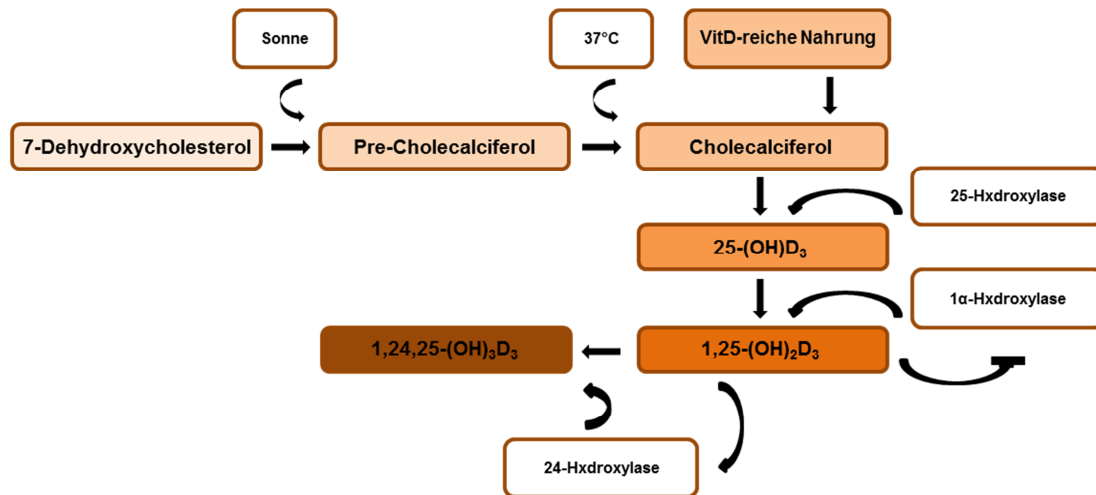


Abbildung 1: Schematische und vereinfachte Darstellung des VitD-Metabolismus. Das körpereigene 7-Dehydroxycholesterol wird in einem UV-abhängigen Mechanismus zum Pre-Cholecalciferol umgebaut. In einem nächsten temperaturabhängigen Syntheseschritt entsteht aus dem Vorläufer das Cholecalciferol oder dieses wird direkt aus der Nahrung bezogen. In der Leber wird dieses am 25. Kohlenstoffatom hydroxyliert und danach durch den gesamten Organismus transportiert. Die Aktivierung durch eine zweite Hydroxylierung an der ersten Position findet vornehmlich in den Nieren, aber auch in vielen weiteren Zelltypen, statt. Durch die Hydroxylierung am 24. Kohlenstoffatom wird das VitD inaktiviert. 1,25(OH)₂D₃ kontrolliert dabei selbst seine Aktivierung durch die Repression der 1α- und die Aktivierung der 24-Hydroxylase auf Transkriptionsebene.

Bedingt durch die fundamentalen biologischen Funktionen des VitD ist die Kontrolle seines Auf- und Abbaus von enormer Bedeutung. Verschiedene Stoffe und Moleküle, die durch VitD beeinflussten Signalwege, sind stark an der Regulation des VitD-Stoffwechsels beteiligt (Christakos *et al.*, 2010). So erhöht sich besonders bei einem Mangel an Kalzium oder Phosphat die Konzentration an 1,25(OH)₂D₃ (Murayama *et al.*, 1999, Yoshida *et al.*, 2001). Auch das Parathormon (PTH), welches ebenfalls den Kalziumhaushalt reguliert, beeinflusst stark die Aktivität der Cyp27B1 und induziert die Aktivierung des VitD (Murayama *et al.*, 1999). Andersherum reguliert VitD sich selbst (Abb. 1) und die Konzentrationen an PTH. Dabei inhibiert 1,25(OH)₂D₃ die Expression seines eigenen aufbauenden Enzyms (Takeyama *et al.*, 1997) und des PTH (Chertow *et al.*, 1980, Gruson *et al.*, 1982) (Abb. 2). Wiederum erhöht 1,25(OH)₂D₃ auch die Konzentration an Cyp24A1 und fördert somit seinen eigenen Abbau (Iwata *et al.*, 1995, Murayama *et al.*, 1999) (Abb. 1).

2.2 Transport des VitD

Eine wichtige physiologische Anforderung ist der Transport des VitD und aller seiner Formen durch den gesamten Organismus. Schon lange vor der Isolation und Charakterisierung des DBP war bekannt, dass das Cholecalciferol und seine Metaboliten gebunden an einem Protein durch die Blutzirkulation an ihre Einsatzorte befördert werden. Aber erst 1971 konnte das DPB erstmals aus Blutplasma isoliert und in den folgenden Jahren charakterisiert werden (Peterson, 1971, Bouillon *et al.*, 1976, Imawari *et al.*, 1976). Dieses ist dazu fähig alle physiologischen Formen des VitD zu binden, zeigt jedoch die stärkste Affinität zu der „Speicher- oder Transportform“ 25(OH)D₃ (Belsey *et al.*, 1974) (Abb. 2). Neben dem spezialisierten DBP ist auch das Plasmaprotein Albumin dazu fähig VitD zu binden und dieses durch die Blutzirkulation zu transportieren. Diese Affinität ist jedoch nicht so stark ausgeprägt, wie jene zwischen VitD und DBP (Bikle *et al.*, 1986).

2.3 Zelluläre Wirkung des VitD

Seit fast 100 Jahren ist bekannt, dass VitD die Absorption von Kalzium reguliert. Jedoch blieb der molekulare Mechanismus lange Zeit unbekannt. Erst durch die Entdeckung des zellulären Rezeptors des VitD (VDR) und dass dieser zusammen mit der aktiven VitD-Form Einfluss auf verschiedene transkriptionelle Genregulationen nehmen kann, wurde die molekulare Aufgabe des VitD deutlicher.

2.3.1 Zellulärer Mechanismus des VitD auf Genregulationen

1968 beschrieb Haussler erstmals einen Rezeptor, der im Zellkern lokalisiert ist und spezifisch an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ binden kann (Haussler *et al.*, 1968). Dieser VDR konnte später auch von weiteren Wissenschaftlern aus nuklearen Fraktionen isoliert und charakterisiert werden (Christakos and Norman, 1979). Durch die zytosolische Bindung an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kann der VDR in den Kern translozieren, an spezifische DNA-Regionen („Vitamin D response element“: VDRE) binden und so die Transkription verschiedener Gene beeinflussen (Pike and Haussler, 1979, Colston and Feldman, 1980, Liao *et al.*, 1990).

Der VDR gehört zu der Familie der Steroidrezeptoren, welche u. a. aus den Rezeptoren des PTH, des Vitamin A und VitD besteht (Kliwer *et al.*, 1992, Germain *et al.*, 2006). Diese nuklearen Rezeptoren agieren als Transkriptionsfaktoren, welche einer genauen Regulation unterliegen. Hierzu besitzen diese Rezeptoren verschiedene Bindungsdomänen, welche durch die Interaktion mit verschiedenen Faktoren in ihren Aufgaben regulieren (Evans, 1988, Green and Chambon, 1988, O'Malley, 1990). Die am höchsten konservierten Domänen sind jene für die Bindung an die DNA und der Liganden. Durch die Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren ändern diese ihre Konformation und die Translokation der Rezeptoren in den Kern wird initiiert, wo die gebildeten Komplexe an ihre spezifischen Sequenzen binden können (Brumbaugh and Haussler, 1974, 1975) (Abb. 2).

Dazu können die Steroidrezeptoren Monomere, Homodimere oder Heterodimere ausbilden. In der Abwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bildet der VDR bevorzugt Homodimere aus. Die Bindung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu dessen Konformationsänderung und die Bildung von Heterodimeren mit dem Rezeptor für 9-cis-Retinsäure (RXR) wird begünstigt (Haussler, 1986, Kimmel-Jehan *et al.*, 1997). Andersherum stimuliert die RXR-Ligandenbindung die Destabilisierung des Heterodimers (Cheskis and Freedman,

1994) (Abb. 2). Zumindest *in vitro* konnten auch Heterodimere von VDR mit den Rezeptoren für PTH und für die all-trans-Retinsäure nachgewiesen werden (Schrader *et al.*, 1994, Carlberg, 1995). Diese Hypothese konnte jedoch in anderen Studien nicht gestärkt werden, in welchen die exklusive Bindung des VDR an den RXR postuliert wurde (Carlberg, 1995, Thompson *et al.*, 1999).

Die gebildeten VDR-Dimere translozieren in den Kern und binden an ihre spezifischen VDRE (Brumbaugh and Haussler, 1975, Demay *et al.*, 1990) (Abb. 2). Diese Nukleotidsequenzen können sich im Falle des VDR, mehr als bei den anderen Mitgliedern der Steroidrezeptorfamilie, in verschiedenen Genen stark unterscheiden (Carlberg, 1995). Diese aufeinanderfolgenden Sequenzwiederholungen, -palindrome oder invertierter Palindrome werden durch unterschiedlich vielen Nukleotiden voneinander getrennt und entscheiden über die bindenden Dimerformen, welche in der entsprechenden Promotorregion binden (Umesono *et al.*, 1991, Carlberg, 1993).

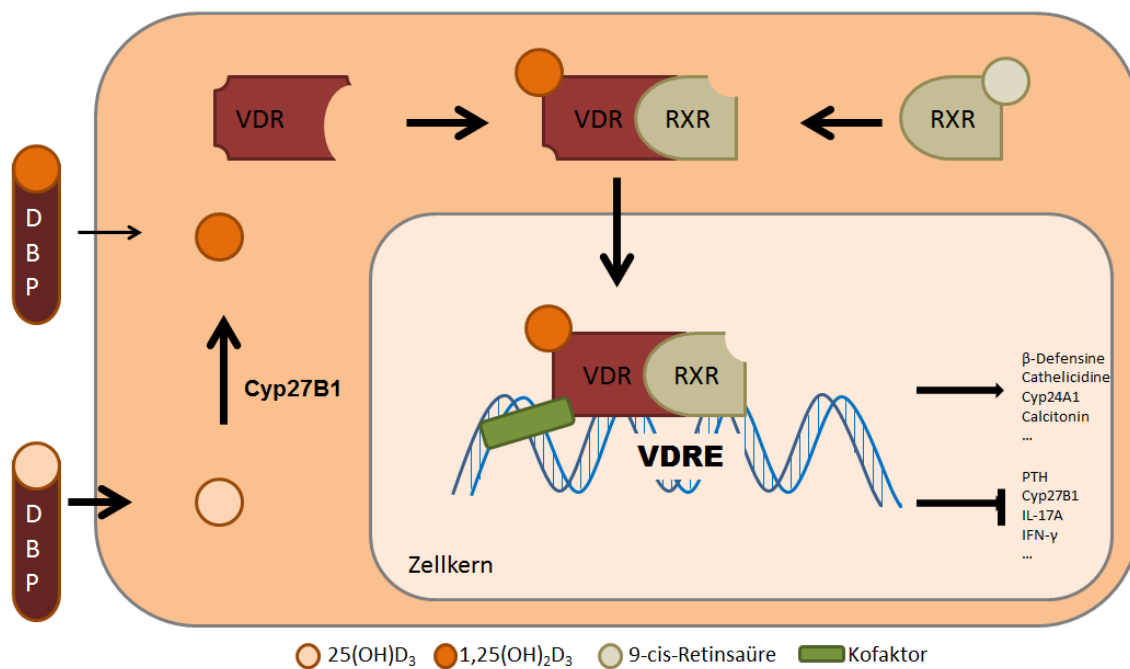


Abbildung 2: Schematische Darstellung des zellulären Signalweges des VitD. Das VitD erreicht die Zelle in den meisten Fällen als 25(OH)D₃ oder in geringeren Mengen als bereits in den Nieren aktiviertes 1,25(OH)₂D₃. Das 25(OH)D₃ wird in der Zelle durch das mitochondriale Cytochrom Cyp27B1 hydroxyliert und aktiviert. Durch die Bindung des 1,25(OH)₂D₃ an den VDR wird die Bildung des Heterodimers mit dem RXR begünstigt und der Komplex kann in den Zellkern translozieren. Die Bindung der 9-cis-Retinsäure an seinen Rezeptor wiederum destabilisiert die Bildung des VDR-RXR-Heterodimers und somit den Signalweg dieses Komplexes. Weitere Ko-Faktoren regulieren die Konformationsänderung des DNA-Stranges und somit die Zugänglichkeit des VDR-Komplexes zu seiner spezifischen Nukleotidsequenz, dem VDRE. Durch die Bindung des VDR an den DNA-Strang kann das VitD die Expression verschiedenster Gene aktivieren (z. B. β-Defensin, Cathelicidine, usw.) oder inhibieren (z. B. PTH, Cyp27B1, usw.). DBP – VitD Bindeprotein, RXR – Rezeptor der 9-cis-Retinsäure, VDR – VitD Rezeptor, VDRE – VitD response element.

Durch die Bindung der VDR-Dimere an den spezifischen VDRE wird die Konformationsänderung der DNA eingeleitet (Kimmel-Jehan *et al.*, 1999). Darüber hinaus nehmen verschiedene weitere Moleküle Einfluss auf die Aktivität des VDR. Dabei binden diese Ko-Faktoren an bestimmte, aber variable Stellen innerhalb der DNA-Bindungsdomäne des VDR, nehmen aber keinen Einfluss auf dessen DNA-Bindungseigenschaften (Masuyama *et al.*, 1997, Toell *et al.*, 2000). Diese sind u. a. dafür zuständig, durch die Acetylierung der Histone, den DNA-Strang zu öffnen und beeinflussen so die Transkription des Zielgens (Jones *et al.*, 1998) (Abb. 2).

Die ersten Beschreibungen des VDR wurden exklusiv in den Nieren durchgeführt. Jedoch konnte der Rezeptor mit den Jahren auch in den meisten anderen Organen und Zelltypen nachgewiesen werden (Walters, 1992). Dazu gehören z. B. die Haut, die Milchdrüsen und die Hoden (Colston *et al.*, 1980, Walters *et al.*, 1986, Gensure *et al.*, 1991). Aber auch pulmonale und verschiedene Zellen des Immunsystems, wie epitheliale Zellen der Lunge, Monozyten oder Lymphozyten sind zur Expression des VDR fähig (Bhalla *et al.*, 1983, Provedini *et al.*, 1983, Wang *et al.*, 2012).

Die Sequenzen des VDRE können in vielen verschiedenen Promotorregionen verschiedenster Gene gefunden werden. VitD nimmt so über seinen Rezeptor Einfluss auf die verschiedensten physiologischen Prozesse, wie z. B. den Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel oder das Immunsystem (Pike *et al.*, 2007).

2.4 Die physiologische Einflüsse des VitD

2.4.1 Die Rolle des VitD im Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel und in der Knochenhomöostase

Rückblickend war bereits vor über 100 Jahren bekannt, dass VitD eine fundamentale Rolle im Aufbau der Knochen spielen muss. So beschrieb bereits Huldschinsky 1919, dass neben frischer Nahrung, Lebertran und Sonnenlicht schon die Bestrahlung mit einer Quecksilberlampe zu einer enormen Verbesserung der Rachitis im Kindesalter führt (Huldschinsky, 1919). Heute weiß man, dass auf all diesen Wegen das VitD unserem Körper zur Verfügung gestellt werden kann.

Ein gestörter Mineralienhaushalt ist u. a. die Grundlage des Krankheitsbildes der Rachitis. Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine der ersten charakterisierten physiologischen Aufgaben des VitD die direkte Beeinflussung der intestinalen Kalziumabsorption war (Nicolaysen, 1937, Carlsson, 1954). Im selben Zuge wurde festgestellt, dass VitD indirekt die zelluläre Aufnahme des Phosphates beeinflussen kann, aber dafür das Zusammenspiel mit Kalzium notwendig ist (Harrison and Harrison, 1961). Nach der Entdeckung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stellte sich heraus, dass dieser Metabolit für diese Aufgaben zuständig ist (Chen *et al.*, 1974), denn $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte nicht nur schneller, sondern auch effektiver als $25(\text{OH})\text{D}_3$ die Kalziumabsorption und Knochenmineralisierung erhöhen (Tanaka and Deluca, 1971, Boyle *et al.*, 1972, Tanaka *et al.*, 1972).

VitD nimmt in diesem Zusammenhang Einfluss auf verschiedene Gene, die für den Kalziumtransport und gesunde Knochen zuständig sind. Das bekannteste und wohl eins der ersten nachgewiesenen Gene stellt dabei das Calbindin da. Dieses kalziumbindende Protein wird direkt auf Transkriptionsebene durch den VDR-Komplex reguliert (Theofan *et al.*, 1986, Bronner, 2001). Ein weiteres Beispiel ist das Osteocalcin, wessen Expression auch durch das VitD reguliert wird. Das Osteocalcin ist ein essentielles Protein der extrazellulären Matrix der Knochen und kontrolliert dabei die Kalziumaufnahme und -ausscheidung (Price and Baukol, 1980, Pike *et al.*, 2007, Zoch *et al.*, 2015). Auch PTH unterliegt einer transkriptionellen Regulation durch das VitD. Dieses Steroidhormon übernimmt ebenso verschiedene Rollen im Auf- und Abbau des Knochenskelets, u. a. durch die Kontrolle der Kalziumaufnahme (Silva and Bilezikian, 2015). Das PTH wird exklusiv in den Nebenschilddrüsen produziert und auch die Expression des VDR an diesem Ort konnte früh nachgewiesen werden.

Darüber hinaus weist das PTH-Gen die Bindestelle des VDR auf, wodurch das VitD in der Lage ist, die Expression des PTH zu inhibieren (Hughes and Haussler, 1978, Chertow *et al.*, 1980, Gruson *et al.*, 1982). Weiter konnte gezeigt werden, dass VitD die Expression von Calcitonin, dem Gegenspieler des PTH im Kalziummetabolismus, erhöhen kann (Segond *et al.*, 1985). Wiederum regulieren PTH, Calcitonin und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zusammen den molekularen Metabolismus des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Murayama *et al.*, 1999).

Daher zeigt sich, dass VitD nicht nur direkt für einen ausgeglichenen Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel essentiell ist, sondern dass auch die Regulation aller mitwirkenden Proteine eine fundamentale Aufgabe des VitD ist. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kontrolliert dabei nicht nur die intestinale Kalziumabsorption, sondern auch dessen Transport im kardialen System (Walters *et al.*, 1986).

2.4.2 Die Rolle des VitD im Immunsystem

1935 beschrieb A. R. Masten, dass schon die Inka und alten Griechen das Sonnenlicht zur Behandlung von Infektionskrankheiten wie Tuberkulose einsetzten (Masten, 1935). Weiter erläuterte er, dass Sonnenlicht und Lebertran zu einer verbesserten Bekämpfung von *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) und einer verbesserten Gesundheit führen können. Mit der Entdeckung, dass wichtige Gene des VitD-Metabolismus auch in immunologischen Zellen exprimiert werden können, wurde der Einfluss des VitD das Immunsystem betreffend immer deutlicher (Adams *et al.*, 1983, Provvedini *et al.*, 1983, Adams and Gacad, 1985). Heute weiß man, dass VitD viele verschiedene Aufgaben in der Regulation der Immunantwort übernimmt und somit für eine ausgewogene mikrobielle Bekämpfung und der Endzündungsreaktionen essentiell ist.

2.4.2.1 Der Einfluss des VitD auf spezifische Zellen des respiratorischen Abwehrsystem

Makrophagen und Epithelzellen bilden den Hauptanteil der Zellen, welche für die erste Immunantwort im respiratorischen System zuständig sind. Dabei handelt es sich vorzugweise um spezialisierte Zellen dieser Zelltypen, die auf die besonderen Bedürfnisse der Lunge abgestimmt sind.

Makrophagen im pulmonalen System sind nicht nur für die direkte Beseitigung von Pathogenen durch Phagozytose zuständig, sondern auch für das Anlocken weiterer Leukozyten zum infizierten Ort und zur anschließenden Klärung der Entzündung (Byrne *et al.*, 2015). Alveolare Makrophagen (AM) sind zur Synthese der Cyp27B1 befähigt und können so nach ihrer Aktivierung endogen das VitD in seine aktive Form umwandeln (Adams *et al.*, 1983, Adams and Gacad, 1985, Adams *et al.*, 1985). Auch der VDR wird in diesen Zellen synthetisiert und kann Makrophagen in ihrer Aktivität maßgeblich regulieren (Korf *et al.*, 2012). Verschiedene Studien zeigten, dass VitD die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen begünstigt (Mangelsdorf *et al.*, 1984, Hewison *et al.*, 1992). Des Weiteren induziert die Applikationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Synthese von antimikrobiellen Peptiden und führt zur inhibierenden Wirkung auf den NF- κ B-Signalweg (Liu *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2012, Chen *et al.*, 2013).

Epithelzellen der Lunge sind besonders spezialisierte Zellen, da diese sowohl eine starke Barriere gegen Pathogene aufbauen, aber dabei auch für die konstante Durchlässigkeit der Atemluft sorgen müssen. Diese Zellen sind u. a. dafür zuständig, mit weiteren Zellen des Immunsystems, wie AM, zu kommunizieren, direkt Pathogene zu bekämpfen und diese im Anschluss zu beseitigen (Whitsett and Alenghat, 2015). Diese sind ebenso in der Lage die Cyp27B1 zu exprimieren und so das VitD zu aktivieren (Hansdottir *et al.*, 2008). Somit kann $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch hier die Expression der antimikrobiellen Peptide induzieren (Yim *et al.*, 2007, Rigo *et al.*, 2012). Des Weiteren sorgt VitD für die Regulation der Synthese verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin (IL) -1 β oder IL-8. Im Gegensatz zu der fördernden Wirkung auf die Expression der antimikrobiellen Peptide, wird die Synthese dieser Proteine durch VitD inhibiert (Xue *et al.*, 2002, McNally *et al.*, 2011).

Die Neutrophilen nehmen dabei die Mikroorganismen durch Phagozytose auf und bilden verschiedene Stoffe, die zum Abtöten des Pathogen führen. Dazu zählen u. a. reaktive Sauerstoffspezies, proteolytisch aktive Peptide und Defensine (Bordon *et al.*, 2013). Neutrophile sind sehr kurzlebige Zellen, die den programmierten Zelltod unterlaufen und daraufhin von Makrophagen erkannt und mit Hilfe der Phagozytose beseitigt werden (Savill *et al.*, 1989). Durch das Absterben der Neutrophilen, werden anti-inflammatorische Proteine frei, die zu der Auflösung der Inflammation führen (Miles *et al.*, 2009). Im Gegenzug werden durch die anhaltende Aktivierung der Neutrophilen vermehrt toxische Substanzen, wie die reaktiven Sauerstoffspezies, frei gesetzt, die zu einem erheblichen Gewebsschaden führen (Bordon *et al.*, 2013). Fehlt nun das VitD, kann dies zu einer verringerten Ausschüttung an antimikrobiellen Peptiden und einer

beeinträchtigten Infektionsauflösung führen. Dadurch und durch das Fehlen der anti-inflammatorischen Wirkung des VitD kommt es zu einer verlängerten und stärkeren Entzündungsreaktion, welches somit zu einer fehlgeleiteten Neutrophilen Funktion führen könnte.

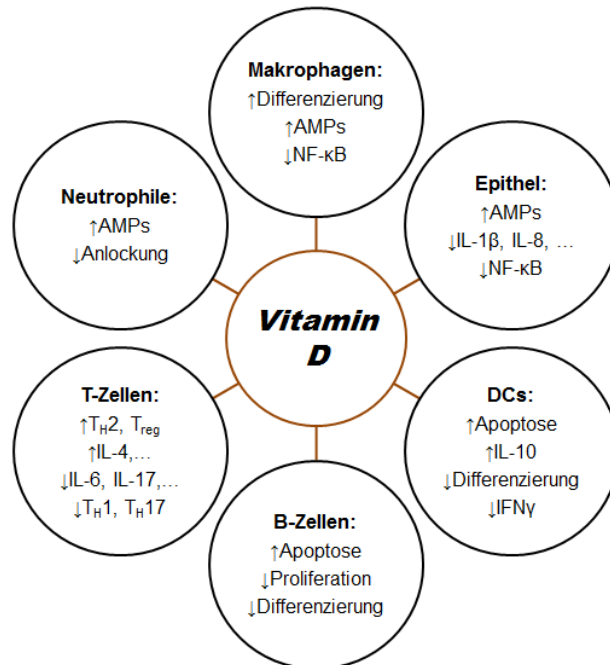


Abbildung 3: Einfluss des VitD auf verschiedene Zellen des Immunsystems. VitD beeinflusst fast alle Zellen des Immunsystems. Dabei nimmt es im Besonderen Einfluss auf die Differenzierung verschiedener Zelltypen. Außerdem erhöht das VitD die Synthese verschiedener antimikrobieller Proteine und anti-inflammatorischer Zytokine. Dagegen wird die Expression pro-inflammatorischer Proteine in vielen Fällen durch das VitD inhibiert. AMPs – Antimikrobielle Proteine, DCs – Dendritische Zellen, ↑ - fördernde Wirkung, ↓ - inhibierende Wirkung.

Auch die dendritische Zellen (DC) des angeborenen Immunsystems sind zu der Synthese der Cyp27B1 fähig und exprimieren den VDR (Veldman *et al.*, 2000, Gerke *et al.*, 2014b). Somit kann auch dieser Zelltyp in der Lunge von VitD beeinflusst werden (Griffin and Kumar, 2003). DC bilden einen wichtigen Link zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem, indem sie die Reifung der T-Zellen, durch die Präsentation verschiedener Immunglobuline und Synthese verschiedener Zytokine, regulieren (Kopf *et al.*, 2015). Dabei inhibiert VitD nicht nur die Reifung der DC aus Monozyten, sondern auch deren Aktivität. Durch die Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃ wird die Abgabe von Interferon (IFN) -γ inhibiert und die Abgabe von IL-10 gefördert. Des Weiteren fördert VitD die Apoptose der DC und kontrolliert somit maßgeblich das Überleben dieser Zellen (Penna and Adorini, 2000).

2.4.2.2 Der Einfluss des VitD auf die Expression antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide sind Teil des angeborenen Immunsystems und können von den dazugehörigen Zellen, wie Makrophagen, Neutrophilen, DC, natürlichen Killer- und Epithelzellen, synthetisiert werden. Nach der Sezernierung sind diese Proteine u. a. dazu fähig eingewanderte Mikroorganismen zu eliminieren (Wang, 2014).

Verschiedene Gruppen zeigten in den letzten Jahren, dass VitD besonders die Synthese des Cathelicidine des Menschen (CAMP) beeinflusst (White, 2010). So befindet sich das VDRE in vielen Spezies in der Promotorregion dieser Gene und der VDR kann zusammen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Expression des CAMP stimulieren und somit dessen Sekretion erhöhen (Wang *et al.*, 2004, Gombart *et al.*, 2005, Schaubert *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2009). Ein weiteres Beispiel, für die antimikrobielle Wirkung des VitD, ist das humane β -Defensin-2 (hBD2). Wie beim CAMP findet man auch hier häufig VDRE-Regionen, wobei VitD auch die Expression des hBD2 induziert (Wang *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2009). Diese antimikrobiellen Peptide nehmen, neben der direkten Bekämpfung der Pathogene, Einfluss auf die Expression inflammatorischer Proteine, locken verschiedene Leukozyten zur infizierten Region und sind an der Wundheilung beteiligt (Ramanathan *et al.*, 2002, Hiemstra, 2007).

Jedoch scheint es, dass dieser Mechanismus nicht in allen Spezies gefunden werden kann. So sind die VDRE-Sequenzen in den Promotoren von CAMP und hBD2 in Primaten hoch konserviert, aber in den Homologen der Nagern nicht zu finden (Gombart *et al.*, 2009, Dimitrov and White, 2015). Des Weiteren kann das murine CAMP-Homolog in Mäusen ohne funktionsfähigen VDR in gleicher Stärke exprimiert werden wie in den entsprechenden Wildtyp (WT) Mäusen, aber ein Polymorphismus im VDR-Gen führt bei Menschen zu erheblichen Beeinträchtigungen des Immunsystems (Selvaraj *et al.*, 2000, Gombart *et al.*, 2005, Sharma *et al.*, 2011).

2.4.2.3 Der Einfluss des VitD auf die NF- κ B-Signalwege und die Synthese verschiedener Zytokine

VitD moduliert die Antworten des Immunsystems nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern ist auch durch die direkte Interaktion im NF- κ B-Signalweg dazu in der Lage außerhalb des Zellkerns diese zu beeinflussen. Die verschiedenen Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie regulieren tausende von Genen und maßgeblich das Immunsystem (Alvira, 2014). Die Mitglieder der NF- κ B-Familie sind

nicht nur in fast allen Zelltypen zu finden, sondern sind auch über die Spezies hinweg hoch konserviert. Im inaktiven Zustand, liegen die NF- κ B-Untereinheiten in Dimeren im Cytosol vor und werden dort durch ihren Inhibitor (I κ B) stabilisiert. Dabei wird die Translokation des NF- κ B in den Kern und die transkriptionelle Beeinflussung inhibiert. Erst auf einen exogenen Stimulus, z. B. die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren (TLR) hin, wird das I κ B phosphoryliert, von den NF- κ B-Untereinheiten gelöst und im Anschluss abgebaut. Die Aufgabe der Phosphorylierung übernimmt der I κ B α -Kinase-Komplex (IKK) (Napetschnig and Wu, 2013). Dieser muss zuvor selbst phosphoryliert werden, um die Aktivierung von NF- κ B zu übernehmen (Scheidereit, 2006). Genau in diesem Schritt greift der VDR ein. Dieser kann direkt an die IKK-Untereinheiten binden, deren Phosphorylierung verhindern und so diese stabilisieren (Wu *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2013). Somit können die NF- κ B-Untereinheiten nicht vom I κ B gelöst werden, nicht in den Kern wandern und auch nicht die Expression der Zielgene beeinflussen (Cohen-Lahav *et al.*, 2006). Die NF- κ B-Familie ist im Besonderen in die Regulation der Expression verschiedener Gene des Zellmetabolismus, der Zelladhäsion, der allgemeinen Stressreaktionen und der Immunantwort involviert. Dabei wird vor allem die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine gefördert (Alvira, 2014) und die Behandlung mit VitD kann durch die Inhibierung des NF- κ B-Signalweges u. a. die Expression von IL-8 und IL-6 supprimieren (Harant *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 2010).

IL-8 und seine speziesspezifischen Homologe (z. B. murines KC) spielen besonders in der Rekrutierung der Neutrophilen eine wichtige Rolle. Sowohl AM als auch das Epithel können diese Chemokine bilden und durch dessen Ausschüttung Neutrophile zur infizierten Region locken, welche nach der Aktivierung die Mikroorganismen aufnehmen und somit zur Auflösung der Infektion einen essentiellen Beitrag leisten (Hashimoto *et al.*, 1996, Kooguchi *et al.*, 1998, Raoust *et al.*, 2009). Jedoch führt eine erhöhte Synthese von IL-8 auch zu einem Anstieg an Neutrophilen und dessen Produkte, was ohne Regulation zu einem erheblichen Gewebsschaden oder gar zu septischen Schock oder dem Tod führen kann (Bonfield *et al.*, 1995, Boutten *et al.*, 1996, Monton *et al.*, 1998). Jedoch kann die Behandlung mit VitD zu einer verminderte Synthese des pro-inflammatorischen IL-8 führen und somit die Entzündungsreaktion stark regulieren (Gerke *et al.*, 2014a, Dauletbaev *et al.*, 2015).

Auch IL-1 β gehört zu der angeborenen Immunantwort, wird jedoch nicht wie die meisten Zytokine direkt nach der Expression sezerniert, sondern liegt zunächst im Zytosol als Pro-IL-1 β vor. Erst durch die aktive Spaltung durch die Caspase 1, welche selbst erst auf exogene Stimuli hin reift, wird IL-1 β aktiv und kann die Zelle verlassen (Netea *et al.*, 2010). IL-1 β kann von den meisten Leukozyten gebildet werden und

nimmt dabei Einfluss auf lokale und systemische Entzündungsreaktionen. Es rekrutiert nicht nur Leukozyten, sondern ist auch für dessen Aktivierung wichtig. Daneben bildet dieses Zytokin ein Schlüsselprotein zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems und kann die Differenzierung von T-Helferzellen (T_H) T_H -1 und T_H 17 begünstigen (Hamzaoui *et al.*, 2014).

2.4.2.4 Der Einfluss des VitD auf die Reifung und Funktion von T- und B-Lymphozyten

Neben den Zellen des angeborenen Immunsystems, sind auch Zellen, die die adaptive Immunantwort regulieren, zur Expression des VDR und der Cyp27B1 befähigt (Walters, 1992, Gerke *et al.*, 2014b). So beeinflusst VitD auch die Differenzierungs- und Proliferationseigenschaften von B- und T-Zellen.

T-Zellen werden zum einen für eine ausreichende Bekämpfung eingedrungener Pathogene und zum anderen für die anschließende Entzündungsauflösung benötigt und werden dabei maßgeblich von VitD reguliert (Cantorna *et al.*, 2015). Durch die Behandlung mit $1,25(OH)_2D_3$ kann nicht nur die Proliferation von T_H -Zellen inhibiert werden (Nunn *et al.*, 1986, Provvedini and Manolagas, 1989), sondern VitD nimmt auch einen Einfluss auf deren Differenzierung. Dabei inhibiert es die Bildung von T_H 1- und T_H 17-Zellen und begünstigt die Differenzierung zu T_H 2- und regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) (Lemire *et al.*, 1995, Boonstra *et al.*, 2001, Colin *et al.*, 2010, Prietl *et al.*, 2010).

Durch die Regulation des VitD auf die Synthese von verschiedenen Zytokinen wird auch die Differenzierung der T_H -Zellen stark beeinflusst. Durch die verminderte Synthese von IL-6 und IFN- γ wird die Bildung von T_H 1- und T_H 17-Zellen inhibiert (Lemire *et al.*, 1995, Bettelli *et al.*, 2007, Korn *et al.*, 2007). Hingegen führt die verminderte IL-6 Synthese und die Induktion verschiedener weiterer Gene zu einer Erhöhung der T_{reg} -Anzahl (Prietl *et al.*, 2010). Die Induktion der IL-4 Synthese führt hierbei zu einer Erhöhung der T_H 2-Zellen (Overbergh *et al.*, 2000, Boonstra *et al.*, 2001).

Die verminderte Bildung von T_H 17-Zellen durch die Wirkung des VitD werden auch weniger IL-17-Zytokine gebildet. VitD kann dabei die Expression von IL-17A direkt inhibieren, was zu einer verminderten Induktion der Synthese von pro-inflammatorischen Zytokine wie IL-8 und einer verminderten Rekrutierung von Neutrophilen führen kann (Bettelli *et al.*, 2007, Korn *et al.*, 2007, Joshi *et al.*, 2011). Hingegen führt die fördernde

Wirkung des VitD auf die Bildung von T_H2 - und T_{reg} -Zellen zu einem Anstieg des anti-inflammatorischen IL-10 und zu einer erhöhten Entzündungsauflösung (Spach *et al.*, 2006, Prietl *et al.*, 2010).

Auch die Klasse der B-Zellen ist in der Lage, das VitD zu aktivieren, es abzubauen und seinen Rezeptor zu exprimieren. Im Besonderen wird nach der Aktivierung der B-Zellen die Bildung $1,25(OH)_2D_3$ und seines Rezeptors gefördert. Dabei kann das VitD nicht nur die Proliferation der B-Zellen supprimieren, sondern auch deren Apoptose fördern (Chen *et al.*, 2007). Darüber hinaus reduziert $1,25(OH)_2D_3$ die Bildung spezifischer Immunglobuline und deren weitere Differenzierung (Lemire *et al.*, 1984, Lemire *et al.*, 1985, Chen *et al.*, 2007, Rolf *et al.*, 2014).

2.5 Die Auswirkungen des systemischen Mangels an VitD auf physiologische Funktionen

Ausgehend davon, dass die endogene Umsetzung von 7-Dehydroxycholesterol zum Pre-VitD nur durch die Einwirkung von UV-Einstrahlung möglich ist (Rauschkolb *et al.*, 1969, Fairney *et al.*, 1979), findet man besonders in Regionen der Erde und in Jahreszeiten, in denen die Sonneneinstrahlung stark eingeschränkt ist, häufig einen systemischen Mangel an VitD (Le Roy *et al.*, 2013). Auch der Schutz der Haut vor UV-Strahlung, wie eine verstärkte Pigmentierung der Haut oder die Verwendung von Sonnenschutzcremes, können die Synthese von VitD inhibieren (Matsuoka *et al.*, 1987, Ritterhouse *et al.*, 2014). Die genaue Definition, ab welchen Serumkonzentrationen an 25(OH)D₃ ein Mensch einen Mangel oder eine Insuffizienz aufweist, unterscheidet sich stark zwischen verschiedenen Ländern und Institutionen. Jedoch zeigen viele Studien, dass Werte unter 50 nmol/L häufig mit verschiedenen Krankheiten assoziiert sind und Werte zwischen 75 nmol/L und 100 nmol/L als optimal angesehen werden können (Litonjua and Weiss, 2007).

Neben den „klassischen“ Aufgaben des VitD im Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel wurde die physiologische Rolle des VitD in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts immer komplexer. So beeinflusst dieses Vitamin auch das generelle Wachstum, die Zellproliferation und –differenzierung, die Muskeltätigkeiten, das Nervensystem, etc. und schließlich auch das Immunsystem (Walters, 1992). Die komplexe und fein abgestimmte Kontrolle des VitD-Metabolismus weist deutlich auf die Wichtigkeit eines ausgewogenen VitD Stoffwechsels hin. Daher ist es nicht überraschend, dass eine oder mehrere Beeinträchtigungen in dessen Metabolismus zu verheerenden Auswirkungen auf die Gesundheit führen können. Ferner können in verschiedensten Krankheitsbildern erniedrigte Werte des systemischen VitD gefunden werden (Holick, 2007).

2.5.1 VitD-Mangel in respiratorischen Erkrankungen

Auch bei vielen verschiedenen Erkrankungen der Lunge konnte ein verminderter VitD-Spiegel im Blutkreislauf nachgewiesen werden. Die chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine weitverbreitete, oft durch Rauchen initiierte Krankheit, die zu den häufigsten Todesursachen weltweit zählt (Murray and Lopez, 1997). Sowohl die Verschlechterung des Gesundheitszustandes der COPD-Patienten,

als auch eine generelle verschlechterte Lungenfunktion korrelieren häufig mit einem erniedrigten VitD-Spiegel (Choi *et al.*, 2013, Lambert *et al.*, 2014).

Auch verschiedenste Krebsarten können mit einem Mangel an VitD in Verbindung gebracht werden. Jedoch scheint der Einfluss auf die Entstehung von Lungenkrebs noch ungeklärt (Herr *et al.*, 2011). In einigen Gruppen, wie Kinder und Frauen, konnte bereits ein Zusammenhang zwischen niedrigen VitD-Werten und einem erhöhten Krebsvorkommen gezeigt werden (Kilkinen *et al.*, 2008). Auch kann eine Mutation im VDR-Gen häufig mit zusammen mit einem schlechteren Krankheitsverlauf gefunden werden (Heist *et al.*, 2008) und einige präklinische Daten konnten eine Inhibierung des Krebswachstums durch VitD aufzeigen (Hershberger *et al.*, 1999, Nakagawa *et al.*, 2005, Mernitz *et al.*, 2007).

Des Weiteren zeigen Patienten mit Asthma einen eingeschränkten VitD-Metabolismus und auch Polymorphismen im VDR-Gen auf (Litonjua and Weiss, 2007, Tizaoui *et al.*, 2014). Dabei spielt wohl gerade die fehlende anti-inflammatorische Wirkung des VitD eine wichtigere Rolle, wobei das Immunsystem chronisch überreagieren kann. Auch Supplementationstherapien konnten schon erste Erfolge in der Behandlung von Asthma mit VitD aufzeigen (Pojsupap *et al.*, 2015).

Mukoviszidose ist eine sehr weitverbreitete, nichtheilbare Erbkrankheit, bei der eine Mutation im epithelialen Chlorid-Transporter zu einer Verdichtung des epithelialen Sekrets führt (Tsui and Buchwald, 1991, Karem and Karem, 1995). Daraus entsteht in der Lunge ein stark eingeschränkter Abtransport dieses Sekretes, eine beeinträchtigte Kommunikation der Epithelzellen mit der alveolaren Umwelt und eine stark erschwerte Beseitigung der Pathogenen. Diese Patienten zeigen dabei nicht nur eine deutlich erhöhte Anfälligkeit für Infektionen der Lunge, sondern auch in sehr vielen Fällen einen systemischen Mangel an VitD (Marcondes *et al.*, 2014, Simoneau *et al.*, 2014, Chesdachai and Tangpricha, 2015, Vanstone *et al.*, 2015).

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei weiteren chronischen Entzündungen der Lunge. In einigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen der Lunge und erniedrigten VitD-Werten gefunden (Wayse *et al.*, 2004, Ginde *et al.*, 2009, Belderbos *et al.*, 2011, Camargo *et al.*, 2011). Auch in den dunklen Wintermonaten steigen die Zahlen an respiratorischen Infektionen, einhergehend mit sinkenden VitD-Serumspiegel (Sabetta *et al.*, 2010).

Diese Patienten weisen dabei nicht nur häufiger Infektionen auf, sondern auch starke Beeinträchtigungen des Immunsystems. Ausgehend von der positiven Wirkung des VitD auf die Synthese von antimikrobiellen Peptiden können diese bei niedrigen

systemischen VitD-Werte stark erniedrigt sein (Jeng *et al.*, 2009, Lagishetty *et al.*, 2010). Durch eine beeinträchtigte Bakterienbeseitigung steigen die Entzündungswerte rapide an. Dabei zeigen diese Patienten u. a. eine deutliche Erhöhung der IL-8-Konzentrationen und der Anzahl an Neutrophilen in der Lunge (Patel *et al.*, 2002, Papi *et al.*, 2006). Gerade in den infizierten Bereichen der Lunge erhöht sich die Konzentration an IL-8 und die Anzahl der Neutrophilen, welches zu einem erhöhten Gewebsschaden in diesem Gebiet führt und die Überlebensfähigkeit stark einschränken kann (Bonfield *et al.*, 1995, Boutten *et al.*, 1996). Aber auch die Konzentrationen an weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen werden stark erhöht. Dazu zählen u. a. IL-6, TNF α und IL1 β (Fox-Dewhurst *et al.*, 1997). Im schlimmsten Fall können die beeinträchtigten Abwehrreaktionen zu einem septischen Schock oder gar zum Tod führen.

2.6 Die Supplementation von VitD als therapeutischer Ansatz

Auch in der heutigen Zeit gehören Lungenentzündungen noch zu den häufigsten Todesursachen weltweit (Murray and Lopez, 1997). Der exzessive Gebrauch von Antibiotika, besonders bei Patienten mit chronischen Erkrankungen, führt zu einer vermehrten Ausbreitung multiresistenter Mikroorganismen. Dagegen zeigt die Verwendung von antimikrobiellen Peptiden eine gute Effizienz bei der Behandlung von chronischen Infektionen. Diese sind jedoch sehr kostspielig und finden selten Verwendung (Youssef *et al.*, 2011, Youssef *et al.*, 2012). Daher scheint VitD mit seiner aktivierenden Wirkung auf die Synthese von antimikrobiellen Peptiden und seiner Stellung in der Regulation der Entzündungsreaktionen eine lukrative und kostengünstige Therapiemöglichkeit zu sein.

In der Vorbeugung und Behandlung von Rachitis ist die Erhöhung der systemischen Konzentration an VitD schon seit über 100 Jahre bewährt (Huldschinsky, 1919). Heute wird eine vorsorgliche VitD-Supplementation schon während der Schwangerschaft und im Kindesalter zur Rachitis-Vorbeugung verwendet (Shaw, 2015). Auch zur Behandlung von Krebspatienten wurden erste Studien durchgeführt. Aber hierbei scheint VitD nur eine positive Wirkung zu haben, wenn Zelltypen betroffen sind, die den VDR exprimieren und daher auch eine transkriptionelle Aktivität des VitD aufweisen (Hausler *et al.*, 1986, Schwartz *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte die Behandlung mit VitD in den Wintermonaten, in denen die UV-Strahlung stark begrenzt ist, zu einer geringen Anzahl der Grippepatienten führen (Urashima *et al.*, 2010).

Eine US-amerikanische Studie weist darauf hin, dass der Mangel an VitD zu enormen Kosten im Gesundheitssystem führt und dabei mit einer Prävalenz für Staphylokokken- und Pseudomonaden-Infektionen einhergehen (Youssef *et al.*, 2012). Die Verwendung von Lebertran, Multivitamin Präparaten oder die reine VitD Applikation konnte bereits bei Infektionen des respiratorischen Systems mit diesen Bakterien zu positiven Ergebnissen führen (Linday *et al.*, 2004, Charan *et al.*, 2012). Die einmalige Gabe einer sehr hohen Dosis oder die Zufuhr von täglichen hohen Dosen von Cholecalciferol scheint nicht nur die Antibiotikagabe und die Krankenhausaufenthalte zu dezimieren, sondern auch das generelle Auftreten an Infektionen und die Sekretion an pro-inflammatorischen Zytokinen senken (Manaseki-Holland *et al.*, 2010, Bergman *et al.*, 2012, Grossmann *et al.*, 2012a).

Wie jede Therapie birgt auch die VitD-Supplementation Nebenwirkungen und Gefahren. Durch die fördernde Wirkung auf die Kalzium-Absorption, können hohe

systemische VitD-Werte häufig mit einer Hyperkalzämie oder gar dem Tod assoziiert werden (Zittermann *et al.*, 2013). Die Verwendung von Ergo- oder Cholecalciferol zeigen aber meist keine negativen Effekte in klinischen Studien (Amrein *et al.*, 2011, Grossmann *et al.*, 2012a). Hingegen kann die Applikationen von Cholecalciferol, 25(OH)D₃ oder von 1,25(OH)₂D₃ im Nagermodell zu einem Anstieg des Kalziumspiegels und weiterer toxischer Begleiterscheinungen führen (Chow *et al.*, 2011, Deluca *et al.*, 2011). Daher ist es wichtig, die genaue Wirkung des VitD im Organismus zu charakterisieren und eine optimale Zufuhr an VitD zu finden, um die systemische Konzentration an 25(OH)D₃ zu erhöhen um den Gesundheitszustand zu verbessern, ohne dabei andere Signalwege zu stören.

2.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war das Verständnis über die Rolle des VitD im angeborenen Immunsystem der Lunge weiter auszubauen. Dabei sollte der Verlauf bakterieller Lungenentzündungen zum einen durch den Mangel und zum anderen durch die pulmonale Gabe von VitD im Mausmodell beschrieben werden.

Das erste Modell sollte den systemischen Mangel an VitD widerspiegeln, der häufig bei Patienten mit chronischen Entzündungsreaktionen der Lunge zu finden ist. Dafür sollte den Mäusen zunächst das VitD in der Nahrung entzogen werden, um den systemischen Mangel hervorzurufen. Im Anschluss sollten der Verlauf der Infektion und der respiratorischen Entzündungsreaktionen nach bakterieller Stimulation untersucht werden.

Im zweiten Modell sollten die Auswirkungen der direkten pulmonalen Applikation verschiedener Formen des VitD untersucht werden. Dabei wurde das VitD den Tieren endotracheale appliziert. Auch hier sollte im Anschluss der Infektions- und Inflamationsverlauf analysiert werden.

Das Hauptaugenmerk lag dabei zum einen auf der Auflösung der Infektion, durch die Charakterisierung des bakteriellen Überlebens nach definierten Zeitpunkten. Zum anderen sollte durch die Bestimmung ausgewählter pro-inflammatorischer Marker das akute Entzündungsgeschehen charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte, Materialien und Software

Gerät/Software	Art/Name	Hersteller
Durchlichtmikroskop	DM750	Leica (Deutschland, Wetzlar)
	Axiovert 25	Zeiss (Deutschland, Oberkochen)
Homogenisator	IKA® ULTRA-TURRAX® dispender T18	IKA®-Werke (Deutschland, Staufen)
Inkubatoren	Minitron	Infors HT (Deutschland, Einsbach)
	Hera Cell	Thermo Scientific (Deutschland, Schwerte)
Mikroplattenleser	Magellan	Tecan (Deutschland, Mainz)
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Biochrom (Deutschland, Berlin)
Statistik Programm	GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc. (USA, La Jolla)

Venenkanüle	Vasofix Braunüle; 18 G	Braun (Deutschland, Melsungen)
	Introcan Safety® 24GA	Braun (Deutschland, Melsungen)
Zählkammer	Neubauer improved	Hartenstein (Deutschland, Würzburg)
Zentrifugen	Cellspin II	Tharmac (Deutschland, Waldsolms)
	Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Scientific (Deutschland, Schwerte)
	Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific (Deutschland, Schwerte)
	Heraeus Labofuge 400	Thermo Scientific (Deutschland, Schwerte)

3.1.2 Reagenzien und Kits

Name	Hersteller
1,25(OH) ₂ D ₃	Sigma-Aldrich (Deutschland, Taufkirchen)
25(OH)D ₃	Sigma-Aldrich (Deutschland, Taufkirchen)
Diff-Quick	Medion (Deutschland, Gräfelfing)

DMEM/F12 + L-Glutamin	Life Technologies (Deutschland, Darmstadt)
DPBS	Life Technologies (Deutschland, Darmstadt)
Fötales Kälberserum (FBS)	Life Technologies (Deutschland, Darmstadt)
FLUKA Eukitt® Quick-hardening Mounting Medium	Sigma-Aldrich (Deutschland, Taufkirchen)
Glycerin Karlsruhe)	Carl Roth (Deutschland,
IKA® ULTRA-TURRAX® dispenser T18 Staufen)	IKA®-Werke (Deutschland,
LB-Agar Karlsruhe)	Carl Roth (Deutschland,
LB-Broth Karlsruhe)	Carl Roth (Deutschland,
LDH-Cytotoxicity Assay Kit II Cambridge)	Abcam (United Kingdom,
Nährbouillon Karlsruhe)	Carl Roth (Deutschland,
Nucleospin RNA Kit	Macherey-Nagel (Deutschland, Düren)
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Life Technologies (Deutschland Darmstadt)
RPMI 1640	Life Technologies (Deutschland Darmstadt)
Serum Albumin aus dem Kalb (BSA) Karlsruhe)	Carl Roth (Deutschland,
Trypticase™ Soy Agar II mit 5% Schafsblut	BD Bioscience (Deutschland, Heidelberg)

Todd-Hewitt Bouillon

Carl Roth (Deutschland,
Karlsruhe)

3.1.3 Lösungen und Medien

10x Phosphat gepufferte Saline (PBS)

80,06 g/l	Natriumchlorid (NaCl)
2,70 g/l	Kaliumchlorid
11,57 g/l	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
2,04 g/l	Kaliumdihydrogenphosphat

Auffüllen mit destilliertem Wasser

Mit Natriumhydroxid auf pH 7,2 – 7,4 einstellen

20x Tris gepufferte Saline (TBS)

48,50 g/l	Tris Base
152,00 g/l	NaCl

Auffüllen mit destilliertem Wasser

Mit Salzsäure auf pH 7,4 einstellen

3.1.4 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung
D39	nicht invasiver <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stamm
NH57388A	mukogener <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stamm aus Patientenisolat
PAO1	nicht mukogener <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stamm aus Patientenisolat

Material und Methoden

3.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Art	Herkunft
LA-4	murines epitheliales Lungenadenom	ATCC (Deutschland, Wesel)

3.1.6 Mauslinien

Mauslinie	Herkunft
C57BL/6N	Charles River (Deutschland, Köln) Janvier (Frankreich, Rennes)

3.1.7 Futter und Lösungen der Mausversuche

Substanzen	Beschreibung	Lieferant
VitD Mangelernährung	VitD Mangelfutter ohne 25(OH)D ₃	Altromin (Deutschland, Lage)
	VitD Kontrollfutter mit 500 I. E. 25(OH)D ₃	Altromin (Deutschland, Lage)
Ketamin	Analgetikum, Narkotika	Bayer
	7 mg/kg Körpergewicht bei Betäubung 35 mg/kg Körpergewicht bei Tötung	(Deutschland, Leverkusen)
Xylazin	Sedativum, Analgetikum, Muskelrelaxans	Bayer
	105 mg/kg Körpergewicht bei Betäubung 525 mg/kg Körpergewicht bei Tötung	(Deutschland, Leverkusen)

3.2 Mikro-, Molekularbiologie und Biochemie

3.2.1 Kultivierung und Hitzeinaktivierung von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) ist ein durch Trinkwasser übertragbares, Gram-positives Bakterium und kann sehr häufig bei immunsuppressiven Patienten mit chronischen Lungenentzündungen aus dem pulmonalen System isoliert werden (Campa *et al.*, 1993).

Aus einem Glycerolbestand bei -80°C wurden mit einer sterilen Impföse einige Mikroliter *P. aeruginosa* PAO1 entnommen (Stover *et al.*, 2000), auf LB-Agar Platten ausgestrichen und über Nacht (ü. N.) bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien einer Platte in 35 ml LB-Medium gelöst. Diese Suspension wurde bei 37°C, 180 rpm und unter aeroben Bedingungen für 2 h kultiviert. Anschließend wurde die Suspension bei 1.885xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 35 ml PBS gelöst und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Bakterien in einem geeigneten Volumen an PBS gelöst und auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 1 eingestellt.

Bei Versuchen mit lebendigen Bakterien wurde diese Lösung in einem gewünschten Volumen 1:10 mit PBS verdünnt. Für Versuche mit hitzeinaktivierten (h. i.) *P. aeruginosa* PAO1 wurden die Bakterien unverdünnt in geeigneten Aliquots in einem Heizblock bei 95°C für 10 min denaturiert und danach bei -20°C aufbewahrt.

Zur Quantifizierung der Bakterienmenge wurde die Anzahl der colony forming Units (CFU) bestimmt. Dafür wurden die Bakteriensuspensionen in entsprechenden Verdünnungen in einem Volumen von 50 µl auf LB-Agar Platten ausgestrichen und ü. N. bei 37°C kultiviert.

3.2.2 Kultivierung von *P. aeruginosa* NH57388A

Mukoide Bakterien sind dazu fähig, Alginate an die Umwelt abzugeben. Durch die Bildung von Alginaten, welche u. a. als Ausgangsprodukt für Biofilme gebraucht werden, sind Bakterien in der Lage sich dauerhaft im Organismus zu etablieren. Gerade in der Lunge schotten diese Bakterien sich so gegen das Immunsystem des infizierten Organismus ab und können zu einer chronischen Pneumonie führen. Der Bakterienstamm *P. aeruginosa* NH57388A ist ein Patientenisolat, dass zur Bildung von

Alginaten fähig ist und im Mausmodell zu einem subakuten Infektionsverlauf führen kann (Hoffmann *et al.*, 2005, Hoffmann *et al.*, 2007).

Aus einem Glycerolbestand bei -80°C wurden mit einer sterilen Impföse einige Mikroliter Bakteriensuspension entnommen, auf Trypticase™ Soy Agar II mit 5% Schafsblut ausgestrichen und für 2 Tage (d) bei 37°C inkubiert. 80 ml Nährbouillon mit 1% Glycerin wurden mit einigen Kolonien versetzt und bei 37°C unter aeroben Bedingungen kultiviert.

Um die Effektivität dieses subakuten Infektionsverlaufs zu erreichen, wurden die Bakterien in einer NaCl-Lösung, welche das eigene Alginat enthielt, gelöst. Dafür wurde die Bakterienlösung für ca. 16 h kultiviert, bis diese eine bläuliche Färbung aufwies. Die Suspension wurde mit Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und 6 ml wurden in 1 ml Aliquote 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der vereinigte Überstand wurde für 30 min bei 80°C inkubiert. Der Ausfall wurde einmal in eiskaltem Ethanol sterilisiert und dreimal in einer 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurde das Alginat in 1,5 ml der 0,9% NaCl-Lösung gelöst und ü. N. bei 4°C gelagert.

Zur Isolation der Bakterien wurde die Bakterienlösung für ca. 15 h kultiviert, ohne dass eine bläuliche Färbung auftrat. Die Suspension wurde mit Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und 6 ml wurden in 1 ml Aliquote 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden vereinigt und in 300 µl der zuvor hergestellten Alginatlösung gelöst.

Zur Quantifizierung wurden jeweils 50 µl der Bakteriensuspension in entsprechenden Verdünnungen auf Trypticase™ Soy Agar II mit 5% Schafsblut ausgestrichen und ü. N. bis 2 d bei 37°C kultiviert.

3.2.3 Kultivierung von *Streptococcus pneumoniae* D39

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) ist ein Gram-negatives Bakterium und wird häufig bei chronischen und akuten Lungenentzündungen gefunden. In dieser Arbeit wurde ein Glycerolbestand von *S. pneumoniae* D39 in 1 ml Aliquote mit 10% Glycerin bei -80°C aufbewahrt (Morona *et al.*, 2004). Ein Aliquot wurde in 15 ml THB-Medium transferiert und unter anaeroben Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Die Bakterienlösung wurde bei 1.885 xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit 15 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 4 ml PBS gelöst und so eine Bakterienkonzentration von 8x10⁶ bis 7,35x10⁷ CFU/ml eingestellt.

Zur Quantifizierung wurden 10 µl der Bakteriensuspension in entsprechenden Verdünnungen als Doppelbestimmung auf Trypticase™ Soy Agar II mit 5% Schafsblut aufgebracht und ü. N. bei 37°C kultiviert.

3.2.4 Proteinquantifizierung

Zur Quantifizierung von inflammatorischen Proteinen in der BALF, im Lungenhomogenisat, im Plasma oder im Zellkulturüberstand wurde das Prinzip des Enzym Linked Immunosorbent Assays (ELISA) verwendet. In dieser Arbeit wurden ELISA Kits von R&D Systems (USA, Minneapolis) nach Herstellerangaben gebraucht. Bei hohen Proteinkonzentrationen wurden die Proben mit den entsprechenden Pufferlösungen verdünnt. Die Absorptionen wurden bei 450 nm gemessen und mit der Magellan Software ausgewertet.

Die Bestimmung der Konzentration von 25(OH)D₃ in den Seren der Mäusen wurden vom Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes (Deutschland, Homburg) mit Hilfe des LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL Assay (DiaSorin, Stillwater, MN, USA) durchgeführt. Dafür wurden die Seren von zwei bis vier Mäusen vereinigt um ein Volumenminimum von 500 µl pro Messung zu erreichen. Das messbare Minimum an 25(OH)D₃ lag dabei bei 4 ng/ml.

3.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl beim Aussäen von Zellen oder zur Bestimmung dieser in der BALF wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Anzahl der Zellen pro Großquadrat wurde bestimmt und mit 10.000 multipliziert.

3.2.6 Differenzierung der Immunzellen

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der verschiedenen Immunzellen wurde die BALF, wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, gewonnen und aufgearbeitet. Die Zellen wurden im Anschluss in einem geeigneten Verhältnis mit PBS verdünnt und 200 µl wurden in eine Cytospin-Küvette, versehen mit Objektträger und Filterkarten, gefüllt. Diese wurden 5 min bei 300xg zentrifugiert und die Zellen auf dem Objektträger getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des „Diff-Quick“-Kits fixiert und gefärbt. Nachdem die Zellen ü. N. trockneten, wurden diese mit Hilfe von Deckgläsern

und FLUKA Eukitt® eingebettet. Die Anzahl der verschiedenen Leukozyten wurde mit Hilfe des Durchlichtmikroskops bestimmt und im Anschluss quantifiziert.

3.2.7 Bestimmung der Zellzytotoxizität

Um eine mögliche toxische Wirkung der *in vitro* verwendeten Substanzen zu untersuchen, wurde das „LDH-Cytotoxicity Assay Kit II“ von Abcam nach Herstellerangaben verwendet und die Menge an der Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand bestimmt.

3.3 *In vitro* Zellkultivierung

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Medien wurden mit 1% P/S und dem benötigtem Volumen an fötalem Rinderserum (FBS) für die reguläre Kultivierung versetzt. Dabei wurden alle Zellen in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Fläche gehalten. Für die Versuche wurden die Zellen in verschiedene Schalen ausgesät.

3.3.1 Kultivierung und Stimulation der murinen Epithelzelllinie LA-4

Zur *in vitro* Analysen der verschiedenen Formen des 25(OH)D₃ wurde in dieser Arbeit zunächst die murine Epithelzelllinie LA-4 verwendet. Diese wurden in Ham's F-12K Medium mit 15% FBS kultiviert. 1x10⁵ Zellen wurden in 12-Well Schalen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium erneuert, welche die verschiedenen VitD-Formen oder Lösungsmitteln enthielten und nach weiteren 24 h mit 30 µl der Bakteriensuspensionen bzw. PBS versetzt. Der Überstand wurde nach 4 h bzw. 6 h entnommen und bei -80°C aufbewahrt.

3.4 *In vivo* Mausversuche

Nach der Anlieferung durch das entsprechende Unternehmen wurden die Mäuse in der Tierhaltung der Klinisch-Experimentellen Chirurgie des Saarlandes unter pathogenfreien Bedingungen, bei 20°C bis 22°C Raumtemperatur, einer relativen Luftfeuchte von 55% und einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 12 h gehalten. Die Haltung der Tiere und die Durchführung der Experimente wurden vom Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt. Die Käfige wurden wöchentlich gereinigt und die Mäuse erhielten Futter und Wasser ad libitum. Entsprechend dem Versuchsaufbau bekamen die Tiere reguläres Haltungs- oder das entsprechende Diätfutter.

Da für die Infektionsversuche potentiell human pathogene Bakterien verwendet wurden, wurden die Tiere mindestens einen Tag vor Versuchsbeginn in den S2-Tierstall der medizinischen Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes gebracht. Die Mäuse wurden dort in einzeln belüfteten Käfigen (IVC – individually ventilated cages) unter Standard Haltungsbedingungen mit normalem Tag-/Nacht-Rhythmus und Wasser und Futter ad libitum gehalten

3.4.1 Intranasale Infektion

Für die intranasale Infektion wurden die Mäuse mit einer Ketamin-Xylazin-Mischung in NaCl betäubt. Diese wurden vor Versuchsbeginn gewogen und während der Betäubung mit Hilfe von Heizmatten gewärmt. Nachdem die Mäuse keinen Schnurhaarreflex mehr aufwiesen, wurden diese an einem Draht mit den Vorderzähnen aufgehängt. Die Bakterien bzw. das Lösungsmittel wurde mit Hilfe einer Mikropipette auf die Nasenlöcher gegeben. Dabei wurden in jedem Schritt 10 µl appliziert, abwechselt in beide Nasenlöcher. Insgesamt wurden 40 µl gegeben und zwischen jedem Applikationsschritt eine Ruhezeit von mindestens 5 min eingehalten.

Nach der Infektion wurden die Tiere erneut gewärmt und regelmäßig beobachtet. Bei mehrtägigen Versuchen wurden bei den Tieren täglich das Verhalten und das Gewicht erfasst. Sobald ein Tier eine starke Beeinträchtigung aufwies, wurde es mit einer Überdosis der Ketamin-Xylazin Mischung in NaCl euthanasiert.

3.4.2 Endotracheale Intubation

Die endotracheale Intubation wurde nach dem Protokoll von Bivas-Benita *et al.* durchgeführt (Bivas-Benita *et al.*, 2005). Dabei wurden die Mäuse mit einer Ketamin-Xylazin Mischung in NaCl betäubt. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn gewogen und während der Betäubung mit Hilfe von Heizmatten gewärmt. Sobald die Mäuse keinen Schnurhaarreflex mehr aufwiesen wurden diese an den Vorderzähnen und am Thorax befestigt. Die Zunge wurde fixiert und der Mund mit Hilfe eines Spatels offengehalten. Mit Hilfe einer externen Lichtquelle auf dem Thorax konnte der Übergang vom Mundraum zur Trachea sichtbar gemacht werden. Eine Introcan Safety® Kanüle wurde in die Trachea eingeführt und die Lösungen mit Hilfe einer Spritze in den trachealen Raum appliziert.

Nach der Intubation wurden die Tiere erneut gewärmt und regelmäßig beobachtet. Sobald ein Tier eine starke Beeinträchtigung aufwies, wurde es mit einer Überdosis der Ketamin-Xylazin-Mischung in NaCl euthanasiert.

3.4.3 Probenentnahme und -verarbeitung

Alle entnommenen Proben wurden bis zur Aufbereitung auf Eis gelagert, wenn nicht anders angegeben.

Die Tiere wurden mit einer Überdosis des Ketamin-Xylazin Mischung in NaCl euthanasiert. Sobald kein Zwischenzehenreflex mehr vorhanden war, wurde der Thorax geöffnet und mit einer Kanüle das Blut an der Herzspitze entnommen. Zur Herstellung von EDTA-Plasmaproben wurde das Vollblut mit einem Tropfen 0,6 M EDTA versetzt. Zur Gewinnung des Serums wurde das Vollblut bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 10.000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Plasma bzw. das Serum wurden von den restlichen Bestandteilen getrennt und bei -80°C aufbewahrt.

Danach wurde die Trachea freigelegt und mit einem Venenkatheter versehen. Mit Hilfe einer 1 ml Spritze wurde die Lunge dreimal mit 1 ml PBS gespült. Zur Bestimmung der Anzahl an lebendigen Bakterien in dieser bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) wurde bei den Infektionsversuchen eine geeignete Menge der BALF in geeigneten Verdünnungen auf Agarplatten kultiviert. Die BALF wurde bei 300xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Die BALF-

Zellen wurden in einem geeignetem Volumen PBS aufgenommen und vorsichtig vereinzelt. Die Zellen wurden bis zur Bestimmung bei 4°C bis RT aufbewahrt.

Die Lunge wurde entnommen und in zwei Hälften geteilt. Der linke Lungenflügel wurde in 1 ml PBS mit dem IKA® ULTRA-TURRAX® disperder T18 bei 20.000 rpm homogenisiert. Zur Bestimmung der Bakterienkolonisierung des Lungengewebes wurden bei den Infektionsversuchen geeignete Mengen in geeigneten Verdünnungen auf Agar-Platten kultiviert. Anschließend wurde das Lungenhomogenisat bei 10.000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

3.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Experimente wurde die Software GraphPad Prism 5 herangezogen und die Tests nach allgemeinen mathematischen Richtlinien ausgewählt. Die Werte wurde als Mittelwert \pm dem Standardfehler dargestellt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von unter 0,05 anerkannt.

Die Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit einem zweiseitigen T-test analysiert. Bei nicht normalverteilten Proben wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Um die Unterschiede zwischen mehreren Gruppen zu analysieren, wurden Varianzanalysen (analysis of variance ANOVA) herangezogen. Bei nicht normalverteilten Proben wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen eines systemischen Mangels an VitD auf die spezifische pulmonale Immunabwehr

Der systemische Mangel an VitD ist ein weltweites Problem. Besonders Patienten mit chronischen Erkrankungen des respiratorischen Immunsystems weisen häufig einen niedrigen Serumspiegel des VitD auf (Laaksi *et al.*, 2007, Ginde *et al.*, 2009, Camargo *et al.*, 2011). Um einen besseren Einblick in die Rolle des VitD im angeborenen Immunsystem der Lunge zu erlangen, sollte in dieser Arbeit ein Mausmodell entwickelt werden, das einen Mangel an diesem Vitamin aufweist. Dafür wurden C57BL/6N WT-Tiere im Alter von acht Wochen verwendet. Die Mäuse wurden ab diesem Zeitpunkt mit bestimmten Diäten gefüttert. Zum einen wurde ein Futter verwendet, das kein VitD enthielt und zum anderen eine vergleichbare Diät mit einem VitD-Gehalt von 500 Internationalen Einheiten (I.E.)/kg. Nachführend werden die verschieden gefütterten Gruppen als mangelernährte Gruppe (ohne VitD) bzw. als Kontrollgruppe (mit VitD) bezeichnet. Im Alter von insgesamt 18 bis 20 Wochen, also zehn bis zwölf Wochen auf den Diäten, wurden die Tiere für alle weiteren Analysen herangezogen.

4.1.1 Systemische Auswirkungen der Spezialdiäten und dessen Folgen auf ausgewählte Marker der pulmonalen Immunabwehr

4.1.1.1 Auswirkungen der Spezialdiäten auf das Serumlevel an 25(OH)D₃

Zunächst wurde der VitD-Serumspiegel in den Tieren bestimmt, um die Grundlage der Experimente, den VitD Mangel, zu untersuchen. Dazu wurden zwei unabhängige Untersuchungen mit jeweils zehn Tieren pro Gruppe durchgeführt. Die Seren von zwei bis vier Tieren derselben Gruppe wurden vereinigt um ein Minimum von 500 µl zu erreichen. Dabei wiesen die beiden Gruppen einen großen Unterschied in den Konzentrationen des 25(OH)D₃ auf. Die Mittelwerte der Kontrolltiere lagen bei der ersten Messung bei 35,3 ng/ml, bei der zweiten bei 26,3 ng/ml und insgesamt bei 30,8 ng/ml (+/- 2,1 ng/ml). Die Werte der Mangeltiere lagen meist unter 4 ng/ml.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Ernährung der Mäuse ohne VitD nach zehn bis zwölf Wochen zu einem sehr viel geringeren VitD Serumspiegel führte als die Ernährung mit einem vergleichbaren VitD-haltigem Futter.

4.1.1.2 Auswirkungen der Spezialdiäten auf das Körpergewicht

In einige Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Körpergewicht und einem niedrigen VitD-Serumspiegel aufgezeigt (Drincic *et al.*, 2012). Andersherum wurde in einem Rattenmodell beschrieben, dass die Gabe des aktiven Metaboliten des VitD zu einer Erniedrigung des Körpergewicht führte (Chow *et al.*, 2011).

Um diesen Umstand zu untersuchen, wurde bei sämtlichen Tieren zehn bis zwölf Wochen nach Beginn der Fütterung der Spezialdiäten das Körpergewicht bestimmt. Jedoch konnte trotz der sehr hohen Anzahl an Individuen ($n = 110 - 112$) kein statistischer signifikanter Unterschied ($p = 0,056$) das Körpergewicht betreffend festgestellt werden (Abb. 4).

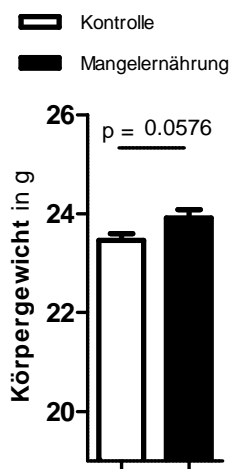


Abbildung 4: Der systemische Mangel an VitD führt zu keinem Unterschied des Körpergewichts. Die Mäuse wurden im Alter von acht Wochen auf die Spezialdiäten gesetzt. Das Körpergewicht wurde nach 10 – 12 Wochen bestimmt.

4.1.1.3 Auswirkungen der Spezialdiäten auf ausgewählte Parameter der Immunabwehr der Lunge

Nachdem gezeigt wurde, dass die Ernährung der Mäuse ohne VitD zu einem eindeutigen systemischen Mangel dieses Vitamins führt, wurden verschiedene Marker

des pulmonalen angeborenen Immunsystems untersucht. Dazu wurden zwei unabhängige Versuche mit jeweils zehn Tieren pro Gruppe durchgeführt.

Zunächst wurden die Immunzellen aus der BALF isoliert und analysiert. Dabei lag die Gesamtzellzahl in beiden Gruppen in der BALF bei ca. 23.000 Zellen/ml und setzten sich zum Großteil aus Makrophagen zusammen. Neutrophile waren in beiden Gruppen nur vereinzelt zu finden. (Abb. 5). Dabei ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

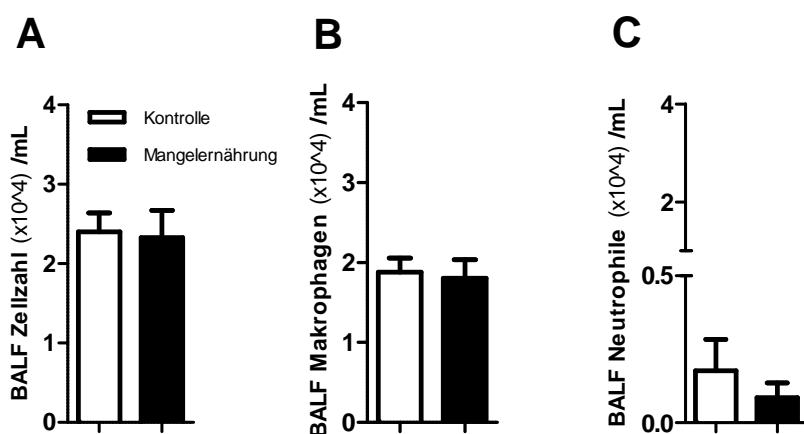


Abbildung 5: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF. Die Tiere wurden nach 10 – 12 Wochen auf den Diäten analysiert (n = 20). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C).

Des Weiterem wurden die BALF und das Lungenhomogenisat auf proinflammatorische Zytokine untersucht. Dazu wurden die Werte von KC, ein murines Homolog zum humanen IL-8 und IL-1 β gemessen. Die Werte von KC lagen in der BALF häufig unterhalb des messbaren Minimums. Lediglich neun von 20 Tieren der Kontrolle und 13 von 20 Tieren der Mangeltiere zeigten auswertbare Messergebnisse. Im Lungenhomogenisat lagen die KC-Werte aller Tiere im unteren messbaren Bereich (Abb. 6 A). IL-1 β konnte in der BALF bei keinem Tier und im Lungenhomogenisat in allen Tieren nachgewiesen werden (Abb. 6 B). Jedoch konnten keine statistischen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in den Konzentrationen von KC und IL-1 β gefunden werden (Abb. 6).

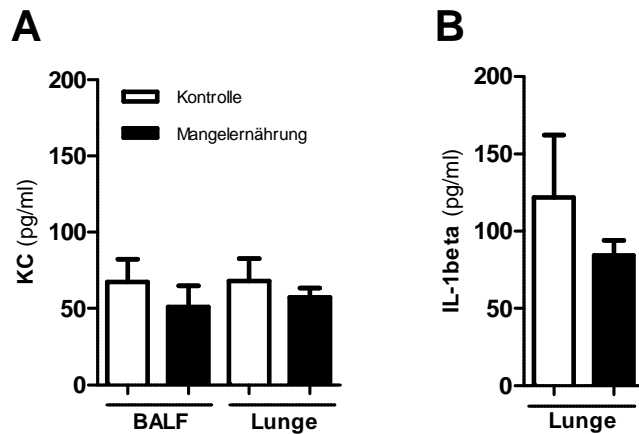


Abbildung 6: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge. Die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe wurden mittels ELISA nach 10 – 12 Wochen auf den Diäten analysiert. Beide Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte an KC (A) und an IL-1β (B).

4.1.2 Immunologische Auswirkungen des VitD-Mangels bei intranasalen Infektionen

Die ersten Ergebnisse zeigten, dass der Mangel an VitD per se zu keinen Unterschieden in den untersuchten Parametern führte. Viele Studien der letzten Jahre zeigten jedoch, dass ein gestörtes Immunsystem mit einem Mangel an VitD einhergeht und dies häufig auch mit Infektionen der Atemwege assoziiert ist (Wilkinson *et al.*, 2000, Ginde *et al.*, 2009, Camargo *et al.*, 2011). Daher wurden die Kontroll- und Mangeltiere mit human pathogenen Bakterien stimuliert um die Auswirkungen des VitD Mangels zu untersuchen.

4.1.2.1 Intranasale Lösungsmittelgabe als Kontrollexperiment

Alle Bakterien, mit Ausnahme der *P. aeruginosa* NH57388A, wurden in PBS gelöst. Daher wurde den Mäusen als Kontrollexperiment PBS intranasal appliziert. Die Tiere wurden nach 6 h bzw. 24 h präpariert und analysiert.

Die Stimulation der Atemwege mit PBS führte nach 6 h bzw. 24 h zu einer leichten Erhöhung der Zellzahl. Der Mittelwert der Gesamtzellzahl der BALF erhöhte sich um knapp das zweifache verglichen mit jenem der unbehandelten Tiere (Abb.5 und 7 A - C). Damit stiegen auch die Mittelwerte der Makrophagen. Des Weiteren wurden häufiger Neutrophile in der BALF gefunden (Abb. 7 A - C).

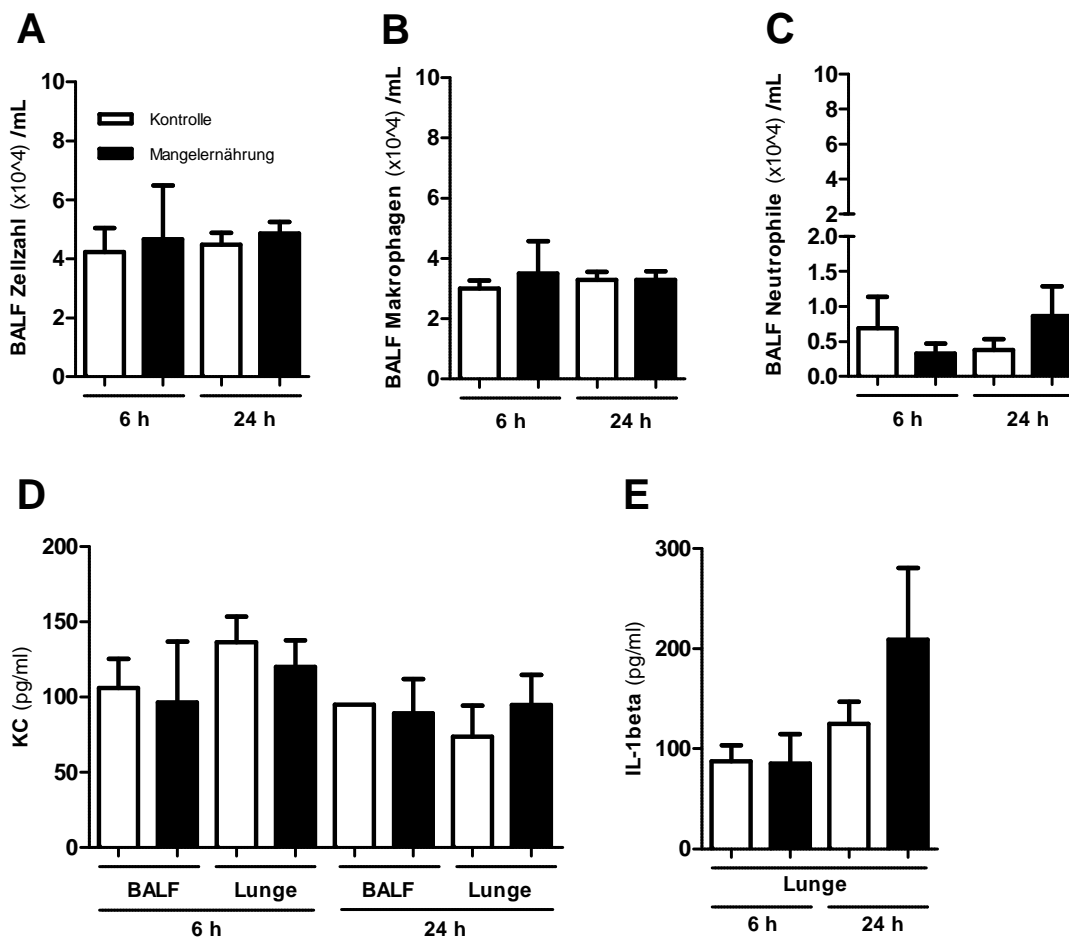


Abbildung 7: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner immunologischen Beeinträchtigung in der Lunge nach der PBS-Stimulation. 6 h bzw. 24 h nach der intranasalen PBS-Stimulation wurden die Zellzahlen in der BALF und die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe mittels ELISA analysiert ($n = 9 - 10$). Beide Gruppen zeigten vergleichbare Zellzahlen (**A, B, C**) und Zytokinwerte an KC (**D**) und an IL-1 β (**E**).

Ähnliches zeigte sich bei den Konzentrationen von KC und IL-1 β . Jedoch waren auch diese Werte sehr gering und die pro-inflammatorischen Zytokine nicht bei jedem Tier messbar. So konnten die KC-Werte in der BALF bei der Kontrollgruppe bei sieben von neun (6 h) bzw. einem von zehn Tieren (24 h) und bei den Mangeltieren bei sechs (6 h) bzw. drei (24 h) von jeweils zehn Tieren gemessen werden. Im Lungengewebe konnten nach 6 h bei allen und nach 24 h bei acht (Kontrolle) bzw. bei neun (Mangeltiere) die KC-Werte dargestellt werden (Abb. 7 D). Die Ausschüttung von IL-1 β in der BALF konnte auch nach der Stimulation mit PBS nicht gemessen werden. Im Lungengewebe hingegen konnte nach 6 h bei acht von neun (Kontrolle) bzw. bei sieben von zehn (Mangeltiere) die IL-1 β -Konzentrationen bestimmt werden und nach 24 h zeigten acht (Kontrolle) bzw. neun (Mangeltiere) Proben messbare IL-1 β -Werte (Abb. 7 E).

Die Stimulation mit PBS führte zu einer geringen Erhöhung der untersuchten Parameter im Vergleich zu den Tieren ohne intranasale Stimulation (s. Abschnitt 4.1.1.3), jedoch waren die gemessenen Werte sehr gering und es waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

4.1.2.2 Intranasale Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1

Weitergehend wurden die Entzündungsreaktionen im respiratorischen System nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 untersucht. Dafür wurden die beiden Gruppen intranasal mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 behandelt, welches einer Konzentration von $3,56 \times 10^7$ CFU/Maus entsprach und nach 6 h (n = 12) bzw. 24 h (n = 4 - 5) analysiert. Dabei war die BALF eines Kontrolltieres (6 h) nicht auswertbar.

Durch die bakterielle Stimulation kam es zu einer beträchtlichen Erhöhung der Gesamtzellzahl nach 6 h im Vergleich zu der PBS-Stimulation und stieg nach 24 h weiter an (Abb. 7 A und 8 A). Bei den Kontrolltieren war diese Erhöhung statistisch signifikant, aber auch bei der Mangelgruppe stieg der Mittelwert deutlich. Dies war fast ausschließlich durch einen Einstrom an Neutrophilen begründet, die meist 80% bis 90% der gesamten Zellpopulation der BALF ausmachten (Abb. 7 C und 8 C). Hingegen blieb die Anzahl der Makrophagen fast unbeeinflusst. Diese erhöht sich nur leicht nach 24 h (Abb. 7 B und 8 B). Aber auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen statistisch gezeigt werden.

Neben der Erhöhung der Zellzahl stieg auch die Konzentration der untersuchten Zytokine durch die bakterielle Stimulation im Vergleich zur PBS-Stimulation (Abb. 7 D, E und 9). Nach 6 h waren die Mittelwerte von KC um ca. das Hundertfache erhöht. Nach 24 h sank die Konzentration in beiden Gruppen sowohl in der BALF als auch im Lungenhomogenisat wieder (Abb. 9 A). Dieser Abfall ist in der BALF bei beiden Gruppen signifikant ($p < 0,05$). Im Lungenhomogenisat war dieser zwar deutlich erkennbar, aber nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$).

Die IL-1 β -Konzentrationen im Lungenhomogenisat waren um das Fünf- bis Zehnfache erhöht, verglichen mit der intranasalen PBS Stimulation (Abb. 7 E und 9 B). Nach 6 h waren in der BALF kaum auswertbare Messwerte verfügbar. So konnten in der Kontrollgruppe zwei und bei den Mangeltieren sieben von jeweils zwölf Tieren ausgewertet werden. Nach 24 h konnten alle Kontrolltiere und vier von fünf der Mangeltiere gemessen werden. Diese Mittelwerte waren jedoch mit höchstens 100 pg/ml sehr gering und unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht. Im

Lungenhomogenisat waren alle Werte im messbaren Bereich und um ca. das Zehnfache erhöht (Abb. 7 E und 9 B).

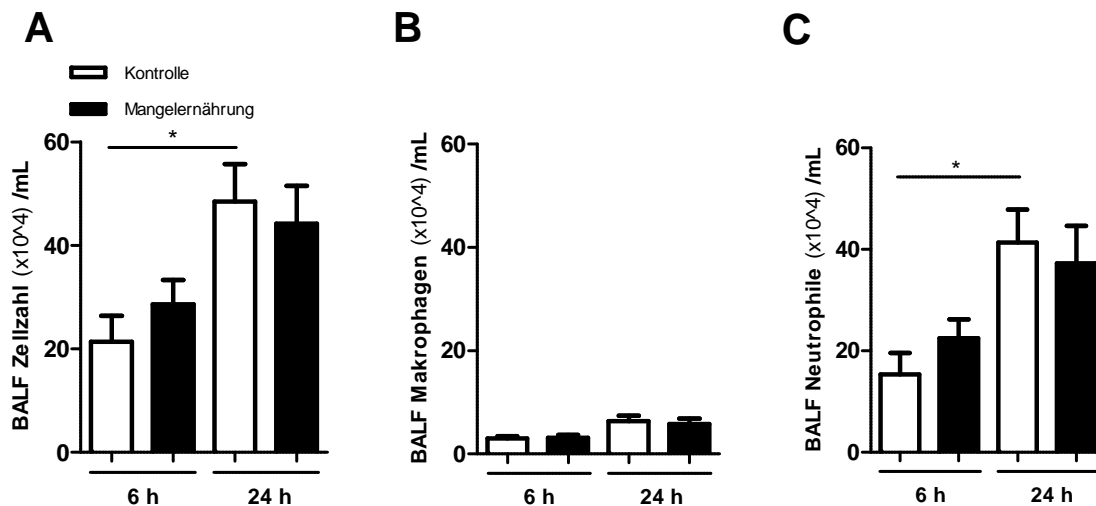


Abbildung 8: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1. 6 h bzw. 24 h nach der intranasalen Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 5 – 12). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C). Jedoch lag die Anzahl der Zellen nach 24 h höher als nach 6 h. (* p < 0,05)

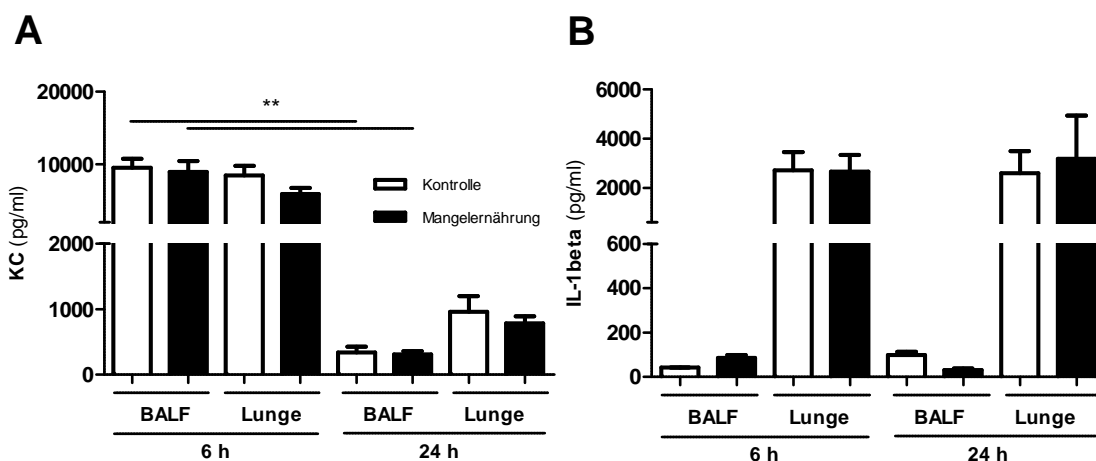


Abbildung 9: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1. Die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe wurden mittels ELISA 6 h bzw. 24 h nach der intranasalen Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* analysiert (n = 5 – 12). Beide Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte an KC (A) und an IL-1β (B). (** p < 0,01)

Beim Vergleich der Kontroll- mit der Mangelernährung konnten keine statistischen Unterschiede nachgewiesen werden. Der systemische VitD-Mangel führte zu keiner

Beeinträchtigung in den untersuchten Parametern nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa*.

4.1.2.3 Intranasale Stimulation mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1 für 6 h und 24 h

Um neben den Auswirkungen des Mangels an VitD auf die analysierten Entzündungswerte auch die Bekämpfung einer akuten Pneumonie zu beurteilen, wurden die Kontroll- bzw. die Mangeltiere (n = 12) auch mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1 für 6 h und 24 h mit jeweils $1,3 \times 10^6$ bis $4,95 \times 10^6$ CFU/Tier intranasal infiziert. Dabei wurde neben den Entzündungsparametern auch die Anzahl an lebensfähigen Bakterien in der Lunge in zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils sechs Tieren pro Gruppe bestimmt.

Die Zellzahlen stiegen deutlich durch die Infektion mit den lebendigen Bakterien an, verglichen mit der PBS-Stimulation (Abb. 7 und 10). Zwischen 6 h und 24 h konnte noch einmal ein leichter Anstieg der Zellzahl festgestellt werden. Dabei gab es aber zwischen den Gruppen keine statistischen Unterschiede. Die Anzahl der Makrophagen stieg jedoch nur leicht durch die bakterielle Stimulation (Abb. 10 B). Der Anstieg der gesamten Zellzahl wurde durch einen massiven Einstrom an Neutrophilen ausgelöst, welche um die 90% der gesamten Zellen in der BALF ausmachten (Abb. 10 C).

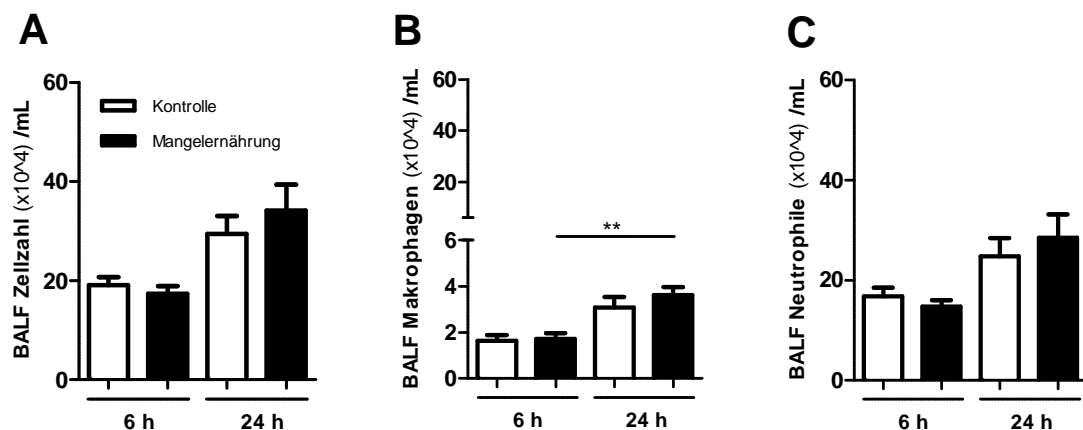


Abbildung 10: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. 6 h bzw. 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 12). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C). Jedoch lag die Anzahl der Zellen nach 24 h etwas höher als nach 6 h. (** p < 0,01)

Die messbaren Konzentrationen der untersuchten Zytokine KC und IL-1 β waren mit denen zu vergleichen, die nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 detektiert werden konnten (Abb. 9 und 11). Dabei war die KC-Konzentration nach 24 h signifikant reduziert im Vergleich zu den Werten nach 6 h. Lediglich bei einem Mangeltier konnte in der BALF kein KC nach 24 h nachgewiesen werden (Abb. 11 A).

Des Weiteren konnten fast alle IL-1 β -Werte bestimmt werden. Eine Ausnahme bildeten dabei nur die Werte nach 24 h in der BALF (Abb. 11 B). Hier konnten lediglich in der Kontrollgruppe zwei und bei den Mangeltieren neun von zwölf Tieren ausgewertet werden und die messbaren Werte lagen nicht über 40 pg/ml. Nach 6 h waren die Konzentrationen an IL-1 β allerdings noch deutlich, aber nicht signifikant, erhöht. Auch konnte im Homogenisat der Lunge eine deutlich höhere Menge dieses Zytokins nachgewiesen werden als in der BALF, welche sich zwischen den beiden Zeitpunkten nicht wirklich unterschieden. Aber auch hier gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 11B).

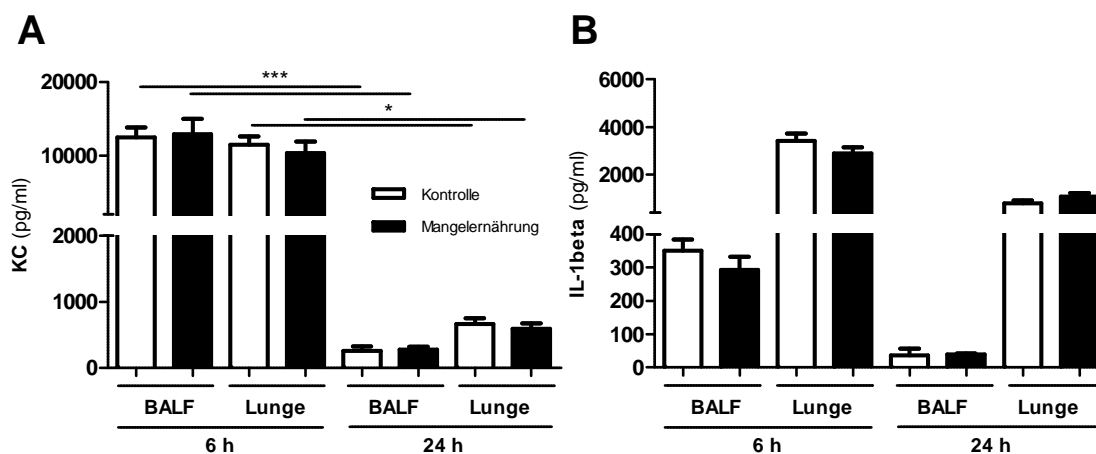


Abbildung 11: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. Die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe wurden mittels ELISA 6 h bzw. 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation analysiert (n = 12). Beide Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte an KC (A) und an IL-1 β (B). (* p < 0,05 bzw. *** p < 0,001)

Durch die Verwendung der lebendigen Bakterien konnte in diesem Versuchsaufbau auch das Abtöten der Bakterien innerhalb der Lunge beurteilt werden (Abb. 12). 6h nach intranasaler Infektion konnten sowohl in der BALF als auch im Lungengewebe in beiden Gruppen Werte zwischen 26.500 CFU/ml und 80.000 CFU/ml nachgewiesen werden. Nach bereits 24 h konnten kaum noch Bakterien in den beiden Kompartimenten gefunden werden und dieser Abfall der

Anzahl der lebensfähigen Bakterien war zwischen 6 h und 24 h in allen Gruppen signifikant.

Somit konnte auch durch die Verwendung lebendiger *P. aeruginosa* PAO1 keine Beeinträchtigung in den Mangeltiere nachgewiesen werden.

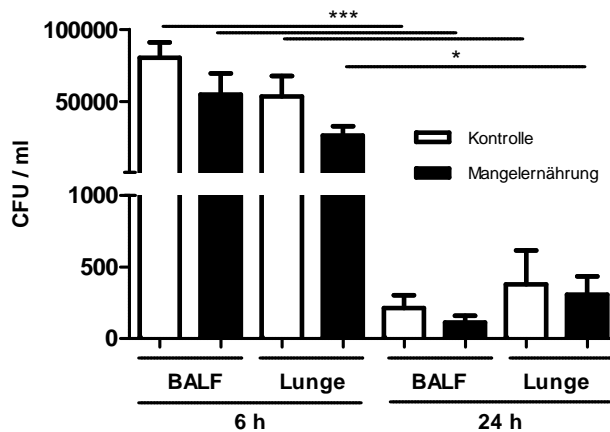


Abbildung 12: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. Die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat wurde 6 h bzw. 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation analysiert (n = 12). Beide Gruppen zeigten ähnliche Anzahlen an lebensfähigen Bakterien. Die Anzahl der nachweisbaren Bakterien nahm in beiden Kompartimenten signifikant mit der Zeit ab. (* p < 0,05 bzw. *** p < 0,01)

4.1.2.4 Intranasale Stimulation mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1 für 3 d

Um neben der Untersuchung des akuten Verlaufes einer *P. aeruginosa* PAO1 ausgelösten Infektion auch einen späteren Zeitpunkt zu analysieren, wurden die beiden Gruppen weiterführend für drei Tage mit 8.24×10^6 CFU *P. aeruginosa* PAO1 sowie mit der Kontrolllösung PBS infiziert.

Die Tiere wurden täglich begutachtet und gewogen. Mit PBS wurden pro Gruppe acht Tiere behandelt und alle überlebten bis Tag 3. In der Kontrollgruppe wurden zwölf Tiere mit *P. aeruginosa* PAO1 infiziert und drei überlebten bis Tag 3. Auch in der Mangeltiergruppe wurden zwölf Tiere infiziert, ein Tier verstarb noch während der Infektion und sieben Tiere überlebten bis Tag 3.

Die Veränderung des Körpergewichts kann zur Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustands herangezogen werden. Die Gewichte der PBS-behandelten Mäuse blieben über den Infektionszeitraum konstant (Abb. 13). Dagegen zeigte sich in beiden Gruppen nach der Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1, dass diese Tiere bis

Tag 2 ca. 2 g ihres Körpergewichtes verloren. Am dritten Tag konnte hingegen wieder eine leichte Gewichtszunahme in beiden Gruppen festgestellt werden.

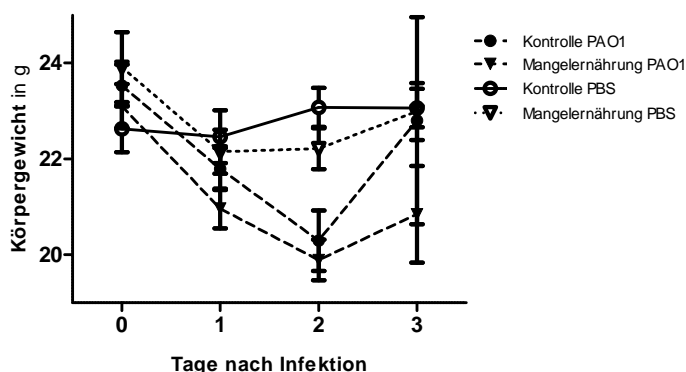


Abbildung 13: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner signifikanten Beeinträchtigung des Gewichtes nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. Der Gewichtsverlauf wurde über die 3 d hinweg bestimmt (n = 3 – 8). Die bakterielle, aber nicht die PBS-, Behandlung führte in beiden Gruppen zu einer Abnahme des Körpergewichtes bis Tag 2.

Durch die Infektion kam es zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl in der BALF verglichen mit der PBS-Behandlung nach drei Tagen (Abb. 14 A). In den Kontrolltieren war dieser nicht signifikant, aber mit einem Anstieg von 23.700 auf 123.400 Zellen/ml sehr stark. In den Mangeltieren hingegen konnte eine signifikante Erhöhung der mittleren Zellzahl festgestellt werden. Dies spiegelt sich auch in der Anzahl der Makrophagen und Neutrophilen wieder (Abb. 14 B und C). Bei den Mangeltieren konnte auch hier eine signifikante Erhöhung festgestellt werden.

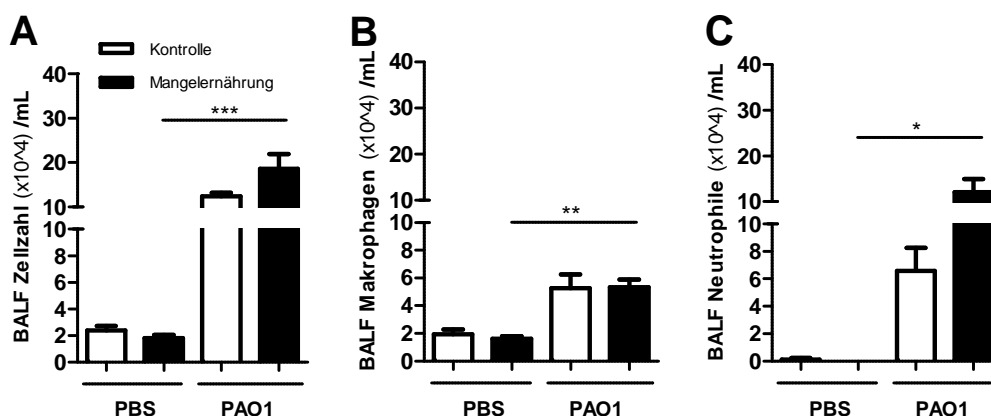


Abbildung 14: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. 3 d nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 3 – 8). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C). Jedoch lag in der Mangeltiergruppe die Anzahl der Zellen bei der bakteriellen Stimulation signifikant höher als bei der mit PBS. (* p < 0,05, ** p < 0,01 bzw. *** p < 0,001)

Wie auch nach 6 h und 24 h waren die KC-Werte nach dreitägiger intranasaler Stimulation mit PBS nur in sehr wenigen Tieren nachweisbar (Abb. 11 A und 15 A). Bei den Mangeltieren war KC in keinem Tier messbar. So konnte dieses Chemokin in der Kontrollgruppe bei zwei Tieren in der BALF und bei einem Tier im Lungenhomogenisat detektiert werden. Drei Tage nach der Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1 konnte KC auch in der BALF bei kaum einem Tier gemessen werden. Bei den Kontrolltieren war KC bei zwei von drei und bei den Mangeltieren bei drei von sieben Tieren nachweisbar. Jedoch konnte bei diesem Zeitpunkt im Lungenhomogenisat bei allen Tieren KC gemessen werden.

IL-1 β konnte drei Tage nach der Infektion in keinem der Tiere in der BALF nachgewiesen werden. Im Lungenhomogenisat stieg die Konzentration deutlich durch die Behandlung mit *P. aeruginosa* PAO1 an (Abb. 15 B). In den Mangeltieren war dieser Anstieg statistisch signifikant ($p < 0,01$).

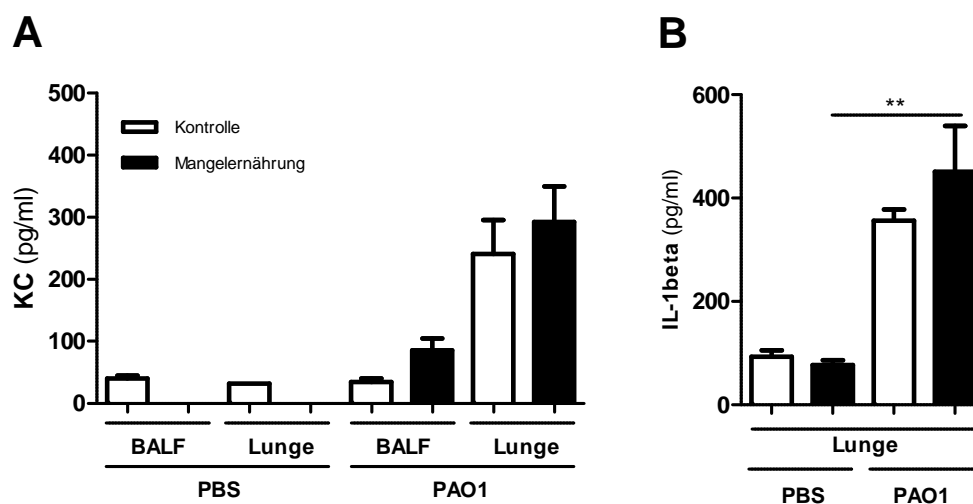


Abbildung 15: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. Die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe wurden mittels ELISA 3 d nach der intranasalen Bakterienstimulation analysiert ($n = 3 - 8$). Beide Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte an KC (A) und an IL-1 β (B). (** $p < 0,05$)

Auch in diesem Versuch wurde die Lunge auf die Anzahl lebensfähiger Bakterien untersucht. Drei Tage nach der Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1 waren fast alle Bakterien in der Lunge geklärt. Nur vereinzelt waren noch Bakterien zu finden, dass zu Mittelwerten in der BALF von 6,7 CFU/ml in den Kontrolltieren und 2,9 CFU/ml in den Mangeltieren führte (Abb. 16). Im Lungenhomogenisat waren nach drei Tagen in den Kontrolltieren im Mittel noch 6,7 CFU/ml und in den Mangeltieren 68,6 CFU/ml (+/- 30,82) nachweisbar. Dieser Unterschied war jedoch aufgrund des hohen Standardfehlers nicht signifikant.

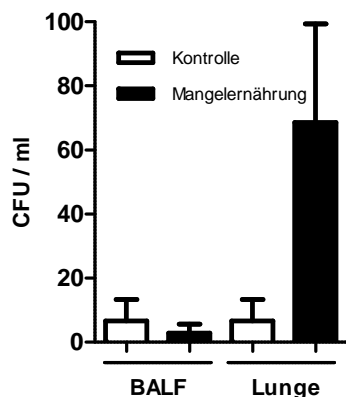


Abbildung 16: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. Die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat wurde 3 d nach der intranasalen Bakterienstimulation analysiert (n = 3 - 7). Beide Gruppen zeigten ähnliche Anzahlen an lebensfähigen Bakterien.

Somit konnte auch keine Beeinträchtigung des Immunsystems bei einer längeren Inkubationsdauer mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1 bei einem systemischen Mangel an VitD gefunden werden.

4.1.2.5 Intranasale Stimulation mit lebendigen *P. aeruginosa* NH57388A für 5 d

Wie sich durch den Infektionsversuch über 3 d zeigte, wurden die humanpathogenen *P. aeruginosa* PAO1 relativ schnell in der Lunge der Maus geklärt. Daher wurde ein zweites subakutes Infektionsmodell gewählt. Bei diesem wurde ein Patientenisolat von *P. aeruginosa* verwendet, bei dem die Bakterien fähig sind Alginate zu produzieren und sich dadurch länger in der murinen Lungen festsetzen können (Hoffmann *et al.*, 2005). Dazu wurden neun Kontrolltiere und zehn Mangeltiere mit jeweils $1,316 \times 10^7$ CFU *P. aeruginosa* NH57388A infiziert und nach fünf Tagen analysiert.

Der Gesundheitszustand der Tiere verschlechterte sich in den ersten zwei Tagen nach der Infektion, welches auch durch die anfängliche Abnahme des Körpergewichtes deutlich wurde. In den folgenden drei Tagen jedoch nahm das Körpergewicht fast wieder die Ausgangswerte an. (Abb. 17 B).

Im Gegensatz zu den Infektionen mit *P. aeruginosa* PAO1 nach drei Tagen waren die NH57388A nach fünf Tagen noch dazu fähig, in der Lunge der Mäuse zu überleben, aber im Lungenhomogenisat war die Überlebensfähigkeit dieses *P. aeruginosa* Stammes sehr viel höher als in der BALF (Abb. 17 A).

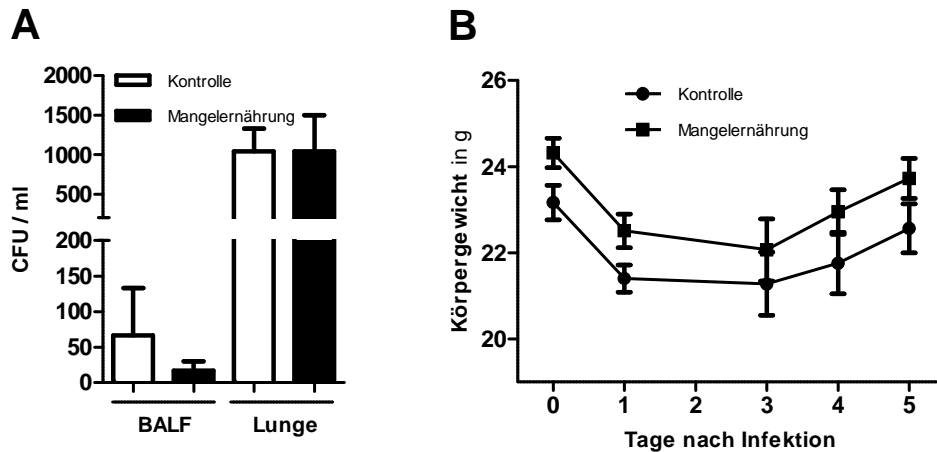


Abbildung 17: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes oder der bakteriellen Klärung in der Lunge nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* NH57388A. Der zeitliche Gewichtsverlauf und die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat wurde 5 d nach der intranasalen Bakterienstimulation analysiert (n = 9 - 10). Beide Gruppen zeigten einen fast identischen Gewichtsverlauf (A) und eine ähnliche Anzahl an lebensfähigen Bakterien (B).

In diesem subakuten Infektionsmodell konnten weniger Immunzellen in der BALF nachgewiesen werden als in den Infektionsversuchen nach 6 h und 24 h Stunden mit *P. aeruginosa* PAO1 (Abb. 10 und 18). Die Anzahl an Makrophagen unterschied sich dabei kaum von der Anzahl, die im Grundzustand des Mausmodells zu finden war (Abb. 5 B und 18 B). Auch waren kaum Neutrophile nachzuweisen (Abb. 18C).

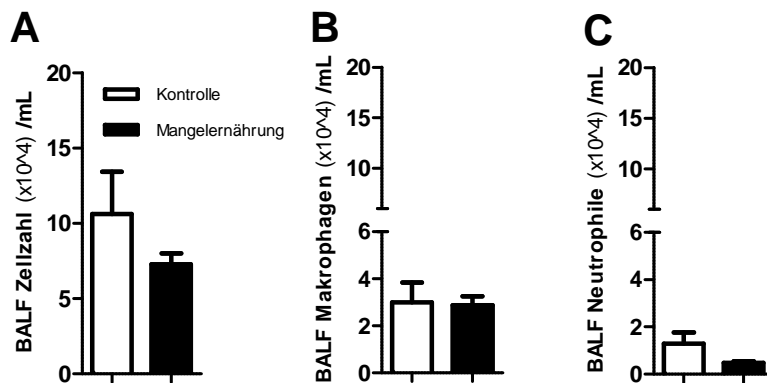


Abbildung 18: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* NH57388A. 5 d nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 9 - 10). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C).

Das Chemokin KC war in allen Proben nachweisbar. Dagegen konnte IL-1 β in der BALF in nur einem einzigen Tier, aber im Lungenhomogenisat in allen Tieren nachgewiesen werden. Die Werte dieser gemessenen pro-inflammatorischen Zytokine

waren relativ gering und zeigten keine statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 19).

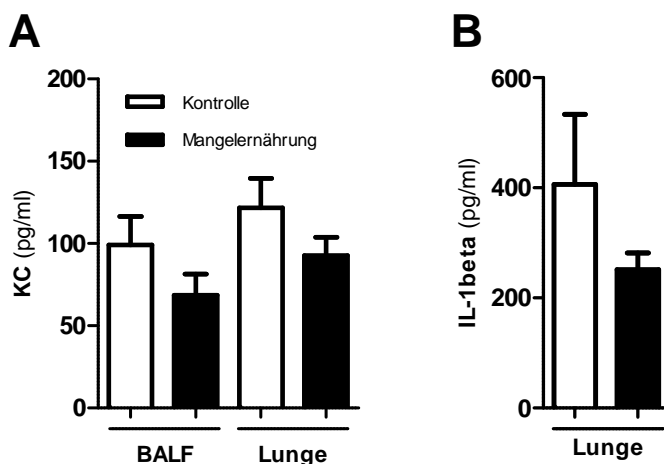


Abbildung 19: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* NH57388A. Die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe wurden mittels ELISA 5 d nach der intranasalen Bakterienstimulation analysiert (n = 9 - 10). Beide Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte an KC (A) und an IL-1 β (B).

Wie in den vorangegangenen Infektionsmodellen konnte auch in diesem subakuten Infektionsmodell kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

4.1.2.6 Intranasale Stimulation mit lebendigen *S. pneumoniae* D39 für 24 h

Keine der durchgeführten Stimulationen mit den Gram-negativen *P. aeruginosa* führte zu einer veränderten Abwehrreaktion durch den systemischen Mangel an VitD in den untersuchten Parametern. Daher wurden in zwei unabhängigen Versuchen mit zwei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen die Auswirkungen einer Gram-positiven Infektion untersucht. Dazu wurden fünf bis zehn Mäuse pro Gruppe verwendet und mit *S. pneumoniae* D39 infiziert. In einem ersten Versuch wurden die beiden Gruppen mit jeweils $8,8 \times 10^5$ CFU/Tier und in einem zweiten Versuch $2,94 \times 10^6$ CFU/Tier intranasal infiziert und nach 24 h analysiert.

Dabei zeigte sich, dass die Erhöhung der Bakterienkonzentration in den Kontrolltieren zu einem signifikanten Zellanzug führte (Abb. 20 A). Dies lag in einem signifikant erhöhten Einstrom an Neutrophilen begründet ($p < 0,01$; Abb. 20 C). In den Mangeltieren erhöhte sich die Zellzahl zwar von etwa 116.000 Zellen/ml auf 171.000 Zellen/ml, aber konnte nicht statistisch abgesichert werden ($p > 0,05$).

Weiteren blieb auch die Anzahl an Makrophagen zwischen den beiden Infektionen konstant (Abb. 20 B). Aufgrund technischer Mängel konnten nicht alle Zellen der BALF dieser Versuchsreihe ausgewertet werden. Bei der Verwendung von $8,8 \times 10^5$ CFU/Tier konnte die Anzahl an Makrophagen und Neutrophilen nur bei acht von neun in der Kontrollgruppe und bei vier von zehn der Mangeltiere ausgewertet werden.

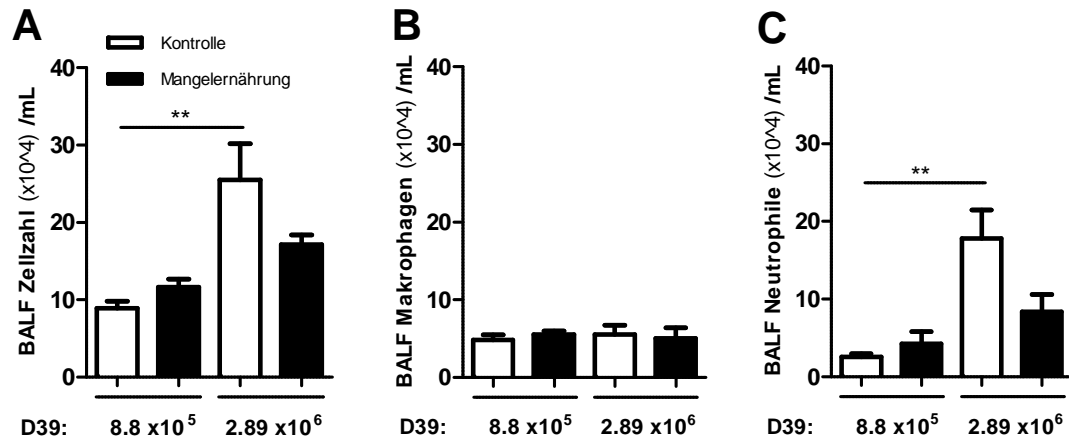


Abbildung 20: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. 24 d nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 5 - 10). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C). Jedoch führte die höhere Bakteriendosis zu einem deutlichen Neutrophileneinstrom. (** p < 0,01)

Die Infektion mit $8,8 \times 10^5$ CFU/Tier führte zu einem nicht so starken Anstieg der Konzentrationen der untersuchten Zytokine verglichen mit der PBS-Kontrolle (Abb. 7 und 21). Dabei konnten die KC-Werte in der BALF bei den Kontrolltieren bei zwei von neun und in der Mangelgruppe bei einem von zehn Tieren nicht ausgewertet werden. Durch die höhere Konzentration an *S. pneumoniae* D39 konnte auch die Ausschüttung von KC erhöht werden (Abb. 21 A).

In der BALF waren die gemessenen Werte an IL-1 β sehr gering und nur bei einzelnen Tieren messbar (Daten nicht gezeigt). Im Lungenhomogenisat hingegen konnte das Zytokin in allen Proben gemessen werden. Hier führte die höhere Bakteriendosis zu einer signifikant erhöhten Bildung von IL-1 β (Abb. 21 B).

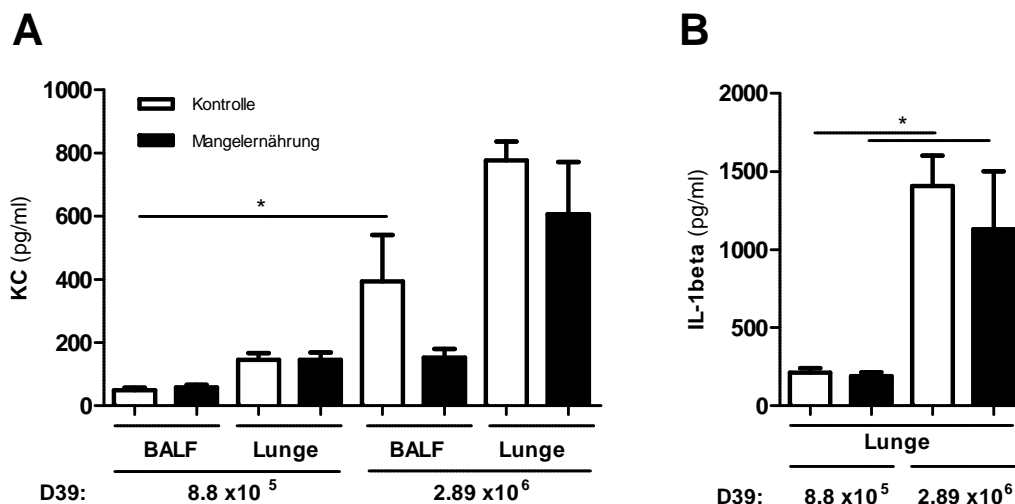


Abbildung 21: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe wurden mittels ELISA 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation analysiert (n = 5 - 10). Beide Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte an KC (**A**) und an IL-1 β (**B**). (* p < 0,05)

Wie schon die analysierten Entzündungsparameter zeigten, konnte auch die Untersuchung der Lebensfähigkeit der Bakterien keine Beeinträchtigung durch den Mangel an VitD aufdecken (Abb. 22). Im ersten Versuch zeigten sich im Mittel leichte Unterschiede zwischen den Gruppen. Dabei lagen die Mittelwerte in der BALF bei den Kontrolltieren bei 84 CFU/ml und bei den Mangeltieren bei 391 CFU/ml. Im Lungengewebe waren es 44,4 CFU/ml in der Kontrollgruppe bzw. 166 CFU/ml in den Mangeltieren. Jedoch waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant. Durch die Infektion mit der höheren Dosis *S. pneumoniae* D39 kam es zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF in beiden Gruppen.

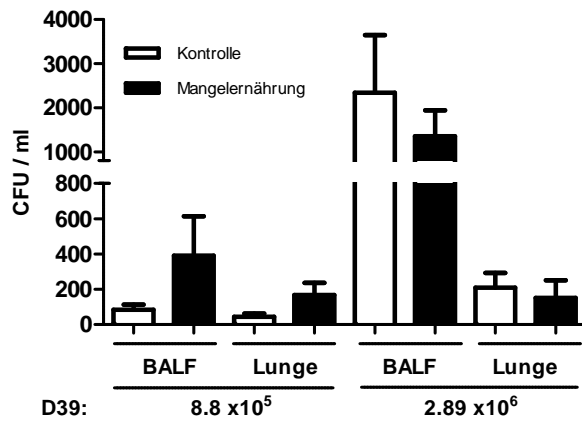


Abbildung 22: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat wurde 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation analysiert (n = 5 - 10). Beide Gruppen zeigten ähnliche Anzahlen an lebensfähigen Bakterien.

Auch bei der intranasalen Stimulation mit dem *S. pneumoniae* D39 Stamm konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in den gemessenen Parametern nachgewiesen werden.

4.2 Endotracheale Applikation verschiedener Formen des VitD

In humanen *in vitro* Studien zeigte sich, dass die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $25(\text{OH})\text{D}_3$ die Expression antimikrobieller Peptide in Epithelzellen induziert, und dabei die Abgabe an pro-inflammatorischen Zytokinen inhibiert (Hansdottir *et al.*, 2008, McNally *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Studien wurde die Hypothese formuliert, dass die direkte Gabe von VitD in die Lunge zu einer verbesserten Auflösung einer Pneumonie führen kann. Dazu wurden WT-Mäuse verwendet, die verschiedene Formen des VitD endotracheal appliziert bekamen. Im Anschluss wurde die spezifische Abwehr der Mäuse nach einer bakteriellen Stimulation untersucht und ausgewertet.

Durch das wässrige Milieu des Lungengewebes entstanden Probleme bei der pulmonalen Applikation des fettlöslichen VitD. Sowohl $25(\text{OH})\text{D}_3$ als auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurden bei ihrem Lösungsmaximum von 1 mg/ml in reinem Ethanol gelöst. Als Höchstkonzentration an Ethanol wurden 0,5% festgelegt, sodass eine maximale Dosis an 2,5 µg der beiden Formen des VitD endotracheal in 50 µl appliziert werden konnten. Bei den *in vitro* Analysen wurde die VitD-Konzentration im Medium eingestellt mit höchstens 0,5% Ethanol.

Als zweites Modell zur Umgehung der hydrophoben Eigenschaften des VitD wurden in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Claus-Michael Lehr vom HIPS (Castoldi *et al.*, unpubliziert) Liposomen hergestellt, in dessen Membran das $25(\text{OH})\text{D}_3$ eingebaut wurde.

4.2.1 *In vitro* und *in vivo* Applikation des Metaboliten $25(\text{OH})\text{D}_3$

Zunächst wurde der Einfluss der pulmonalen Applikation von $25(\text{OH})\text{D}_3$ auf verschiedene Abwehrmechanismen untersucht. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen zu einer murinen Epithellinie gegeben oder Mäuse endotracheal intubiert und die Wirkung des VitD auf verschiedene Pneumoniemodelle untersucht.

4.2.1.1 *In vitro* Auswirkungen der Supplementation von $25(\text{OH})\text{D}_3$ auf murine Epithelzellen

Neben vielen weiteren Zelltypen sind die Epithelzellen der Lunge dazu fähig, die Speicherform $25(\text{OH})\text{D}_3$ in ihre aktive Form $1,25(\text{OH})\text{D}_3$ zu konvertieren, was zu einer

erhöhten Synthese von antimikrobiellen Peptiden und einer geringeren Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen führen kann (Yim *et al.*, 2007, Hansdottir *et al.*, 2008, McNally *et al.*, 2011, Rigo *et al.*, 2012).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Zelllinie LA-4 verwendet, um den inflammatorischen Einfluss von 25(OH)D₃ zu untersuchen. Dazu wurden jeweils drei Ansätze pro Versuch in zwei unabhängigen Versuchen verwendet. Die Zellen wurden mit 10⁻⁷ M 25(OH)D₃ (40 ng/ml) in 0,5% Ethanol behandelt. Als Kontrollen dienten zum einen unbehandelte und zum anderen Zellen, die mit 0,5% Ethanol (Vehikel) behandelt wurden. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 6 h mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 stimuliert.

Zunächst wurde die Zytotoxizität untersucht. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Abgabe von KC im Kulturmedium bestimmt. Diese Abgabe wurde durch die Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 signifikant von unter 200 pg/ml auf rund 20.000 pg/ml erhöht ($p < 0,05$). Jedoch gab es keine Unterschiede in der KC-Konzentration durch die verschiedenen Vorinkubationen mit 25(OH)D₃ oder dem Vehikel (Abb. 23).

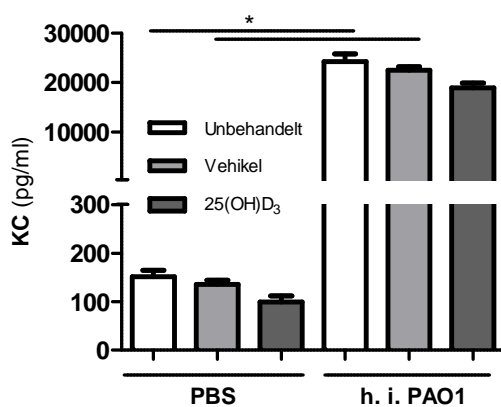


Abbildung 23: Die Applikation von 25(OH)D₃ führt zu keiner Veränderung der KC-Abgabe nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 in LA-4 Zellen. Insgesamt 30 h nach der VitD- und 6 h nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 wurde die KC-Konzentration mittels ELISA im medialen Überstand bestimmt. Die Abgabe von KC wurde durch die Gabe von 25(OH)D₃ nicht beeinflusst. Jedoch führte die Infektion zu einer signifikant erhöhten KC-Ausschüttung ($p < 0,05$).

4.2.1.2 *In vivo* Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 25(OH)D₃ im Mausmodell

Jeweils fünf elf Wochen alte C57BL/6N WT-Tiere wurden mit 2,5 µg 25(OH)D₃ in 0,5% Ethanol bzw. nur mit 0,5% Ethanol endotracheal intubiert. Als Kontrolle dienten drei

Tiere, die zwar auch betäubt, aber nicht intubiert wurden. Nach 24 h bzw. 72 h wurden die Tiere zusätzlich mit 40 µl PBS intranasal stimuliert und dienten so als Infektionskontrolle. Die Analyse erfolgte nach weiteren 24 h.

Die BALF der verschiedenen Gruppen und Zeitpunkten zeigten ähnliche Zellzahlen und Leukozyten-Zusammensetzungen (Abb. 24). Vereinzelt waren wenige Neutrophile zu finden. Jedoch wurden keine Veränderungen in den Zellzahlen durch die verschiedenen Behandlungen gefunden.

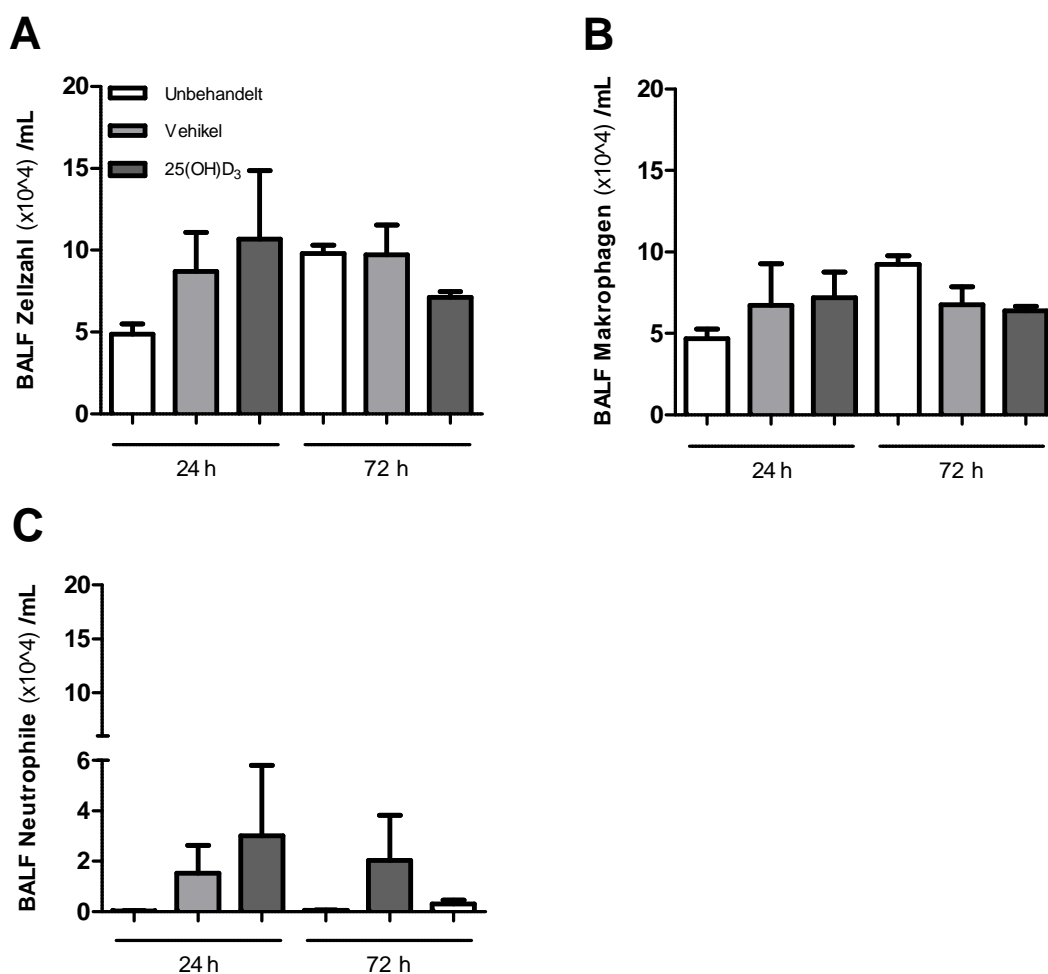


Abbildung 24: Die Applikation von 25(OH)D₃ führt zu keiner Veränderung Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach der PBS-Stimulation. 24 h bzw. 72 h nach der Vehikel- bzw. 25(OH)D₃ Applikation und jeweils 24 h nach der intranasalen PBS Stimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 5). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C).

Des Weiteren wurde die BALF bzw. das Lungenhomogenisat auf die Konzentration an KC und IL-1β untersucht. Vereinzelt konnte in einigen Tieren eines oder beide Zytokine nachgewiesen werden, welche aber meistens sehr gering waren (Daten nicht gezeigt).

Dieser Versuch zeigte, dass die endotracheale Applikation an 25(OH)D₃ zusammen mit einer intranasalen PBS-Stimulation nach 24 h bzw. 72 h zu keinen Veränderungen in den untersuchten respiratorischen Abwehrmechanismen führte.

4.2.1.3 *In vivo* Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 25(OH)D₃ bei akuter intranasalen *S. pneumoniae* D39 Infektion

Als nächstes sollten die Auswirkungen der endotrachealen Applikation von 25(OH)D₃ bei einer akuten Pneumokokkeninfektion untersucht werden. Dazu wurden neun Wochen alte C57BL/6N WT-Tiere mit 2,5 µg 25(OH)D₃ in 0,5% Ethanol bzw. 0,5% Ethanol (Vehikel) behandelt. Nach 24 h wurden diese mit 7,8x10⁵ CFU *S. pneumoniae* D39 pro Tier infiziert. Die Analyse erfolgte 6 h bzw. 24 h nach intranasaler Infektion. Dazu wurden jeweils fünf bis sechs Tiere herangezogen.

Die Applikation von 25(OH)D₃ führte zu keiner Änderung der Zellanzahl in der BALF, weder nach 6 h noch nach 24 h, verglichen mit der Vehikelkontrolle (Abb. 25). Jedoch konnte ein signifikanter Anstieg der gesamten Zellzahl ($p < 0,05$) und der Neutrophilen ($p < 0,001$) der VitD-Gruppe zwischen 6 h und 24 h festgestellt werden (Abb. 25 A und C).

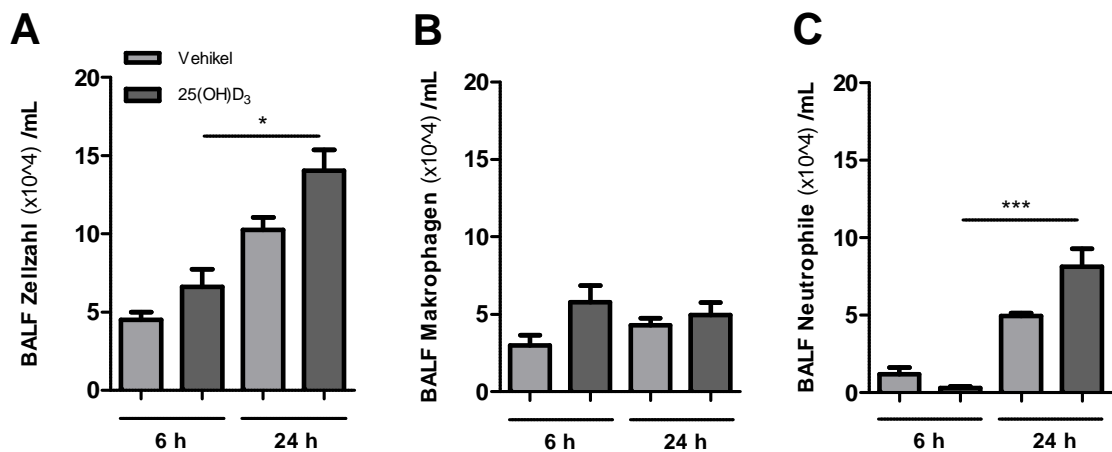


Abbildung 25: Die Applikation von 25(OH)D₃ führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 30 h bzw. 48 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 6 h bzw. 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 5 - 6). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C). Jedoch kam es zwischen 6 h und 24 h zu einem deutlichen Neutrophileneinstrom. (* $p < 0,05$ bzw. *** $p < 0,001$)

Bei den Zytokinmessungen von KC und IL-1 β konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Behandlungen nach der Intubation und Infektion festgestellt werden. Die Werte lagen im Allgemeinen zwischen 100 und 400 pg/ml (Abb. 26). Jedoch waren auch bei diesen Messungen die Standardfehler sehr groß.

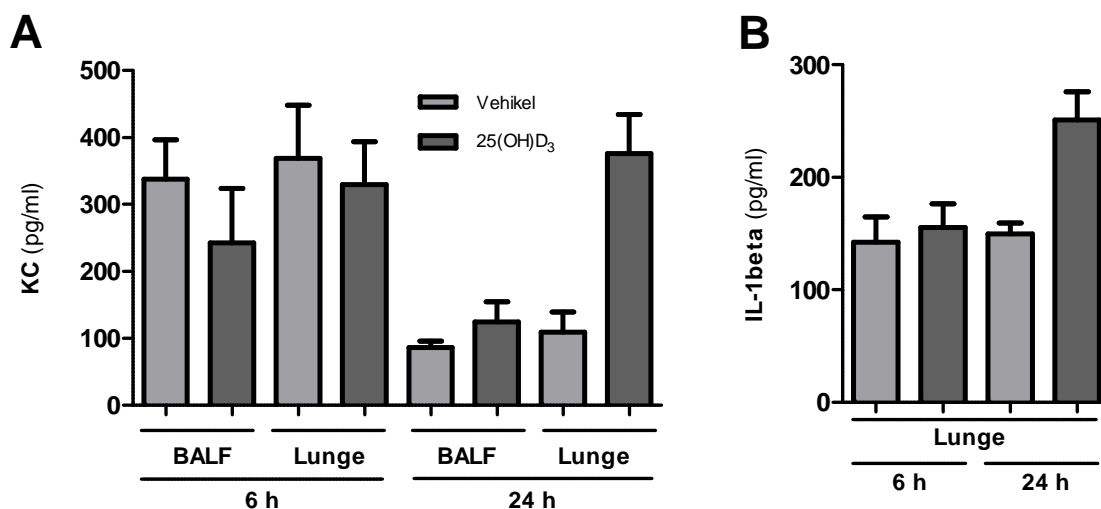


Abbildung 26: Die Applikation von 25(OH)D₃ führt zu keiner Veränderung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 30 h bzw. 48 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 6 h bzw. 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden Zytokine in der BALF und im Lungengewebe mittels ELISA bestimmt (n = 5 - 6). Beide Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationswerten von KC (**A**) und IL-1 β (**B**).

Auch bei der Anzahl der lebensfähigen Bakterien gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungen (Abb. 27). Jedoch war in beiden Gruppen das Überleben der Bakterien in der BALF deutlich höher als im Lungengewebe, welches in der Kontrollgruppe nach 6 h signifikant war ($p < 0,01$).

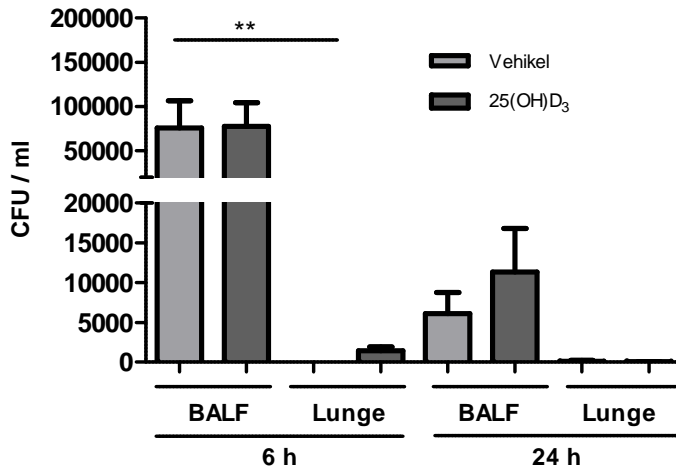


Abbildung 27: Die Applikation von 25(OH)D₃ führt zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 30 h bzw. 48 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 6 h bzw. 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurde die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat bestimmt (n = 5 - 6). Beide Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationswerten von KC (A) und IL-1β (B). (** p < 0,01)

Auch diese Analyse zeigte, dass die Applikation von 25(OH)D₃ keinen Einfluss auf den akuten Infektionsverlauf mit *S. pneumoniae* D39 nahm.

4.2.1.4 *In vivo* Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten von 25(OH)D₃ bei akuter intranasaler *S. pneumoniae* D39 Infektion

In den vorherigen Versuchen wurde die Applikationshöchstdosis von 25(OH)D₃ verwendet. Um neben den Auswirkungen einer Gabe dieser Höchstdosis auch geringe Konzentrationen zu untersuchen, wurden elf Wochen alte C57BL/6N WT-Tiere mit 25 ng, 250 ng bzw. 2.500 ng in 0,5% Ethanol bzw. nur mit 0,5% Ethanol behandelt und nach 24 h bzw. 72 h mit *S. pneumoniae* D39 für 24 h infiziert.

Als erstes wurden jeweils vier bis fünf Mäuse 24 h nach der Intubation mit $2,3 \times 10^6$ CFU *S. pneumoniae* D39 intranasal infiziert. In der BALF waren im Durchschnitt 150.000 bis 250.000 Zellen/ml zu finden, ohne Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 28 A). Diese bestanden zu 50% bis 80% aus Neutrophilen (Abb. 28 C). Aber auch in der Anzahl von Makrophagen und Neutrophilen gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 28 B und C). Jedoch konnte bei der Analyse der Zellzahlen ein Tier der Vehikelkontrolle nicht ausgewertet werden.

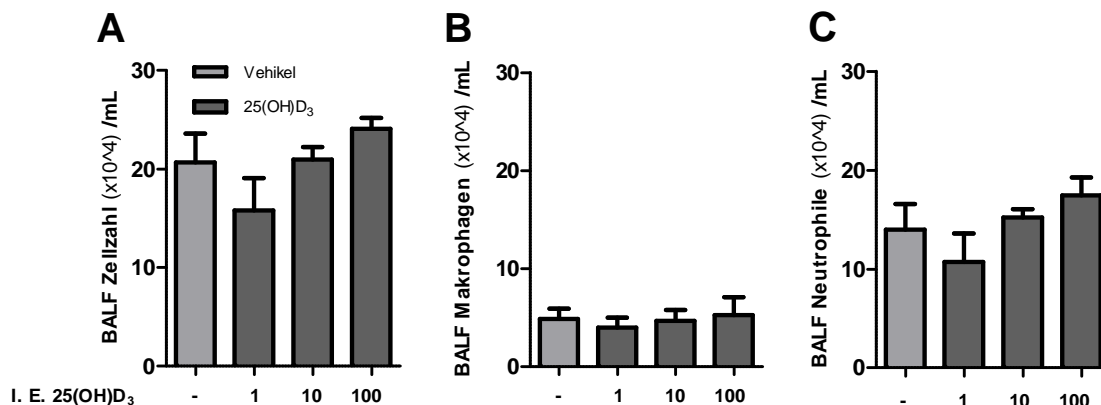


Abbildung 28: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von 25(OH)D₃ für 48 h führten zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 48 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 4 - 5). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C).

Des Weiteren wurden auch in diesem Versuch die pulmonalen Konzentrationen an KC und IL-1 β bestimmt. Dabei kam es zu keinen Veränderungen in den Zytokinwerten durch die Behandlung mit den unterschiedlichen Konzentrationen an VitD (Abb. 29).

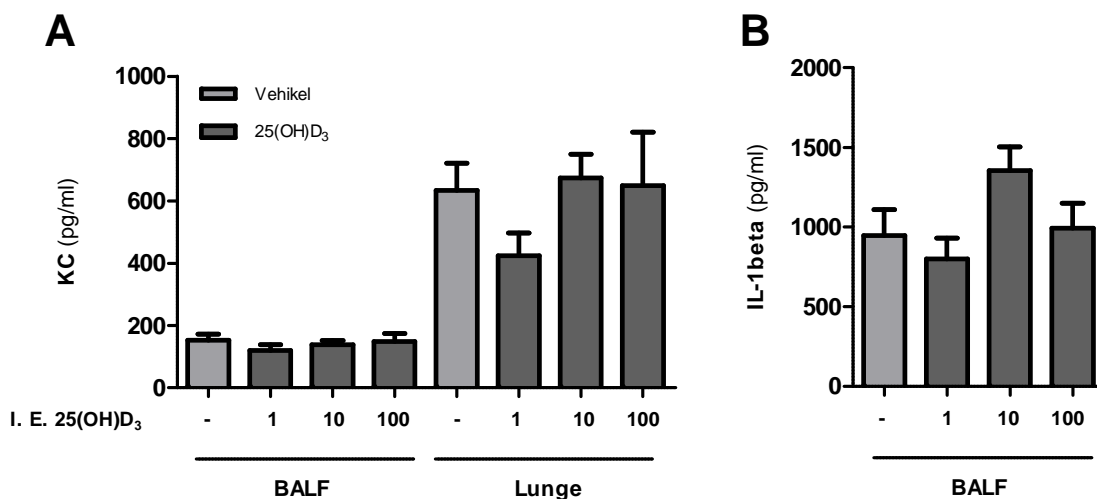


Abbildung 29: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von 25(OH)D₃ für 48 h führten zu keiner Veränderung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 48 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe mittels ELISA bestimmt (n = 4 - 5). Beide Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte von KC (A) und IL-1 β (B). (ANOVA)

24 h nach der Infektion waren in den meisten Fällen kaum noch lebensfähigen Bakterien in den Lungen zu finden, wobei im Durchschnitt zwischen 10 und 40 CFU/ml

nachgewiesen werden konnten. In der BALF bildete jedoch die Intubation mit 2,5 µg 25(OH)D₃ eine Ausnahme mit 700 CFU/ml und beim Lungenhomogenisat die Vehikelkontrolle mit 160 CFU/ml. Jedoch zeigten schon die hohen Standardfehler, dass diese Unterschiede nicht statistisch abgesichert werden konnten (Abb. 30).

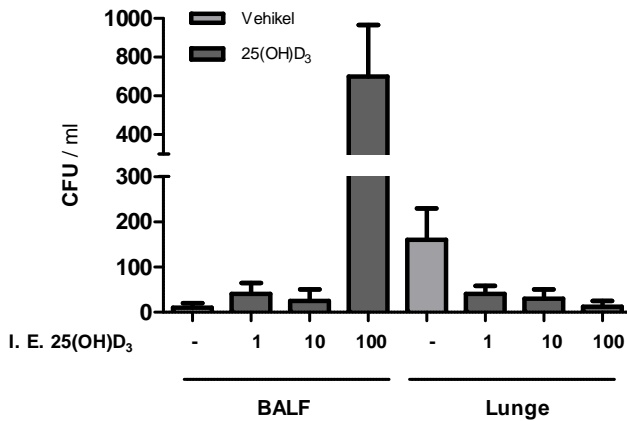


Abbildung 30: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von 25(OH)D₃ für 48 h führten zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 48 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurde die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat bestimmt (n = 4 - 5). Alle Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte an KC (A) und IL-1β (B).

Als nächstes wurden Mäuse 72 h Stunden nach der Intubation mit 3x10⁶ CFU *S. pneumoniae* D39 infiziert und nach weiteren 24 h analysiert. Dabei wurden drei bis fünf Tiere je Gruppe untersucht.

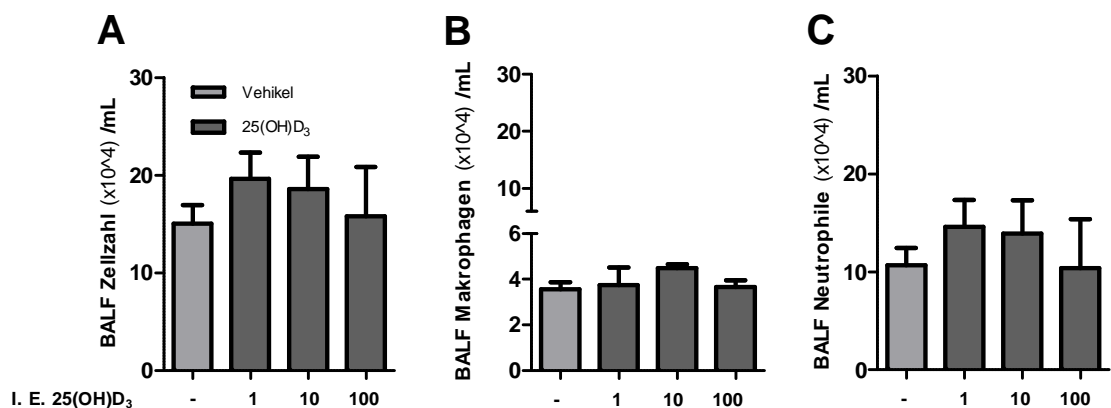


Abbildung 31: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von 25(OH)D₃ für 96 h führten zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 96 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 3 - 5). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C).

Auch hier konnten keine Veränderungen in der Anzahl oder der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF gefunden werden (Abb. 31). Die Zellzahl lag im Durchschnitt bei 150.000 bis 200.000 Zellen/ml und setzte sich zum Großteil aus Neutrophilen zusammen.

Die Untersuchungen der Konzentrationen an KC und IL-1 β zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb. 32).

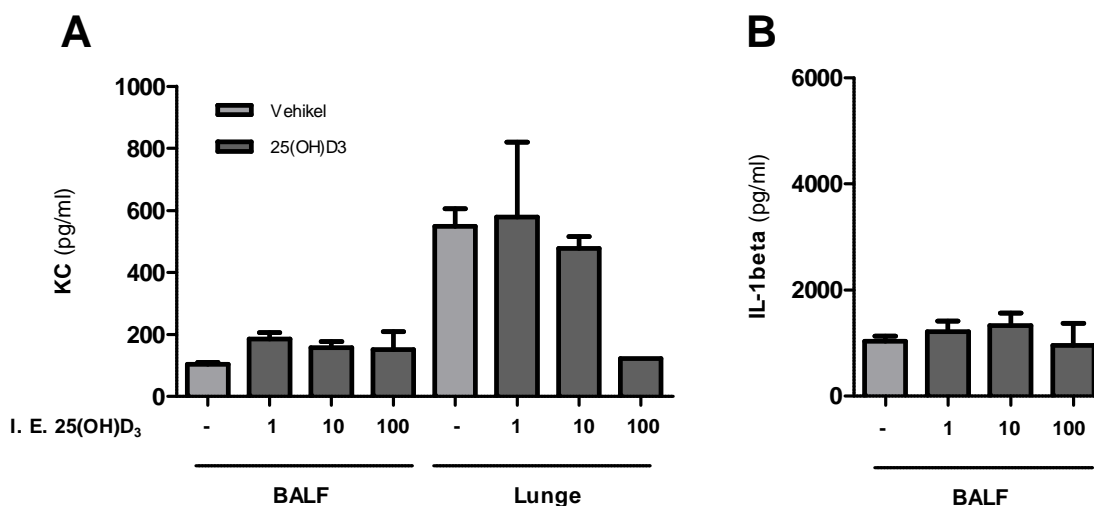


Abbildung 32: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von 25(OH)D₃ für 96 h führten zu keiner Veränderung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 96 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe mittels ELISA bestimmt (n = 4 -5). Beide Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte von KC (A) und IL-1 β (B). (ANOVA)

Auch bei der Inkubationszeit des 25(OH)D₃ für insgesamt 96 h konnte nach der Infektion in den meisten Fällen nur noch wenige Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 33). In der BALF der Vehikelkontrolle konnten keine Bakterien mehr gefunden werden. Bei den Gruppen mit 25 ng und 250 ng 25(OH)D₃ waren ca. 50 CFU/ml bzw. 20 CFU/ml und bei der Gabe von 2,5 μ g 292 CFU/ml vorhanden. Auch im Lungenhomogenisat war die Streuung teilweise sehr hoch, wobei die Mittelwerte durchschnittlich von 40 bis 3933 CFU/ml reichten. Aber auch hier waren die Standardfehler sehr hoch und keine statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

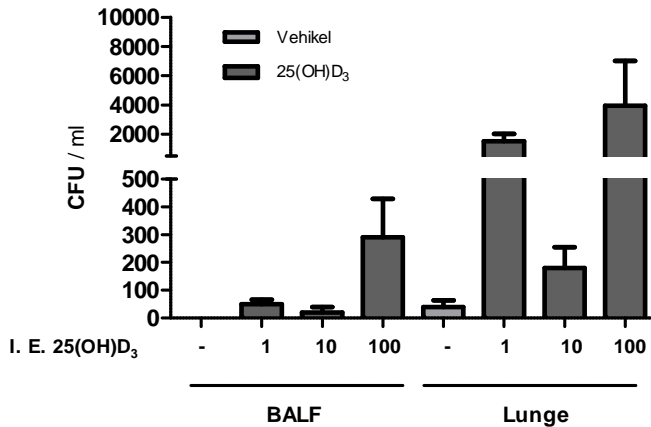


Abbildung 33: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von 25(OH)D₃ für 96 h führten zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 96 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurde die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat bestimmt (n = 4 - 5). Alle Gruppen zeigte ähnliche Konzentrationswerte von KC (A) und IL-1 β (B). (ANOVA)

Beim Vergleich der verschiedenen Inkubationszeiten und der verschiedenen Konzentrationen an 25(OH)D₃ konnten jeweils nach der Infektion ähnliche Ergebnisse erzielt und kein signifikanter Einfluss des VitD nachgewiesen werden.

4.2.2 *In vivo* Applikation des Metaboliten 1,25(OH)₂D₃

Neben der direkten pulmonalen Applikation des VitD in seiner Speicherform 25(OH)D₃ sollten auch die Auswirkungen einer endotrachealen Gabe der aktiven Form des VitD, 1,25(OH)₂D₃, untersucht werden.

Wie bei den vorangegangenen Untersuchungen mit 25(OH)D₃ wurde das 1,25(OH)₂D₃ in 0,5% Ethanol gelöst verwendet. Aufgrund des Lösungsmaximums wurden auch hier die Höchstdosis von 2,5 μ g verwendet.

4.2.2.1 *In vivo* Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 1,25(OH)₂D₃ im Mausmodell

Zunächst wurden neun Wochen alte C57BL/6N WT-Tiere mit 2,5 μ g 1,25(OH)₂D₃ in 0,5% Ethanol endotracheal intubiert. Als Kontrollen dienten jeweils fünf Tiere, die nicht intubiert, mit 50 μ l Luft oder 0,5% Ethanol behandelt wurden. Nach 12 h Stunden wurden den Tieren 40 μ l PBS intranasal verabreicht und nach weiteren 24 h analysiert.

Nicht alle Proben der BALF konnten ausgewertet werden. Für die Analyse der unbehandelten und der Vehikelkontrollen standen jeweils vier Proben zur Verfügung. Bei der Luftkontrolle und der 1,25(OH)₂D₃ Gruppe konnten noch jeweils drei Proben ausgewertet werden. Statistische Unterschiede wurden nur bei der Betrachtung der Gesamtzellzahl zwischen der Luftkontrolle und der VitD Applikation gefunden (Abb. 34 A). Der signifikante Anstieg der Zellzahl ($p < 0,05$) nach der Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ lag aber statistisch weder begründet in einer erhöhten Anzahl an Makrophagen noch in einem erhöhten Einstrom an Neutrophilen (Abb. 34 C).

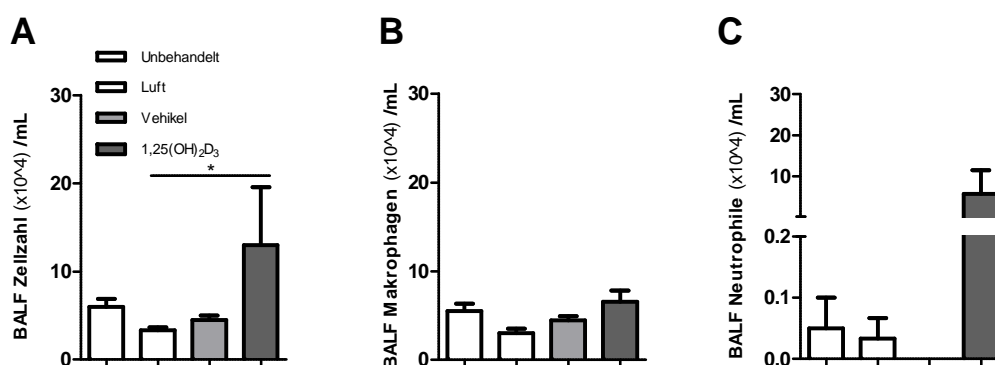


Abbildung 34: Die Applikation von 1,25(OH)₂D₃ führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach der PBS-Stimulation. Insgesamt 36 h nach den endotrachealen Behandlungen und jeweils 24 h nach der intranasalen PBS Stimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 3 - 4). Die Applikation von 1,25(OH)₂D₃ führte zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtzellzahl ($p < 0,05$) verglichen mit der Gruppe, die Luft appliziert bekam (A). Die Anzahl der Makrophagen (B) und der Neutrophilen (C) blieb statistisch aber unverändert. (* $p < 0,05$)

Die Konzentrationen an KC und IL-1 β lagen in den meisten Fällen sowohl in der BALF als auch im Lungenhomogenisat unter dem nachweisbaren Minimum. Nur in Einzelfällen waren in allen Gruppen einige Messwerte auffindbar (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.2 *In vivo* Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 1,25(OH)₂D₃ bei akuter intranasalen *S. pneumoniae* D39 Infektion

Zur weiteren Untersuchung wurden jeweils sieben neun Wochen alte C57BL/6N WT-Tiere mit 2,5 μ g 1,25(OH)₂D₃ in 0,5% Ethanol oder nur 0,5% Ethanol als Vehikelkontrolle intubiert. Als weitere Kontrolle dienten sechs Tiere, die nicht intubiert wurden. 12 h nach der endotrachealen Behandlung wurden alle Tiere mit 5×10^5 CFU *S. pneumoniae* D39 infiziert und nach weiteren 24 h analysiert.

Bei der VitD Gruppe und der Vehikelkontrolle konnten jeweils die Zellen einer BALF nicht ausgewertet werden. Beim Vergleich der verbliebenen Tiere konnten weder in der

Gesamtzahl noch in der Zusammensetzung der Zellen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 35). Die Gesamtzellzahl lag zwischen 90.000 und 120.000 Zellen/ml und setzte sich zu 60% bis 90% aus Neutrophilen zusammen.

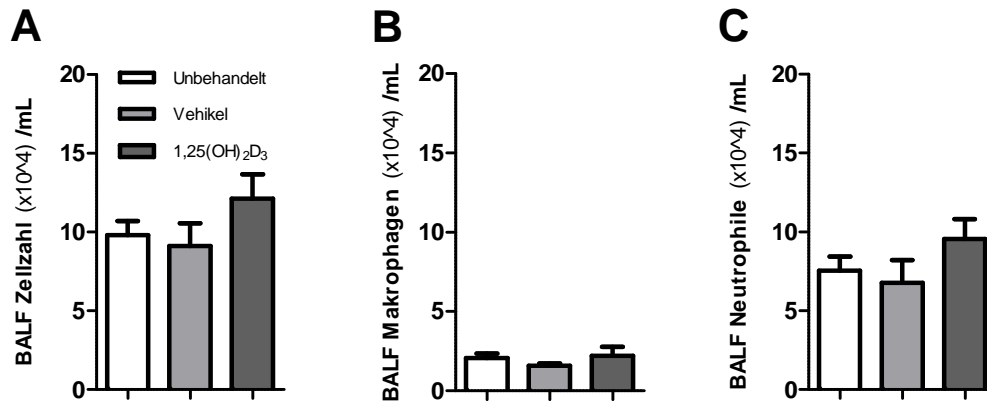


Abbildung 35: Die Applikation von 1,25(OH)₂D₃ führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 36 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 6). Alle Gruppen zeigten ähnliche Werte in der Gesamtzellzahl (A) und der Anzahl der Makrophagen (B) und Neutrophilen (C).

Tendenziell führte die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ zu einer geringen KC-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abb. 36 A). Statistisch abgesichert werden konnten diese Beobachtungen jedoch nicht (p > 0,05).

Bei IL-1 β hingegen konnte 24 h nach der Infektion mit *S. pneumoniae* D39 eine signifikante Abnahme zwischen der unbehandelten und der VitD Gruppe gefunden werden (p < 0,05; Abb. 36 B). Jedoch war der Unterschied zu der Vehikelkontrolle nicht signifikant (p > 0,05).

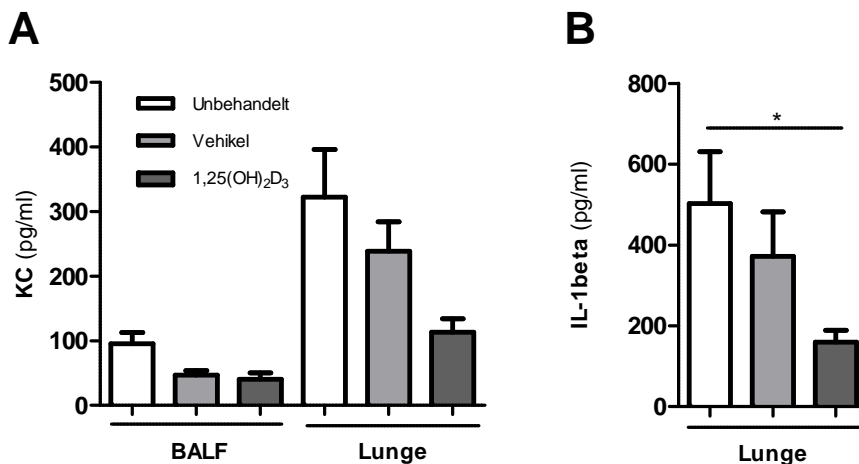


Abbildung 36: Die Applikation von 1,25(OH)₂D₃ führt zu keiner Veränderung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 36 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe mittels ELISA bestimmt (n = 6 - 7). Alle Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte von KC (A) und IL-1β. Jedoch zeigte die VitD behandelte Gruppe signifikant (p < 0,05) weniger IL-1β in der Lunge verglichen mit der unbehandelten (B). (* p < 0,05)

Bei der Lebensfähigkeit der Bakterien in der BALF und im Lungengewebe schien es tendenziell umgekehrt zu sein. Dabei führte die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ zu einem leichten Anstieg der nachweisbaren CFU in der BALF (Abb. 37). Aber auch diese Beobachtungen konnten nicht statistisch abgesichert werden und wies einen hohen Standardfehler auf (p > 0,05).

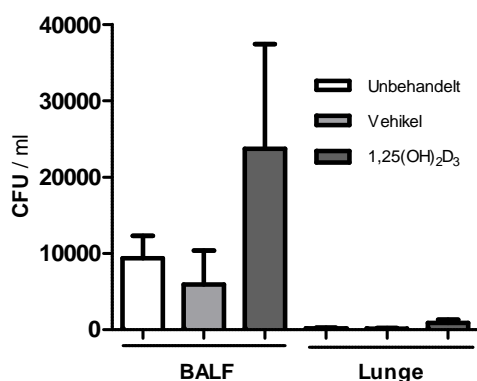


Abbildung 37: Die Applikation von 1,25(OH)₂D₃ führt zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. Insgesamt 36 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurde die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat bestimmt (n = 6 - 7). Keine signifikanten Unterschiede konnten in der Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der Lunge gefunden werden.

Auch in diesem experimentellen Aufbau konnte kein Einfluss des VitD auf die spezifische Abwehr nachgewiesen werden.

4.2.2.3 *In vivo* Auswirkungen der endotrachealen Supplementation von 1,25(OH)₂D₃ bei akuter intranasalen *P. aeruginosa* PAO1 Infektion

In den vorangegangenen Versuchen wurde der Einfluss des VitD auf eine Gram-positiv ausgelöste Pneumonie untersucht. Um daneben auch die Wirkung des 1,25(OH)₂D₃ auf die Infektion mit den Gram-negativen *P. aeruginosa* PAO1 zu analysieren, wurden jeweils sieben neun Wochen alte C57BL/6N WT-Tiere mit 2,5 µg 1,25(OH)₂D₃ in 0,5% Ethanol oder nur 0,5% Ethanol als Vehikelkontrolle intubiert. Als weitere Kontrollen dienten jeweils drei Tiere, die nicht intubiert wurden oder 50 µl Luft appliziert bekamen. Nach 12 h wurden alle Tiere intranasal mit 2,02x10⁶ CFU infiziert und nach weiteren 24 h analysiert.

24 h nach der Infektion lagen alle Zellzahlen im Durchschnitt zwischen 680.000 und 1.090.000 Zellen/ml und bestanden zu 60% bis 85% aus Neutrophilen (Abb. 38 A und C). Hier konnten keine Unterschiede zwischen den Behandlungen gefunden werden.

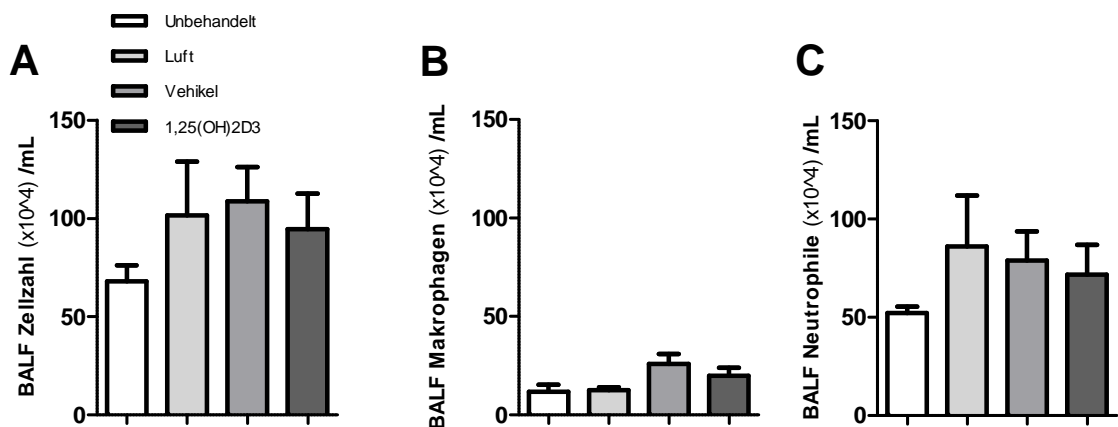


Abbildung 38: Die Applikation von 1,25(OH)₂D₃ führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. Insgesamt 36 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 3 - 7). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A) Makrophagen (B) und Neutrophilen (C).

Die KC-Konzentration in der BALF schwankte zwischen 47 pg/ml und 68 pg/ml mit Ausnahme der Vehikelkontrolle (Abb. 39 A). Bei dieser wurden im Durchschnitt 305 pg/ml gefunden, wobei jedoch ein großer Standardfehler auftrat. Im Lungengewebe hingegen waren die Werte sehr konstant in allen Gruppen. Auch bei der Konzentration an IL-1 β gab es einige Schwankungen beim Vergleich der Gruppen.

Aber auch hier waren keine statistischen Unterschiede zwischen den Behandlungen zu finden (Abb. 39 B).

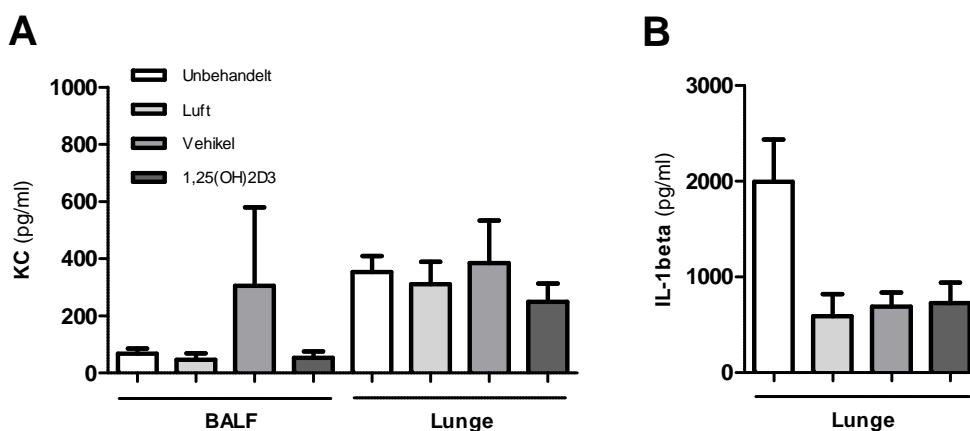


Abbildung 39: Die Applikation von 1,25(OH)₂D₃ führt zu keiner Veränderung der Zytokin-Abgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. Insgesamt 36 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zytokine in der BALF und im Lungengewebe mittels ELISA bestimmt (n = 3 - 7). Alle Gruppen zeigten statistisch keine Unterschiede in den Konzentrationswerten von KC (A) und IL-1β (B).

Auch bei der bakteriellen Bekämpfung führten die endotrachealen Behandlungen zu keinen Unterschieden in der Bakterienlast. Aber auch hier waren die Standardfehler groß, sodass keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten (Abb. 40).

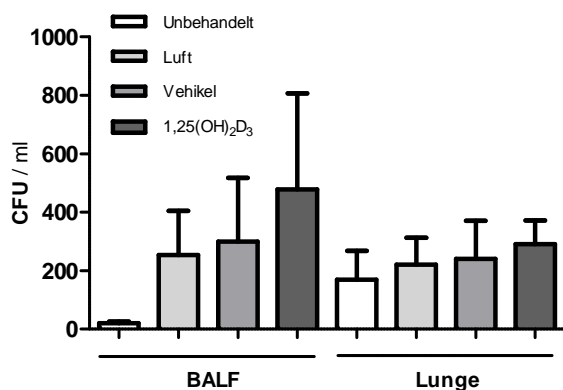


Abbildung 40: Die Applikation von 1,25(OH)₂D₃ führt zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. Insgesamt 36 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurde die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat bestimmt (n = 3 - 7). Keine signifikanten Unterschiede konnten in der Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der Lunge gefunden werden.

Die Ergebnisse dieses Abschnitts zeigten, dass die aktive Form des VitD keinen Einfluss auf den untersuchten Verlauf der Infektion mit dem Gram-negativen Bakterium *P. aeruginosa* PAO1 nimmt.

4.2.3 *In vitro* und *in vivo* Auswirkungen der Liposomen-Applikation

Aufgrund der Problematik der Fettlöslichkeit des VitD, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lehr, Helmholtz-Zentrum für pharmazeutische Forschung in Saarbrücken, Liposomen hergestellt, in denen das 25(OH)D₃ verpackt wurde (Castoldi *et al.*, unpublished). Liposomen bestehen aus einer Zellmembran-ähnlichen Lipiddoppelschicht und weisen äußerlich hydrophile und im Inneren hydrophobe Eigenschaften auf. Daher sind diese besonders geeignet um hydrophobe Substanzen in einem hydrophilen Milieu zu transportieren. Mit Hilfe der Lipidfilm-Hydrations-Methode wurde das 25(OH)D₃ zusammen mit dem Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) zu Vesikeln verpackt (Bangham *et al.*, 1965). Im Anschluss wurden die Liposomen charakterisiert. Die Stabilität des VitD in den Liposomen konnte für drei Tage aufrechtgehalten werden und auch Depositions-Analysen konnten die Stabilität der VitD-geladenen Liposomen nach der Zerstäubung gezeigt werden (Castoldi *et al.*, unpublished).

Zur weiteren Charakterisierung der Liposomen, sollte in den folgenden Abschnitten die Wirkung der Liposomen auf die spezifische Immunabwehr der Lunge im murinen System untersucht werden.

4.2.3.1 *In vitro* Auswirkungen der Liposomen-Supplementation auf murine Epithelzellen

Wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben wurde die Zelllinie LA-4 verwendet, um den inflammatorischen Einfluss des VitD auf murine Epithelzellen zu untersuchen. Dazu wurden jeweils drei Ansätze pro Experiment in zwei unabhängigen Versuchen verwendet. Die Zellen wurden mit 2,5 µg 25(OH)D₃ verpackt in 376,7 ng DPPC behandelt. Als Kontrollen dienten zum einen unbehandelte und zum anderen Zellen, die mit 376,7 ng DPPC allein (Vehikel) behandelt wurden. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 6 h mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 stimuliert.

Zunächst wurde die Zytotoxizität untersucht. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungen (Daten nicht gezeigt). Weiter wurde die Abgabe an KC im Kulturmedium bestimmt (Abb. 41). Diese Abgabe wurde durch die Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 signifikant von unter 200 pg/ml auf rund 20.000 pg/ml erhöht ($p < 0,05$). Jedoch gab es dabei keine Unterschiede in der KC-Konzentration durch die verschiedenen Vorinkubationen mit den Liposomen.

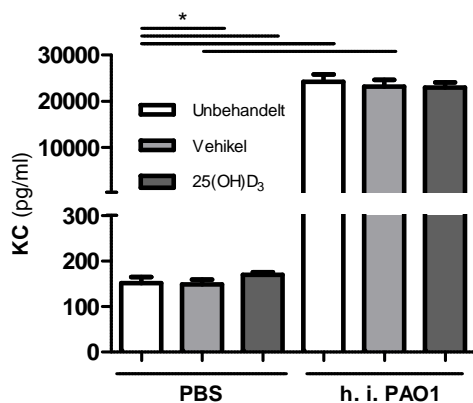


Abbildung 41: Die Applikation von 25(OH)D₃ verpackt in Liposomen führt zu keiner Veränderung der KC-Abgabe nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 bei LA-4 Zellen. Insgesamt 30 h nach der Liposomen- und 6 h nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 wurde die KC-Konzentration mittels ELISA im medialen Überstand bestimmt. Die Abgabe von KC wurde durch die Gabe von 25(OH)D₃ nicht beeinflusst. Jedoch führte die Infektion zu einer signifikant erhöhten KC-Ausschüttung (* $p < 0,05$).

Wie schon die Supplementation mit in Ethanol gelösten 25(OH)D₃ zeigte, nimmt auch das in Liposomen verpackte 25(OH)D₃ keinen Einfluss auf die LA-4 Zellen.

4.2.3.2 *In vivo* Auswirkungen der endotrachealen Liposomen-Supplementation im Mausmodell

Der erste *in vitro* Test zeigte zwar keinen Einfluss des VitD auf die Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins KC, aber auch wurde keine schädliche Wirkung durch die Liposomen nachgewiesen. Als nächstes sollte die Wirkung der Liposomen *in vivo* untersucht werden. Da aber noch nicht bekannt war, in welchen Konzentrationen die Liposomen pulmonal verabreicht werden können, wurden in einem ersten Experiment in wenigen Mäusen verschiedene Konzentrationen der Liposomen getestet. Dazu wurden insgesamt zehn C57BL/6N WT-Tiere verwendet und endotracheal mit den Liposomen behandelt. Insgesamt konnte höchstens ein Volumen von 50 µl direkt pulmonal einer Maus verabreicht werden. Hier wurden zwei verschiedene Konzentrationen an 25(OH)D₃ untersucht. Zum einen 0,5 µg und ($n = 2$) und zum anderen 5 µg ($n = 3$) in insgesamt 50 µl Volumen. Bei diesen Mengen an 25(OH)D₃ ergab sich eine Konzentration an DPPC in den 50 µl von 2,91 µg bzw. 29,1 µg. Als Vehikel-Kontrolle wurden Lösungen verwendet, die 2,91 µg DPPC ($n = 1$) bzw. 29,1 µg ($n = 2$) pro 50 µl Volumen enthielten. Als Behandlungskontrolle wurden zwei Mäuse nur mit 50 µl Luft behandelt ($n = 2$).

24 h nach der endotrachealen Behandlung zeigten alle Tiere ungefähr dieselben Zellzahlen (Abb. 42). Lediglich zwei der drei Tiere, die mit 5 µg 25(OH)D₃ behandelt wurden, wiesen erhöhte Anzahlen an Neutrophilen auf.

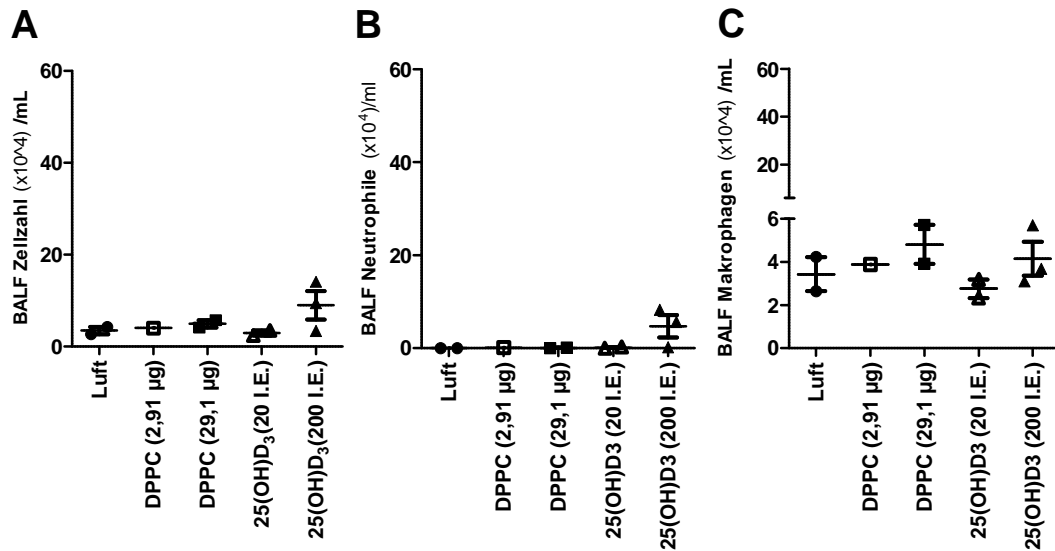


Abbildung 42: Die Applikation der Liposomen führte zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF. 24 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 2 - 3). Alle Gruppen zeigten ähnliche Werte in der Gesamtzellzahl (A) und der Anzahl der Makrophagen (B) und Neutrophilen (C).

Die Mäuse mit den erhöhten Anzahlen an Neutrophilen zeigten auch erhöhte KC-Konzentrationen mit rund 130 pg/ml in der BALF und etwa 220 pg/ml im Lungenhomogenisat. In allen anderen Tieren war kein bzw. nur sehr geringe Konzentrationen an KC nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde die BALF auf Schädigungen des Lungengewebes untersucht, um eine eventuelle zytotoxische Wirkung der Liposomen auszuschließen. Bei der Bestimmung der Menge an freiem LDH in der BALF ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungen (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der sehr geringen Anzahl an untersuchten Tieren konnte keine statistische Auswertung durchgeführt werden, aber es wurden keine großen Unterschiede gefunden.

4.2.3.3 *In vivo* Auswirkungen der endotrachealen Liposomen-Supplementation bei akuter intranasalen *P. aeruginosa* PAO1 Infektion

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die Liposomen und besonders das enthaltene 25(OH)D₃ einen Einfluss auf den akuten Verlauf einer Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1 hat. Dazu wurden elf Wochen alte C57BL/6N WT-Tiere entweder mit 50 µl Luft, mit 29,1 µg DPPC in 50 µl Wasser oder mit 29,1 µg DPPC und 5 µg 25(OH)D₃ in 50 µl Wasser endotracheal intubiert. Nach 24 h wurden die Tiere intranasal mit 5,2x10⁶ CFU/Tier infiziert. Nach weiteren 24 h, also insgesamt 48 h, wurden die Mäuse euthanasiert und analysiert. Insgesamt wurden 20 Mäuse intubiert, von denen jedoch sechs diese nicht überlebten. Somit blieben für die Analyse jeweils vier Tiere für die Luft- und Vehikel-Kontrolle und sechs Tiere wurden mit 25(OH)D₃ behandelt.

Tendenziell zeigte sich, dass die DPPC Applikation zu einem geringen Zelleinstrom nach der Infektion führte (Abb. 43). So wurden bei der Luftkontrolle 2.343.000 Zellen/ml gefunden und bei der Vehikel-Kontrolle 1.046.000 Zellen/ml. Die Applikation der 25(OH)D₃-haltigen Liposomen führte zu einer Gesamtzellzahl von 1.729.000 Zellen/ml (Abb. 43 A). Jedoch gab es keine statistisch abgesicherten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$). Die erhöhte Gesamtzellzahl lag begründet in einem Einstrom an Neutrophilen. Auch der pulmonale Einstrom der verschiedenen Immunzellen konnte keine Unterschiede zwischen den Behandlungen aufzeigen (Abb. 43 B und C).

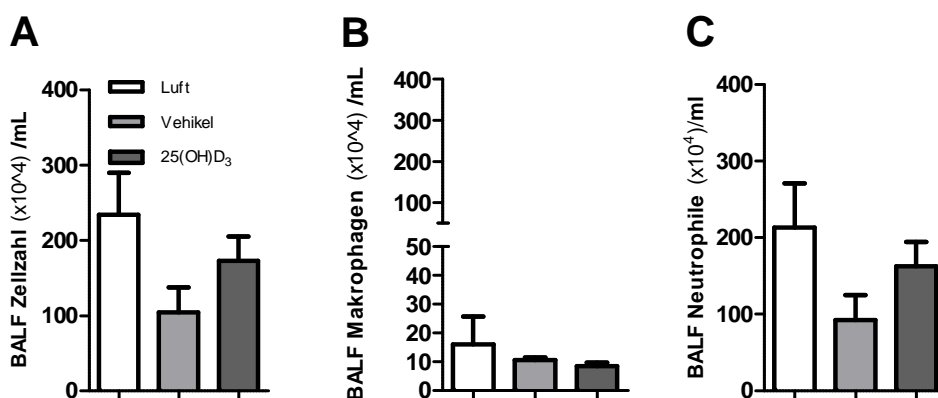


Abbildung 43: Die Applikation der Liposomen führte zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. 48 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die Zellzahlen in der BALF bestimmt (n = 4 - 6). Beide Gruppen zeigten ähnliche Zellzahlen in Bezug auf Gesamtzellzahl (A), Makrophagen (B) und Neutrophilen (C).

Des Weiteren wurde auch in diesem Versuchsaufbau die Abgabe des Chemokins KC untersucht. Hierbei zeigte sich, dass 24 h nach der Infektion die Konzentration im

Lungenhomogenisat höher war als in der BALF. Aber weder waren diese Unterschiede statistisch signifikant, noch unterschieden sich die Werte zwischen den Gruppen (Abb. 44).

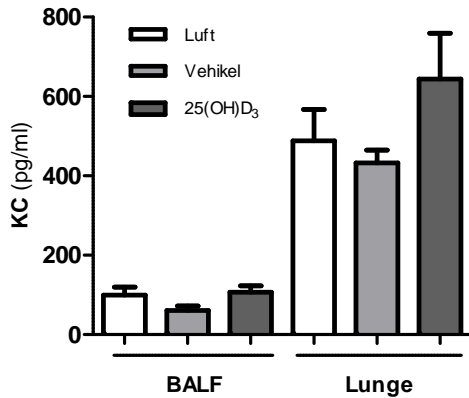


Abbildung 44: Die Applikation der Liposomen führt zu keiner Veränderung der KC-Abgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1. 48 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurden die KC-Konzentrationen in der BALF und im Lungengewebe mittels ELISA bestimmt (n = 4 - 6). Jedoch gab es keine Unterschiede zwischen den Behandlungen.

Bei der Untersuchung der bakteriellen Klärung zeigten sich auch hier keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 45). Jedoch zeigte sich in diesem akuten Infektionsmodell, dass 24 h nach der Bakterienapplikation, fast alle Mikroorganismen aus der Lunge geklärt wurden. Vereinzelt waren in einigen Tieren keine Bakterien mehr nachweisbar, welches auch an dem großen Standardfehler zu erkennen war.

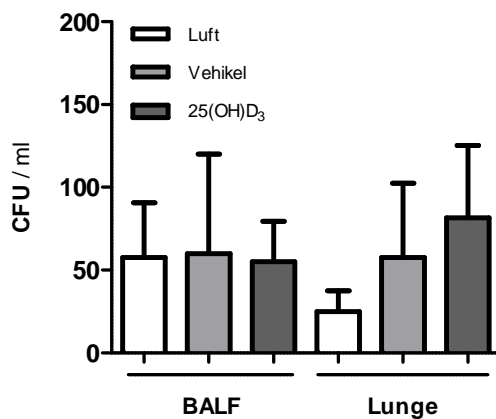


Abbildung 45: Die Applikation der Liposomen führt zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39. 48 h nach der VitD- bzw. Vehikel-Applikation und 24 h nach der intranasalen Bakterienstimulation wurde die Anzahl der lebensfähigen Bakterien in der BALF und im Lungenhomogenisat bestimmt (n = 4 - 6). Alle Gruppen zeigten ähnliche Konzentrationswerte von KC (A) und IL-1 β (B).

In allen analysierten Parameter zeigten sich keine statistischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Dies zeigt zum einen, dass sowohl die Applikation der Liposomen alleine als auch die mit 25(OH)D₃ geladenen Vesikel keine negativen Auswirkungen auf den Organismus hatten. Zum anderen konnte aber auch nachgewiesen werden, dass die einmalige Gabe von 2,5 µg des 25(OH)D₃ keinen Einfluss auf die untersuchten Pneumoniemodelle hatte.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Ernährung ohne VitD zu einem starken Abfall der systemischen VitD-Werte in den Mäusen führte. Jedoch konnten keine Auswirkungen auf die spezifische Abwehr der Lunge durch diesen Mangel gefunden werden. Auch die direkte endotracheale Gabe verschiedener Formen des VitD führte zu keinen signifikanten Auswirkungen auf die untersuchte pulmonalen Abwehrreaktionen im Mausmodell.

Schon seit Jahrhunderten ist bekannt, dass VitD eine wichtige Rolle im Immunsystem einnimmt. Dabei wurden verschiedene Krankheitsbilder mit Sonnenlicht und Lebertran behandelt. Heute weiß man, dass beides zu einer Erhöhung des körpereigenen VitD-Gehaltes führt. Verschiedene klinische Untersuchungen zeigten dabei im Laufe der letzten Jahre, dass Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen häufig sehr niedrige VitD Konzentrationen aufweisen (Wilkinson *et al.*, 2000, Ginde *et al.*, 2009, Camargo *et al.*, 2011). Dabei zeigten die Betroffenen häufig auch eine höhere bakterielle Kolonisierung der Lunge, sowie eine vermehrte Produktion und Ausschüttung von entzündungsfördernden Substanzen und eine geminderte antimikrobielle Aktivität (Chalmers *et al.*, 2013). Daher sollten im ersten Teil dieser Arbeit die immunologischen Auswirkungen eines systemischen Mangels an VitD in einem Mausmodell untersucht werden. Dazu wurden WT Mäuse eingesetzt, bei denen durch den Entzug des VitD in der Nahrung ein systemischer VitD-Mangel hervorgerufen werden sollte. Eine Kontrollgruppe erhielt eine Zufuhr an Cholecalciferol von 500 I. E./kg.

Im Umkehrschluss steht seit längerem die Hypothese im Raum, dass die Applikation von VitD zu einem verbesserten Gesundheitszustand bei Patienten führen soll. Dazu wurden bereits verschiedene klinische Studien durchgeführt, die die Auswirkungen einer zusätzlichen systemischen Gabe von VitD untersuchten. Die Ergebnisse waren bisher sehr zwiespältig. Durch die Supplementation konnte in einigen Studien zwar die Serums-Konzentration an VitD erhöht werden, aber es kam dabei zu keinen weiteren positiven klinischen Auswirkungen (Diamond *et al.*, 2005, Li-Ng *et al.*, 2009). Einige andere Studien zeigten hingegen, dass die Gabe von VitD zu einer Verbesserung der Gesundheit bei Patienten mit chronischen Infektionskrankheiten führte (Urashima *et al.*, 2010, Bergman *et al.*, 2012, Grossmann *et al.*, 2012a, Grossmann *et al.*, 2012b). In dieser Arbeit sollte deswegen die Auswirkungen der endotrachealen Gabe von VitD in WT-Mäusen untersucht werden. Dazu wurde sowohl die Gabe der Speicherform

25(OH)D₃ und des aktiven Metaboliten 1,25(OH)₂D₃ in verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten getestet.

5.1 Der Entzug des Cholecalciferol in der Nahrung führt zu einem Abfall des systemischen 25(OH)D₃ Gehalts

Um den systemischen Mangel an VitD zu induzieren, wurde dieses Vitamin den WT-Mäusen in der Nahrung entzogen. Nach zehn bis zwölf Wochen zeigten die Untersuchungen der Seren deutlich, dass die mangelernährten Tiere geringere Konzentrationen an 25(OH)D₃ aufwiesen als die Vergleichsgruppe. Dabei waren die Werte häufig unterhalb des detektierbaren Minimums der gewählten Messmethode und somit unter 4 ng/ml. In einem ähnlichen Modell von Klaff *et al.* führte die Mangelernährung zu einem vergleichbaren Ergebnis. Auch hier lag der VitD-Spiegel nach der Restriktion des VitD in der Nahrung unterhalb des messbaren Bereiches (Klaff *et al.*, 2012). In einer weiteren Studie führte die Mangelernährung der Mäuse ebenfalls zu einem deutlichen Abfall der VitD-Konzentration auf ca. 5 ng/ml. (Li *et al.*, 2014). Beide Studien zeigten jedoch unterschiedliche Werte in den Kontrollgruppen. Bei Li *et al.* führte die Kontrolldiät mit 1000 I. E./kg zu einer deutlichen Erhöhung des VitD-Spiegels über acht Wochen. Dabei lagen diese Werte nach sechs Wochen bereits bei über 75 ng/ml. Bei Klaff *et al.* wurde eine Kontrolldiät mit derselben Menge VitD pro kg verwendet, aber die Mäuse wiesen 25(OH)D₃ Werte im Serum unter 15 ng/ml auf. Die Kontrollgruppe dieser Arbeit zeigte VitD-Konzentrationen von ca. 30 ng/ml mit einem Futter, das 500 I.E. VitD/kg enthält. Die unterschiedlichen Serumwerte an 25(OH)D₃ könnten mehrere Ursachen haben. Zum einen wurden verschiedene Messmethoden herangezogen. Li *et al.* maßen den VitD-Gehalt mittels ELISA, Klaff *et al.* mit Hilfe der Chromatografie und das Zentrallabor des Uniklinikums des Saarlandes für diese Arbeit mittels Chemolumineszenz. Zum anderen waren die Versuchsaufbauten sehr unterschiedlich. Die verschiedenen Diäten wurden bei Klaff *et al.* bereits den Muttertieren verabreicht. Li *et al.* begannen die Diäten bei drei Wochen alten Mäusen für acht Wochen und in dieser Arbeit starteten die Diäten erst im Alter von acht Wochen für zehn bis zwölf Wochen. Trotz der vielen Unterschiede in den Versuchsaufbauten wird beim Vergleich der verschiedenen Studien deutlich, dass alle mangelernährten Tiere eine eindeutige Reduktion des VitD-Spiegels aufwiesen und so in allen Studien der Mangel an VitD untersucht wurde.

5.2 Der systemische Mangel 25(OH)D₃ beeinflusst nicht signifikant das Körpergewicht

Bei der Analyse des systemischen Mangels an VitD konnte gezeigt werden, dass dieser zu keiner signifikanten Änderung des Körpergewichtes in den Mäusen führte. Entgegengesetzt zeigte bereits ein Rattenmodell, dass die mehrfache Gabe von 1,25(OH)₂D₃ zu einer Verringerung des Körpergewichtes im Rattenmodell führen kann (Chow *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse zeigten, dass in Nagern VitD dazu in der Lage ist das Körpergewicht zu beeinflussen. Aber auch mehrere klinische Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Umstand auch im Menschen zu finden ist. So kann auch im Menschen ein Mangel an VitD häufig mit einem erhöhten Körpergewicht in Verbindung gebracht werden (Drincic *et al.*, 2012, Olson *et al.*, 2012, Turer *et al.*, 2013). Zusammen mit den Ergebnissen der Literatur konnte in dieser Arbeit ein deutlicher aber nicht signifikanter Einfluss des VitD auf das Körpergewicht gezeigt werden und verdeutlicht dessen mutmaßliche Funktion bei der Ausbildung von Adipositas.

5.3 VitD beeinflusst nicht die Ausschüttung von IL-1 β und KC und der Leukozyten-Rekrutierung in den gewählten akuten Infektionen der Mausmodelle

Neben den Nieren sind auch viele andere Organe und Zelltypen zur Aktivierung des VitD fähig sind. So können auch alveolare Makrophagen 25(OH)D₃ zu 1,25(OH)₂D₃ hydroxylieren (Adams *et al.*, 1983, Adams and Gacad, 1985, Adams *et al.*, 1985). Daher wurde in dieser Arbeit zunächst angenommen, dass VitD auch in den gewählten Modellen einen Einfluss auf die murinen Makrophagen der Lunge hat. Die verschiedenen Infektionsmodelle zeigten in dieser Arbeit jedoch keine Unterschiede in der Anzahl oder der ausgeschütteten Menge an KC beim Vergleich der mit VitD behandelten oder der Mangeltiere mit den jeweiligen Kontrollen. So konnte hier keine Wirkung des VitD auf diese Zelltypen festgestellt werden.

Neben den Makrophagen zeigen auch epitheliale Zellen der Lunge die Fähigkeit zur direkten Aktivierung des VitD (Hansdottir *et al.*, 2008). 1,25(OH)₂D₃ ist dabei in der Lage im humanen Epithel pro-inflammatorische Prozesse, wie die Expression von IL-1 β und IL-8, bei akuten Infektionen zu inhibieren (Xue *et al.*, 2002, McNally *et al.*, 2011). Jedoch wurde in dieser Arbeit keine beeinträchtigte Ausschüttung des murinen Homologes von IL-8, KC oder IL-1 β in den untersuchten Mäusen gefunden. Die

direkten Applikationen des 25(OH)D₃, gelöst in Ethanol oder verpackt in Liposomen, zeigten dabei bei der murinen epithelialen Zelllinie LA-4 keine veränderten Konzentrationen an KC im medialen Überstand. Im Gegensatz dazu führte derselbe Versuchsaufbau bei humanen Epithelzellen zu einer verminderten Abgabe von IL-8 (Castoldi et al., unpubliziert). Dies steht im Zusammenhang mit neuerer Literatur, in der eine unterschiedliche Wirkung des VitD in Maus und Mensch postuliert wurde (Gombart et al., 2005, Dimitrov and White, 2015).

Respiratorische Infektionen, ausgelöst durch *P. aeruginosa*, sind beschrieben durch einen schnellen und massiven Einstrom an Neutrophilen (Lavoie et al., 2011). Dies wird maßgeblich durch das Chemokine IL-8 beeinflusst. Epithelzellen und alveolare Makrophagen können direkt nach der Erkennung der Pathogene dieses Zytokin synthetisieren und sezernieren. Hierdurch werden Neutrophile zum infizierten Ort gelockt. Dabei spielt dieses Zytokin besonders eine Rolle in der akuten Phase der *P. aeruginosa* Infektion. Es wird in besonders hohen Mengen in den ersten Stunden gebildet und mit der Zeit schnell wieder abgebaut (Tsai et al., 2000). Auch die gemessenen Konzentrationen an KC in den hier dargestellten Infektionsmodellen mit *P. aeruginosa* zeigten diesen Sachverhalt auf. Eine anfänglich sehr hohe Konzentration 6 h nach der Infektion war bereits nach weiteren 18 h deutlich reduziert. Humane *in vitro* Analysen zeigten, dass VitD eine wichtigere Rolle bei der Synthese von IL-8 spielt. Dabei führt die Applikation zu einer geringeren Konzentration an IL-8 (Xue et al., 2002, McNally et al., 2011). Andersherum kann bei Krankheiten, die mit einem Mangel des VitD einhergehen, eine erhöhte IL-8 Sezernierung gefunden werden (Bonfield et al., 1995). In den hier gezeigten murinen Versuchen führte jedoch weder der systemische Mangel noch die endotracheale Applikation zu einer Beeinflussung der Synthese an KC in den verschiedenen Infektionsmodellen. Dabei konnte zudem auch kein Einwirken des verfügbaren VitD auf die Rekrutierung der Neutrophile nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten auch Klaff et al. 2012, dass der systemische Mangel an VitD zu keiner Beeinflussung der KC-Ausschüttung in der Lunge nach der Stimulation mit LPS führte (Klaff et al., 2012). So scheint es, dass das humane IL-8 anderen Kontrollmechanismen unterliegt als das murine Homolog KC.

Neben der Ausschüttung von IL-8 führen Pneumonien, ausgelöst durch *P. aeruginosa*, auch zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung von alveolaren Makrophagen (Bonfield et al., 1995, Lavoie et al., 2011). Dabei spielt dieses Zytokin eine wichtigere Rolle bei der Klärung der Bakterien im respiratorischen Raum (Descamps et al., 2012). Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde die Menge an IL-1 β in der BALF und im

Lungengewebe bestimmt. Bei allen Infektionsmodellen konnten erhöhte Werte an IL-1 β nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten humane *in vitro* Daten, dass VitD die Expression und somit auch die sezernierte Menge an IL-1 β steigern kann (Verway *et al.*, 2013). Jedoch zeigte dieselbe Studie auch, dass die Expression von IL-1 β in primären Mausmakrophagen durch die Applikation von 1,25(OH) $_2$ D $_3$ nicht verändert wird. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten die Untersuchungen dieser Arbeit keinen Einfluss des VitD auf die Ausschüttung von IL-1 β in der Lunge der analysierten Mäuse.

Nicht nur bei Infektionen durch das Gram-negative Bakterium *P. aeruginosa* werden häufig geringe VitD-Spiegel gefunden, auch bei Patienten mit einer Pneumokokken Infektion kann dieser Umstand gezeigt werden (Pletz *et al.*, 2014). Bei der Infektion mit *S. pneumoniae* wird das Zytokin IL-1 β , gesteuert durch das NLRP3-Inflammasom, vermehrt gebildet (Fang *et al.*, 2011, Witzenthalm *et al.*, 2011). Dabei nimmt es u. a. Einfluss auf die Synthese von IL-8 und somit auf die Rekrutierung von Neutrophilen (Jones *et al.*, 2005, Marriott *et al.*, 2012). Die hier gezeigten Infektionsmodelle zeigten, dass die Behandlung mit *S. pneumoniae* D39 zu erhöhten Werten an IL-1 β führten. Des Weiteren zeigten sich erhöhte Werte in KC und ein eindeutiger Einstrom an Neutrophilen. Jedoch konnte auch in diesem Pneumoniemodell kein Einfluss von VitD nachgewiesen werden. Sowohl die Applikation als auch der systemische Mangel zeigten keine Auswirkungen in den untersuchten Parametern nach der Infektion. Der vermutete Unterschied in den Abwehrsystemen zwischen Mensch und Maus scheint also nicht nur bei Infektionen durch *P. aeruginosa* Anwendung zu finden, sondern auch bei der *S. pneumoniae* Infektion.

5.4 VitD beeinflusst nicht das bakterielle Überleben in der Lunge in den gewählten Mausmodellen

Einhergehend mit fehlenden Unterschieden in den Entzündungsreaktionen, konnte auch keine Veränderung der bakteriellen Bekämpfung nachgewiesen werden. Das Überleben der gewählten Bakterien nach den intranasalen Infektionen war weder beeinflusst durch den systemischen Mangel noch durch die endotracheale Gabe des VitD. Jedoch steht dies im Gegensatz zu einigen Studien, die in Patienten mit einem systemischen Mangel eine deutliche Beeinträchtigung der Bekämpfung von Mikroorganismen aufweisen konnten (Wilkinson *et al.*, 2000, Lagishetty *et al.*, 2010, Chalmers *et al.*, 2013). Auch kann dieses Vitamin die antimikrobielle Fähigkeit der Makrophagen fördern (Liu *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2009). Ein möglicher Grund für die

gegensätzlichen Ergebnisse zwischen den klinischen Studien und dem hier gezeigtem murinen Modell könnte auch hier der vermutete Unterschied der Spezies sein.

5.5 Der Einfluss des VitD auf das Immunsystem scheint speziesabhängig zu sein

Das Immunsystem muss sich immer wieder auf neue umweltbedingte Veränderungen einstellen. So hat sich dieses auch im Laufe der Evolution in den unterschiedlichen Spezies auf das jeweilige Habitat angepasst. Daher scheint es nicht verwunderlich, dass die immunologischen Reaktionen in Mensch und Maus sich in vielen Facetten unterscheiden. Bei einer TLR2-Stimulation z. B., antwortet das murine Immunsystem häufig durch die Bildung von Stickstoffmonoxid, welches im Menschen auf anderem Wege reguliert wird (Chan *et al.*, 1992, Thoma-Uszynski *et al.*, 2001). Und auch der Einfluss des VitD auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden scheint Spezies abhängig zu sein. Dabei sind diese Proteine, neben den Leukozyten, zur Bekämpfung von eingedrungenen Mikroorganismen essentiell. Verschiedene Studien zeigten in den letzten Jahren, dass u. a. die Expressionen von CAMP, DEF4 und NOD2 in humanen Zellen durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induziert werden können und somit eine bakterielle Ausbreitung maßgeblich reduziert wird (Wang *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2009). Jedoch ist dieser Umstand in murinen Zellen nicht oder weniger stark verfügbar und konnte auch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Weitergehende Untersuchungen deckten auf, dass die Bindungsstelle für den VDR in den Promotorregionen dieser Peptide nur in Primaten konserviert und in Nagern nicht vorhanden ist (Gombart, 2009, Dimitrov and White, 2015). Aber auch die Bindungsstelle in der Promotor Region des IL-1 β kann nicht in Mäusen oder Ratten nachgewiesen werden, wie in Primaten und die transkriptionelle Induktion von IL-1 β fehlt in diesen Spezies (Verway *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnten humane *in vitro* Studien bei der Applikation des in Ethanol gelösten und des in Liposomen verpackten $25(\text{OH})\text{D}_3$ einen suppressiven Effekt auf die IL-8-Abgabe und einen fördernden antimikrobiellen Effekt aufzeigen (Castoldi *et al.*, unpubliziert). Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Applikationsformen bei der murinen Zelllinie LA-4 keine Auswirkungen auf die Abgabe von KC.

Polymorphismen im Gen für den VDR können hingegen häufig bei Patienten mit einer erhöhten Anfälligkeit für Tuberkulose oder Hepatitis B gefunden werden (Bellamy *et al.*, 1999, Singh *et al.*, 2012, Rashedi *et al.*, 2014). Dabei nimmt VitD über die Bindung zum VDR u. a. Einfluss auf die Synthese von antimikrobiellen Peptiden wie CAMP (Liu *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse in dieser Arbeit,

dass der Wegfall oder die Gabe von VitD nicht die antimikrobiellen Eigenschaften der Lunge beeinflussten. Auch wiesen weitere Arbeiten darauf hin, dass die genetische Manipulation des VDR-Gens nicht die Expression des murinen Homologes des CAMP oder die bakterielle Bekämpfung beeinflusst (Gombart *et al.*, 2005).

5.6 Schlussbemerkungen

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten in keinem der untersuchten Parameter der spezifischen Immunabwehr der Lunge einen Einfluss des VitD. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, könnte das gewählte murine System ein für diese Analysen ungeeigneter Modellorganismus sein, da nicht nur das Immunsystem im Allgemeinen sondern auch der Einfluss des VitD im Menschen anderen Mechanismen unterliegt als in der Maus. Jedoch könnten auch weitere Sachverhalte den fehlenden Einfluss des VitD in den hier gewählten Untersuchungsmodellen erklären.

In dieser Arbeit wurde nur der systemische Mangel an VitD in ansonsten gesunden Tieren untersucht. Viele Patientenstudien zeigten jedoch, dass gerade ein VitD-Mangel häufig bei vorbelasteten, chronisch Kranken oder gar bei der Intensivbehandlung mit einem verschlechterten Krankheitsverlauf einhergeht (Jeng *et al.*, 2009, McNally *et al.*, 2009). Auch zeigten einige klinische Studien, dass die Applikation von VitD nicht zu der erhofften Verbesserung des Krankheitsbildes führte (Diamond *et al.*, 2005, Li-Ng *et al.*, 2009). Daher stellt sich die Frage, ob der Mangel an VitD nur eine Begleiterscheinung von anderen Krankheiten sein könnte. Menschen mit chronischen Infektionen oder gar jene mit langen Krankenhausaufenthalten halten sich sehr viel weniger im Sonnenlicht auf und ernähren sich häufig einseitiger, als gesunde Menschen. So könnten die häufig gemessenen verringerten VitD-Werte bei Patienten mit chronischen Lungenentzündungen auch ein Resultat eines verschlechterten Krankheitsbild sein und nicht der Auslöser.

Eine weitere mögliche Erklärung für den fehlenden Einfluss des VitD könnte der gewählte Versuchsaufbau dieser Arbeit sein. Dabei wurden die Reaktionen der angeborenen Immunabwehr auf eine einmalige Infektion untersucht. Die meisten Patientenstudien beschäftigen sich jedoch mit chronischen Lungenerkrankungen, wobei häufig nicht die einzelne Infektion beurteilt wird, sondern die Häufigkeit und die Schwere einer wiederholten Lungenentzündung. Wie bereits im vorherigen Absatz erwähnt, zeigt sich der Mangel an VitD gehäuft bei schweren und chronischen Erkrankungen (Jeng *et al.*, 2009, McNally *et al.*, 2009). Daher könnten die

untersuchten Marker der spezifischen Abwehr des angeborenen Immunsystems von dem systemischen Mangel unbeeinflusst sein und der Schaden durch den Mangel in den Patienten durch eine Beeinträchtigung der adaptiven Antwort bei chronischen oder wiederholten Infektionen. Hier beeinträchtigt das VitD maßgeblich in der Bildung der Lymphozyten. Bei dem Mangel des VitD, könnte durch die fehlende Kontrolle der Proliferation und Aktivität von T- und B-Zellen eine aggressive, langanhaltende oder wiederholt auftretende Infektion schlechter geklärt werden. Dabei könnten die Entzündungsreaktionen länger andauern, das Lungengewebe stärker geschädigt werden und so eine chronische Erkrankung der Lunge etablieren (Tsoukas *et al.*, 1984, Lemire *et al.*, 1985, Lemire, 1995).

Andere Substanzen könnten dabei aber auch den Mangel an VitD kompensieren und die fehlende Kontrolle der spezifischen Immunabwehr ausgleichen, sodass ein alleiniger Mangel an VitD nicht zu einer beachtlichen Beeinträchtigung im gewählten Infektionsmodell führte. So scheint die Kontrolle des VitD auf die Konzentration des PTH nicht nur im Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel eine Rolle zu spielen. Sowohl das VitD als auch das PTH sind dazu im Stande, die Expression von CAMP zu aktivieren (Muehleisen *et al.*, 2012). So führt das Fehlen des einen zur Erhöhung des jeweils anderen und somit könnte der Verlust des VitD durch eine erhöhte Synthese von PTH kompensiert werden.

Literaturdaten zeigen eindeutig eine wichtige Rolle des VitD bei der Bekämpfung von Infektionen der Lunge und bei der Kontrolle der einhergehenden Entzündungsreaktionen. Auch die Studie von Klaff *et al.* zeigte übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass der systemische Mangel an VitD im Mausmodell keinen Einfluss auf die Entwicklung des LPS-induzierten Lungenschadens nimmt. Hier blieben fast alle untersuchten Parameter, wie die Anzahl der BALF-Leukozyten und die Konzentration an KC, unbeeinflusst von der systemischen Konzentration an VitD (Klaff *et al.*, 2012).

Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten zeigen die Komplexität der physiologischen Rolle des VitD auf. Dabei wird deutlich, dass sich im Besonderen die Immunsysteme in verschiedenen Spezies auf die jeweils speziellen Umweltbedingungen eingestellt haben. Durch die hier vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, dass die Maus zur Untersuchung der Rolle des VitD bei akuten Infektionsreaktionen nicht geeignet scheint, um diese auf den Menschen zu übertragen.

6 Anhang**6.1 Abkürzungsverzeichnis**

1,25(OH)D ₃	1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃
25(OH)D ₃	25-Hydroxyvitamin D ₃
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance
BALF	bronchoalveolären Lavageflüssigkeit
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide
CFU	colony forming Units
COPD	chronic obstructive pulmonary disease (chronische obstruktive Lungenerkrankung)
Cyp	Cytochrom P450 Enzyme
d	days (Tage)
DBP	Vitamin D binding protein (Vitamin D Bindeprotein)
DC	dendritic cells (Dendritische Zellen)
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assays
FBS	fetal bovine serum (Fötales Kälberserum)
h. i.	hitzeinaktiviert
hBD2	humanes β -Defensin-2
HIPS	Helmholz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland
I. E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
IL	Interleukin
I κ B	Inhibitor für NF- κ B
LDH	Laktat-Dehydrogenase

<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Natriumchlorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 Nanometern
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P/S	Penicillin-Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PTH	parathyroid hormone (Parathormon)
RXR	Retinoid X receptor (Rezeptor für 9-cis-Retinsäure)
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TBS	Tris-buffered saline (Trisgepufferte Salzlösung)
T _H	T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
T _{reg}	regulatorischen T-Zellen
ü. N.	über Nacht
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	Vitamin D responsive element
VitD	Vitamin D
WT	Wildtyp

6.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische und vereinfachte Darstellung des VitD-Metabolismus.
- Abbildung 2: Schematische Darstellung des zellulären Signalweges des VitD.
- Abbildung 3: Einfluss des VitD auf verschiedene Zellen des Immunsystems.
- Abbildung 4: Der systemische Mangel an VitD führt zu keinem Unterschied des Körpergewichts.
- Abbildung 5: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF.
- Abbildung 6: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge.
- Abbildung 7: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner immunologischen Beeinträchtigung in der Lunge nach der PBS-Stimulation.
- Abbildung 8: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 9: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 10: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 11: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 12: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 13: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner signifikanten Beeinträchtigung des Gewichtes nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.

- Abbildung 14: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 15: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 16: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 17: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes oder der bakteriellen Klärung in der Lunge nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* NH57388A.
- Abbildung 18: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* NH57388A.
- Abbildung 19: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach subakuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* NH57388A.
- Abbildung 20: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 21: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 22: Der systemische Mangel an VitD führt zu keiner Beeinträchtigung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 23: Die Applikation von 25(OH)D₃ führt zu keiner Veränderung der KC-Abgabe nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 bei LA-4 Zellen.
- Abbildung 24: Die Applikation von 25(OH)D₃ führt zu keiner Veränderung Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach der PBS-Stimulation.

- Abbildung 25: Die Applikation von $25(\text{OH})\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 26: Die Applikation von $25(\text{OH})\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 27: Die Applikation von $25(\text{OH})\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 28: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von $25(\text{OH})\text{D}_3$ für 48 h führten zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 29: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von $25(\text{OH})\text{D}_3$ für 48 h führten zu keiner Veränderung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 30: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von $25(\text{OH})\text{D}_3$ für 48 h führten zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 31: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von $25(\text{OH})\text{D}_3$ für 96 h führten zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 32: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von $25(\text{OH})\text{D}_3$ für 96 h führten zu keiner Veränderung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 33: Die Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen von $25(\text{OH})\text{D}_3$ für 96 h führten zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 34: Die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach der PBS-Stimulation.

- Abbildung 35: Die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 36: Die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung der Zytokinabgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 37: Die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.
- Abbildung 38: Die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung führt zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 39: Die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung der Zytokin-Abgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1
- Abbildung 40: Die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 41: Die Applikation von $25(\text{OH})\text{D}_3$ verpackt in Liposomen führt zu keiner Veränderung der KC-Abgabe nach der Stimulation mit h. i. *P. aeruginosa* PAO1 bei LA-4 Zellen.
- Abbildung 42: Die Applikation der Liposomen führte zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF.
- Abbildung 43: Die Applikation der Liposomen führte zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Immunzellen in der BALF nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 44: Die Applikation der Liposomen führt zu keiner Veränderung der KC-Abgabe in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *P. aeruginosa* PAO1.
- Abbildung 45: Die Applikation der Liposomen führte zu keiner Veränderung der bakteriellen Klärung in der Lunge nach akuter Infektion mit lebendigen *S. pneumoniae* D39.

6.3 Literaturverzeichnis

- Adams JS, Gacad MA (1985) Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J Exp Med* 161:755-765.
- Adams JS, Sharma OP, Gacad MA, Singer FR (1983) Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Invest* 72:1856-1860.
- Adams JS, Singer FR, Gacad MA, Sharma OP, Hayes MJ, Vouros P, Holick MF (1985) Isolation and structural identification of 1,25-dihydroxyvitamin D3 produced by cultured alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Endocrinol Metab* 60:960-966.
- Alvira CM (2014) Nuclear factor-kappa-B signaling in lung development and disease: one pathway, numerous functions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100:202-216.
- Amrein K, Sourij H, Wagner G, Holl A, Pieber TR, Smolle KH, Stojakovic T, Schnedl C, Dobnig H (2011) Short-term effects of high-dose oral vitamin D3 in critically ill vitamin D deficient patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Crit Care* 15:R104.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13:238-252.
- Belderbos ME, Houben ML, Wilbrink B, Lentjes E, Bloemen EM, Kimpen JL, Rovers M, Bont L (2011) Cord blood vitamin D deficiency is associated with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatrics* 127:e1513-e1520.
- Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV (1999) Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 179:721-724.
- Belsey R, Clark MB, Bernat M, Glowacki J, Holick MF, DeLuca HF, Potts JT, Jr. (1974) The physiologic significance of plasma transport of vitamin D and metabolites. *Am J Med* 57:50-56.
- Bergman P, Norlin AC, Hansen S, Rekha RS, Agerberth B, Bjorkhem-Bergman L, Ekstrom L, Lindh JD, Andersson J (2012) Vitamin D3 supplementation in patients with frequent respiratory tract infections: a randomised and double-blind intervention study. *BMJ Open* 2.

- Betelli E, Korn T, Kuchroo VK (2007) Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19:652-657.
- Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM (1983) Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab* 57:1308-1310.
- Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG (1986) Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 63:954-959.
- Bivas-Benita M, Zwier R, Junginger HE, Borchard G (2005) Non-invasive pulmonary aerosol delivery in mice by the endotracheal route. *Eur J Pharm Biopharm* 61:214-218.
- Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M (1995) Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152:2111-2118.
- Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A (2001) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 167:4974-4980.
- Bordon J, Aliberti S, Fernandez-Botran R, Uriarte SM, Rane MJ, Duvvuri P, Peyrani P, Morlacchi LC, Blasi F, Ramirez JA (2013) Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. *Int J Infect Dis* 17:e76-83.
- Bouillon R, Van Kerkhove P, De Moor P (1976) Characteristics of the vitamin D binding protein in different species. *Calcif Tissue Res* 21 Suppl:172-176.
- Boutten A, Dehoux MS, Seta N, Ostinelli J, Venembre P, Crestani B, Dombret MC, Durand G, Aubier M (1996) Compartmentalized IL-8 and elastase release within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 153:336-342.
- Boyle IT, Miravet L, Gray RW, Holick MF, Deluca HF (1972) The response of intestinal calcium transport to 25-hydroxy and 1,25-dihydroxy vitamin D in nephrectomized rats. *Endocrinology* 90:605-608.
- Bronner F (2001) Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *ScientificWorldJournal* 1:919-925.

- Brumbaugh PF, Haussler MR (1974) 1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. II. Temperature-dependent transfer of the hormone to chromatin via a specific cytosol receptor. *J Biol Chem* 249:1258-1262.
- Brumbaugh PF, Haussler MR (1975) Specific binding of 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine. *J Biol Chem* 250:1588-1594.
- Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, Lloyd CM (2015) Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax* 70:1189-1196.
- Camargo CA, Jr., Ingham T, Wickens K, Thadhani R, Silvers KM, Epton MJ, Town GI, Pattermore PK, Espinola JA, Crane J (2011) Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. *Pediatrics* 127:e180-e187.
- Campa M, Bendinelli M, Friedman H (1993) *Pseudomonas aeruginosa* as an Opportunistic Pathogen: Springer, New York.
- Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L (2015) Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. *Nutrients* 7:3011-3021.
- Carlberg C (1993) RXR-independent action of the receptors for thyroid hormone, retinoid acid and vitamin D on inverted palindromes. *Biochem Biophys Res Commun* 195:1345-1353.
- Carlberg C (1995) Mechanisms of nuclear signalling by vitamin D₃. Interplay with retinoid and thyroid hormone signalling. *Eur J Biochem* 231:517-527.
- Carlsson A (1954) The effect of vitamin D on the absorption of inorganic phosphate. *Acta Physiol Scand* 31:301-307.
- Chalmers JD, McHugh BJ, Docherty C, Govan JR, Hill AT (2013) Vitamin-D deficiency is associated with chronic bacterial colonisation and disease severity in bronchiectasis. *Thorax* 68:39-47.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR (1992) Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 175:1111-1122.
- Charan J, Goyal JP, Saxena D, Yadav P (2012) Vitamin D for prevention of respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis. *J Pharmacol Pharmacother* 3:300-303.

- Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE (2007) Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol* 179:1634-1647.
- Chen TC, Castillo L, Korycka-Dahl M, DeLuca HF (1974) Role of vitamin D metabolites in phosphate transport of rat intestine. *J Nutr* 104:1056-1060.
- Chen Y, Zhang J, Ge X, Du J, Deb DK, Li YC (2013) Vitamin D receptor inhibits nuclear factor kappaB activation by interacting with IkappaB kinase beta protein. *J Biol Chem* 288:19450-19458.
- Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW (2004) Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7711-7715.
- Chertow BS, Baker GR, Henry HL, Norman AW (1980) Effects of vitamin D metabolites on bovine parathyroid hormone release in vitro. *Am J Physiol* 238:E384-388.
- Chesdachai S, Tangpricha V (2015) Treatment of vitamin D deficiency in cystic fibrosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Cheskis B, Freedman LP (1994) Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D₃ receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol* 14:3329-3338.
- Choi CJ, Seo M, Choi WS, Kim KS, Youn SA, Lindsey T, Choi YJ, Kim CM (2013) Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and lung function among Korean adults in Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES), 2008-2010. *J Clin Endocrinol Metab* 98:1703-1710.
- Chow EC, Sondervan M, Jin C, Groothuis GM, Pang KS (2011) Comparative effects of doxercalciferol (1alpha-hydroxyvitamin D₂) versus calcitriol (1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃) on the expression of transporters and enzymes in the rat in vivo. *J Pharm Sci* 100:1594-1604.
- Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ (2010) Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:243-253, table of contents.
- Christakos S, Norman AW (1979) Studies on the mode of action of calciferol. XVIII. Evidence for a specific high affinity binding protein for 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in chick kidney and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 89:56-63.
- Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A (2006) Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol Dial Transplant* 21:889-897.

- Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Mus AM, van Driel M, Hazes JM, van Leeuwen JP, Lubberts E (2010) 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62:132-142.
- Colston K, Feldman D (1980) Nuclear translocation of the 1,25-dihydroxycholecalciferol receptor in mouse kidney. *J Biol Chem* 255:7510-7513.
- Colston K, Hirt M, Feldman D (1980) Organ distribution of the cytoplasmic 1,25-dihydroxycholecalciferol receptor in various mouse tissues. *Endocrinology* 107:1916-1922.
- Dauletbaev N, Herscovitch K, Das M, Chen H, Bernier J, Matouk E, Berube J, Rousseau S, Lands LC (2015) Down-regulation of IL-8 by high-dose vitamin D is specific to hyperinflammatory macrophages and involves mechanisms beyond up-regulation of DUSP1. *Br J Pharmacol* 172:4757-4771.
- DeLuca HF (1972) 1,25-dihydroxycholecalciferol: a hormonal form of vitamin D active on intestine. *Biochem J* 128:14P-15P.
- DeLuca HF, Prahil JM, Plum LA (2011) 1,25-Dihydroxyvitamin D is not responsible for toxicity caused by vitamin D or 25-hydroxyvitamin D. *Arch Biochem Biophys* 505:226-230.
- Demay MB, Gerardi JM, DeLuca HF, Kronenberg HM (1990) DNA sequences in the rat osteocalcin gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and confer responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:369-373.
- Descamps D, Le Gars M, Balloy V, Barbier D, Maschalidi S, Tohme M, Chignard M, Ramphal R, Manoury B, Sallenave JM (2012) Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1beta secretion, and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1619-1624.
- Diamond TH, Ho KW, Rohl PG, Meerkin M (2005) Annual intramuscular injection of a megadose of cholecalciferol for treatment of vitamin D deficiency: efficacy and safety data. *Med J Aust* 183:10-12.
- Dimitrov V, White JH (2015) Species-specific regulation of innate immunity by vitamin D signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol*.

- Drincic AT, Armas LA, Van Diest EE, Heaney RP (2012) Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 20:1444-1448.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Fairney A, Fry J, Lipscomb A (1979) The effect of darkness on vitamin D in adults. *Postgrad Med J* 55:248-250.
- Fang R, Tsuchiya K, Kawamura I, Shen Y, Hara H, Sakai S, Yamamoto T, Fernandes-Alnemri T, Yang R, Hernandez-Cuellar E, Dewamitta SR, Xu Y, Qu H, Alnemri ES, Mitsuyama M (2011) Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol* 187:4890-4899.
- Fox-Dewhurst R, Alberts MK, Kajikawa O, Caldwell E, Johnson MC, 2nd, Skerrett SJ, Goodman RB, Ruzinski JT, Wong VA, Chi EY, Martin TR (1997) Pulmonary and systemic inflammatory responses in rabbits with gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 155:2030-2040.
- Gensure RC, Riggle PC, Antrobus SD, Walters MR (1991) Evidence for two classes of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ binding sites in classical vs. nonclassical target tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 180:867-873.
- Gerke AK, Pezzulo AA, Tang F, Cavanaugh JE, Bair TB, Phillips E, Powers LS, Monick MM (2014a) Effects of vitamin D supplementation on alveolar macrophage gene expression: preliminary results of a randomized, controlled trial. *Multidiscip Respir Med* 9:18.
- Gerke AK, Pezzulo AA, Tang F, Cavanaugh JE, Bair TB, Phillips E, Powers LS, Monick MM (2014b) Effects of vitamin D supplementation on alveolar macrophage gene expression: preliminary results of a randomized, controlled trial. *Multidiscip Respir Med* 9:18.
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58:685-704.
- Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. (2009) Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 169:384-390.
- Gombart AF (2009) The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol* 4:1151-1165.

- Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP (2005) Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB J* 19:1067-1077.
- Gombart AF, Saito T, Koeffler HP (2009) Exaptation of an ancient Alu short interspersed element provides a highly conserved vitamin D-mediated innate immune response in humans and primates. *BMC Genomics* 10:321.
- Green S, Chambon P (1988) Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* 4:309-314.
- Griffin MD, Kumar R (2003) Effects of 1 α ,25(OH)₂D₃ and its analogs on dendritic cell function. *J Cell Biochem* 88:323-326.
- Grossmann RE, Zughair SM, Kumari M, Seydafkan S, Lyles RH, Liu S, Sueblinvong V, Schechter MS, Stecenko AA, Ziegler TR, Tangpricha V (2012a) Pilot study of vitamin D supplementation in adults with cystic fibrosis pulmonary exacerbation: A randomized, controlled trial. *Dermatoendocrinol* 4:191-197.
- Grossmann RE, Zughair SM, Liu S, Lyles RH, Tangpricha V (2012b) Impact of vitamin D supplementation on markers of inflammation in adults with cystic fibrosis hospitalized for a pulmonary exacerbation. *Eur J Clin Nutr* 66:1072-1074.
- Gruson M, Demignon J, Del Pino Montes J, Miravet L (1982) Comparative effects of some hydroxylated vitamin D metabolites on parathyrin secretion by dispersed rat parathyroid cells in vitro. *Steroids* 40:275-285.
- Hamzaoui A, Berraies A, Hamdi B, Kaabachi W, Ammar J, Hamzaoui K (2014) Vitamin D reduces the differentiation and expansion of Th17 cells in young asthmatic children. *Immunobiology* 219:873-879.
- Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, Lovan N, Look DC, Hunninghake GW (2008) Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. *J Immunol* 181:7090-7099.
- Harant H, Wolff B, Lindley IJ (1998) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ decreases DNA binding of nuclear factor-kappaB in human fibroblasts. *FEBS Lett* 436:329-334.
- Harrison HE, Harrison HC (1961) Intestinal transport of phosphate: action of vitamin D, calcium, and potassium. *Am J Physiol* 201:1007-1012.
- Hashimoto S, Pittet JF, Hong K, Folkesson H, Bagby G, Kobzik L, Frevert C, Watanabe K, Tsurufuji S, Wiener-Kronish J (1996) Depletion of alveolar macrophages

- decreases neutrophil chemotaxis to *Pseudomonas* airspace infections. *Am J Physiol* 270:L819-828.
- Haussler CA, Marion SL, Pike JW, Haussler MR (1986) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the clonogenic growth of transformed cells via its receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 139:136-143.
- Haussler MR (1986) Vitamin D receptors: nature and function. *Annu Rev Nutr* 6:527-562.
- Haussler MR, Boyce DW, Littledike ET, Rasmussen H (1971) A rapidly acting metabolite of vitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:177-181.
- Haussler MR, Myrtle JF, Norman AW (1968) The association of a metabolite of vitamin D₃ with intestinal mucosa chromatin in vivo. *J Biol Chem* 243:4055-4064.
- Heist RS, Zhou W, Wang Z, Liu G, Neuberg D, Su L, Asomaning K, Hollis BW, Lynch TJ, Wain JC, Giovannucci E, Christiani DC (2008) Circulating 25-hydroxyvitamin D, VDR polymorphisms, and survival in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 26:5596-5602.
- Herr C, Greulich T, Koczulla RA, Meyer S, Zakharkina T, Branscheidt M, Eschmann R, Bals R (2011) The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer. *Respir Res* 12:31.
- Hershberger PA, Modzelewski RA, Shurin ZR, Rueger RM, Trump DL, Johnson CS (1999) 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25-D₃) inhibits the growth of squamous cell carcinoma and down-modulates p21(Waf1/Cip1) in vitro and in vivo. *Cancer Res* 59:2644-2649.
- Hewison M, Brennan A, Singh-Ranger R, Walters JC, Katz DR, O'Riordan JL (1992) The comparative role of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phorbol esters in the differentiation of the U937 cell line. *Immunology* 77:304-311.
- Hiemstra PS (2007) The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Exp Lung Res* 33:537-542.
- Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, Givskov M, Hoiby N (2007) Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cftr(-/-) mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3677-3687.
- Hoffmann N, Rasmussen TB, Jensen PO, Stub C, Hentzer M, Molin S, Ciofu O, Givskov M, Johansen HK, Hoiby N (2005) Novel mouse model of chronic

- Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infect Immun* 73:2504-2514.
- Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357:266-281.
- Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Jr., Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P (1980) Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210:203-205.
- Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF (1971) Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D3 metabolically active in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:803-804.
- Hughes MR, Haussler MR (1978) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in parathyroid glands. Preliminary characterization of cytoplasmic and nuclear binding components. *J Biol Chem* 253:1065-1073.
- Huldschinsky K (1919) Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 45:712-713.
- Imawari M, Kida K, Goodman DS (1976) The transport of vitamin D and its 25-hydroxy metabolite in human plasma. Isolation and partial characterization of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D binding protein. *J Clin Invest* 58:514-523.
- Iwata K, Yamamoto A, Satoh S, Ohyama Y, Tashiro Y, Setoguchi T (1995) Quantitative immunoelectron microscopic analysis of the localization and induction of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase in rat kidney. *J Histochem Cytochem* 43:255-262.
- Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, Tangpricha V (2009) Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med* 7:28.
- Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF (1998) Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78:1193-1231.
- Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP (2005) Lung NF-kappaB activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 175:7530-7535.
- Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, Ichiyama K, Yoshimura A, Steinman L, Christakos S, Youssef S (2011) 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol* 31:3653-3669.

- Karem E, Karem B (1995) The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 6:450-456
- Kilkinen A, Knekt P, Heliovaara M, Rissanen H, Marniemi J, Hakulinen T, Aromaa A (2008) Vitamin D status and the risk of lung cancer: a cohort study in Finland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:3274-3278.
- Kimmel-Jehan C, Darwish HM, Strugnell SA, Jehan F, Wiefeling B, DeLuca HF (1999) DNA bending is induced by binding of vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimers to vitamin D response elements. *J Cell Biochem* 74:220-228.
- Kimmel-Jehan C, Jehan F, DeLuca HF (1997) Salt concentration determines 1,25-dihydroxyvitamin D₃ dependency of vitamin D receptor-retinoid X receptor-vitamin D-responsive element complex formation. *Arch Biochem Biophys* 341:75-80.
- Klaff LS, Gill SE, Wisse BE, Mittelsteadt K, Matute-Bello G, Chen P, Altemeier WA (2012) Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury Is Independent of Serum Vitamin D Concentration. *Plos One* 7.
- Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM (1992) Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ signalling. *Nature* 355:446-449.
- Kooguchi K, Hashimoto S, Kobayashi A, Kitamura Y, Kudoh I, Wiener-Kronish J, Sawa T (1998) Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun* 66:3164-3169.
- Kopf M, Schneider C, Nobs SP (2015) The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol* 16:36-44.
- Korf H, Wenes M, Stijlemans B, Takiishi T, Robert S, Miani M, Eizirik DL, Gysemans C, Mathieu C (2012) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. *Immunobiology* 217:1292-1300.
- Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E (2007) Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19:362-371.
- Laaksi I, Ruohola JP, Tuohimaa P, Auvinen A, Haataja R, Pihlajamaki H, Ylikomi T (2007) An association of serum vitamin D concentrations < 40 nmol/L with acute respiratory tract infection in young Finnish men. *Am J Clin Nutr* 86:714-717.

- Lagishetty V, Misharin AV, Liu NQ, Lisse TS, Chun RF, Ouyang Y, McLachlan SM, Adams JS, Hewison M (2010) Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis. *Endocrinology* 151:2423-2432.
- Lambert AA, Drummond MB, Mehta SH, Brown TT, Lucas GM, Kirk GD, Estrella MM (2014) Risk factors for vitamin D deficiency among HIV-infected and uninfected injection drug users. *PLoS One* 9:e95802.
- Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI (2011) Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect* 13:1133-1145.
- Lawson DE, Wilson PW, Kodicek E (1969) Metabolism of vitamin D. A new cholecalciferol metabolite, involving loss of hydrogen at C-1, in chick intestinal nuclei. *Biochem J* 115:269-277.
- Le Roy C, Reyes M, Gonzalez JM, Perez-Bravo F, Castillo-Duran C (2013) [Vitamin D nutrition in Chilean pre-school children living in extreme latitudes]. *Rev Med Chil* 141:435-441.
- Lemire JM (1995) Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:599-602.
- Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC (1985) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol* 134:3032-3035.
- Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC (1984) 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 74:657-661.
- Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL (1995) Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 125:1704S-1708S.
- Li-Ng M, Aloia JF, Pollack S, Cunha BA, Mikhail M, Yeh J, Berbari N (2009) A randomized controlled trial of vitamin D₃ supplementation for the prevention of symptomatic upper respiratory tract infections. *Epidemiol Infect* 137:1396-1404.
- Li P, Xu XY, Cao EH, Yu B, Li WC, Fan M, Huang M, Shi LN, Zeng R, Su X, Shi Y (2014) Vitamin D Deficiency Causes Defective Resistance to *Aspergillus fumigatus* in Mice via Aggravated and Sustained Inflammation. *Plos One* 9.
- Liao J, Ozono K, Sone T, McDonnell DP, Pike JW (1990) Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires a nuclear protein and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9751-9755.

- Lindsay LA, Shindledecker RD, Tapia-Mendoza J, Dolitsky JN (2004) Effect of daily cod liver oil and a multivitamin-mineral supplement with selenium on upper respiratory tract pediatric visits by young, inner-city, Latino children: randomized pediatric sites. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 113:891-901.
- Litonjua AA, Weiss ST (2007) Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *J Allergy Clin Immunol* 120:1031-1035.
- Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Wheelwright M, Vazirnia A, Zhang X, Steinmeyer A, Zugel U, Hollis BW, Cheng G, Modlin RL (2009) Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *Plos One* 4:e5810.
- Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zugel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311:1770-1773.
- Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL (2007) Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol* 179:2060-2063.
- Manaseki-Holland S, Qader G, Isaq MM, Bruce J, Zulf MM, Chandramohan D, Walraven G (2010) Effects of vitamin D supplementation to children diagnosed with pneumonia in Kabul: a randomised controlled trial. *Trop Med Int Health* 15:1148-1155.
- Mangelsdorf DJ, Koeffler HP, Donaldson CA, Pike JW, Haussler MR (1984) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60): receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *J Cell Biol* 98:391-398.
- Marcondes NA, Raimundo FV, Vanacor R, Corte BP, Ascoli AM, de Azambuja AZ, Scopel L, Dos Santos PV, Dalcin Pde T, Rotta LN, Furlanetto TW, Faulhaber GA (2014) Hypovitaminosis D in patients with cystic fibrosis: a cross-section study in South Brazil. *Clin Respir J* 8:455-459.
- Marriott HM, Gascoyne KA, Gowda R, Geary I, Nicklin MJ, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Whyte MK, Sabroe I, Dockrell DH (2012) Interleukin-1beta regulates CXCL8 release and influences disease outcome in response to *Streptococcus pneumoniae*, defining intercellular cooperation between pulmonary epithelial cells and macrophages. *Infect Immun* 80:1140-1149.

- Masten AR (1935) Sunlight in Tuberculosis. *Chest* 1:8 - 23.
- Masuyama H, Brownfield CM, St-Arnaud R, MacDonald PN (1997) Evidence for ligand-dependent intramolecular folding of the AF-2 domain in vitamin D receptor-activated transcription and coactivator interaction. *Mol Endocrinol* 11:1507-1517.
- Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF (1987) Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1165-1168.
- McNally JD, Leis K, Matheson LA, Karuananyake C, Sankaran K, Rosenberg AM (2009) Vitamin D deficiency in young children with severe acute lower respiratory infection. *Pediatr Pulmonol* 44:981-988.
- McNally P, Coughlan C, Bergsson G, Doyle M, Taggart C, Adorini L, Uskokovic MR, El-Nazir B, Murphy P, Grealley P, Greene CM, McElvaney NG (2011) Vitamin D receptor agonists inhibit pro-inflammatory cytokine production from the respiratory epithelium in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 10:428-434.
- Mernitz H, Smith DE, Wood RJ, Russell RM, Wang XD (2007) Inhibition of lung carcinogenesis by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 9-cis retinoic acid in the A/J mouse model: evidence of retinoid mitigation of vitamin D toxicity. *Int J Cancer* 120:1402-1409.
- Miles K, Clarke DJ, Lu W, Sibinska Z, Beaumont PE, Davidson DJ, Barr TA, Campopiano DJ, Gray M (2009) Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. *J Immunol* 183:2122-2132.
- Monton C, Rano A, Torres A (1998) [Inflammatory response in pneumonia]. *Arch Bronconeumol* 34 Suppl 2:11-16.
- Morona JK, Miller DC, Morona R, Paton JC (2004) The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes *cpsA*, *cpsB*, and *cpsD* have on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 189:1905-1913.
- Muehleisen B, Bikle DD, Aguilera C, Burton DW, Sen GL, Deftos LJ, Gallo RL (2012) PTH/PTHrP and vitamin D control antimicrobial peptide expression and susceptibility to bacterial skin infection. *Sci Transl Med* 4:135ra166.
- Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Koderu Y, Kawaguchi Y, Hosoya T, Kato S (1999) Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3

- 1 α -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ in intact animals. *Endocrinology* 140:2224-2231.
- Murray CJL, Lopez AD (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global burden of disease study. *The Lancet* 349: 1498–1504.
- Nakagawa K, Sasaki Y, Kato S, Kubodera N, Okano T (2005) 22-Oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis* 26:1044-1054.
- Napetschnig J, Wu H (2013) Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys* 42:443-468.
- Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg B-J, Van der Meer JWM, Joosten LAB (2010) IL-1b processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLOS Pathogens* 6:e1000661
- Nicolaysen R (1937) Studies upon the mode of action of vitamin D: The absorption of phosphates from isolated loops of the small intestine in the rat. *Biochem J* 31:1086-1088.
- Nunn JD, Katz DR, Barker S, Fraher LJ, Hewison M, Hendy GN, O'Riordan JL (1986) Regulation of human tonsillar T-cell proliferation by the active metabolite of vitamin D $_3$. *Immunology* 59:479-484.
- O'Malley B (1990) The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol* 4:363-369.
- Ohyama Y, Noshiro M, Okuda K (1991) Cloning and expression of cDNA encoding 25-hydroxyvitamin D $_3$ 24-hydroxylase. *FEBS Lett* 278:195-198.
- Olson ML, Maalouf NM, Oden JD, White PC, Hutchison MR (2012) Vitamin D deficiency in obese children and its relationship to glucose homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab* 97:279-285.
- Omdahl JL, Morris HA, May BK (2002) Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr* 22:139-166.
- Overbergh L, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, Laureys J, Bouillon R, Mathieu C (2000) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes* 49:1301-1307.

- Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, Fabbri LM, Johnston SL (2006) Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 173:1114-1121.
- Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA (2002) Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 57:759-764.
- Penna G, Adorini L (2000) 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 164:2405-2411.
- Peterson PA (1971) Isolation and partial characterization of a human vitamin D-binding plasma protein. *J Biol Chem* 246:7748-7754.
- Pike JW, Haussler MR (1979) Purification of chicken intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5485-5489.
- Pike JW, Zella LA, Meyer MB, Fretz JA, Kim S (2007) Molecular actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on genes involved in calcium homeostasis. *J Bone Miner Res* 22 Suppl 2:V16-19.
- Pletz MW, Terkamp C, Schumacher U, Rohde G, Schutte H, Welte T, Bals R, Group CA-S (2014) Vitamin D deficiency in community-acquired pneumonia: low levels of 1,25(OH)₂ D are associated with disease severity. *Respir Res* 15:53.
- Pojsupap S, Iliriani K, Sampaio TZ, O'Hearn K, Kovesi T, Menon K, McNally JD (2015) Efficacy of high-dose vitamin D in pediatric asthma: a systematic review and meta-analysis. *J Asthma* 52:382-390.
- Ponchon G, DeLuca HF (1969a) Metabolites of vitamin D₃ and their biologic activity. *J Nutr* 99:157-167.
- Ponchon G, DeLuca HF (1969b) The role of the liver in the metabolism of vitamin D. *J Clin Invest* 48:1273-1279.
- Price PA, Baukol SA (1980) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 255:11660-11663.
- Priehl B, Pilz S, Wolf M, Tomaschitz A, Obermayer-Pietsch B, Graninger W, Pieber TR (2010) Vitamin D supplementation and regulatory T cells in apparently healthy subjects: vitamin D treatment for autoimmune diseases? *Isr Med Assoc J* 12:136-139.

- Provedini DM, Manolagas SC (1989) 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor distribution and effects in subpopulations of normal human T lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 68:774-779.
- Provedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC (1983) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Science* 221:1181-1183.
- Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, Blecha F (2002) Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect* 4:361-372.
- Raoust E, Balloy V, Garcia-Verdugo I, Touqui L, Ramphal R, Chignard M (2009) Pseudomonas aeruginosa LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS One* 4:e7259.
- Rashedi J, Asgharzadeh M, Moaddab SR, Sahebi L, Khalili M, Mazani M, Abdolalizadeh J (2014) Vitamin d receptor gene polymorphism and vitamin d plasma concentration: correlation with susceptibility to tuberculosis. *Adv Pharm Bull* 4:607-611.
- Rauschkolb EW, Davis HW, Fenimore DC, Black HS, Fabre LF, Jr. (1969) Identification of vitamin D₃ in human skin. *J Invest Dermatol* 53:289-294.
- Rigo I, McMahon L, Dhawan P, Christakos S, Yim S, Ryan LK, Diamond G (2012) Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH)₂ vitamin D₃. *Innate Immun* 18:250-257.
- Ritterhouse LL, Lu R, Shah HB, Robertson JM, Fife DA, Maecker HT, Du H, Fathman CG, Chakravarty EF, Scofield RH, Kamen DL, Guthridge JM, James JA (2014) Vitamin d deficiency in a multiethnic healthy control cohort and altered immune response in vitamin D deficient European-American healthy controls. *PLoS One* 9:e94500.
- Rolf L, Muris AH, Hupperts R, Damoiseaux J (2014) Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 1317:84-91.
- Sabetta JR, DePetrillo P, Cipriani RJ, Smardin J, Burns LA, Landry ML (2010) Serum 25-hydroxyvitamin d and the incidence of acute viral respiratory tract infections in healthy adults. *PLoS One* 5:e11088.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. *Programmed*

- cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83:865-875.
- Schauber J, Dorschner RA, Coda AB, Buchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A, Zugel U, Bikle DD, Modlin RL, Gallo RL (2007) Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 117:803-811.
- Scheidereit C (2006) I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene* 25:6685-6705.
- Schrader M, Muller KM, Carlberg C (1994) Specificity and flexibility of vitamin D signaling. Modulation of the activation of natural vitamin D response elements by thyroid hormone. *J Biol Chem* 269:5501-5504.
- Schwartz GG, Eads D, Rao A, Cramer SD, Willingham MC, Chen TC, Jamieson DP, Wang L, Burnstein KL, Holick MF, Koumenis C (2004) Pancreatic cancer cells express 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and their proliferation is inhibited by the prohormone 25-hydroxyvitamin D₃. *Carcinogenesis* 25:1015-1026.
- Segond N, Legendre B, Tahri EH, Besnard P, Jullienne A, Moukhtar MS, Garel JM (1985) Increased level of calcitonin mRNA after 1,25-dihydroxyvitamin D₃ injection in the rat. *FEBS Lett* 184:268-272.
- Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM (2000) Association of vitamin D receptor genotypes with the susceptibility to pulmonary tuberculosis in female patients & resistance in female contacts. *Indian J Med Res* 111:172-179.
- Sharma PR, Singh S, Jena M, Mishra G, Prakash R, Das PK, Bamezai RN, Tiwari PK (2011) Coding and non-coding polymorphisms in VDR gene and susceptibility to pulmonary tuberculosis in tribes, castes and Muslims of Central India. *Infect Genet Evol* 11:1456-1461.
- Shaw DN (2015) Prevention and treatment of nutritional rickets. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Silva BC, Bilezikian JP (2015) Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol* 22:41-50.
- Simoneau T, Bazzaz O, Sawicki GS, Gordon C (2014) Vitamin D status in children with cystic fibrosis. Associations with inflammation and bacterial colonization. *Ann Am Thorac Soc* 11:205-210.

- Singh N, Charan S, Sanjiv K, Huang SH, Hsiao YC, Kuo CW, Chien FC, Lee TC, Chen P (2012) Synthesis of tunable and multifunctional Ni-doped near-infrared QDs for cancer cell targeting and cellular sorting. *Bioconjug Chem* 23:421-430.
- Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE (2006) IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:6030-6037.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-964.
- Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S (1997) 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* 277:1827-1830.
- Tanaka Y, Deluca HF (1971) Bone mineral mobilization activity of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 146:574-578.
- Tanaka Y, Frank H, DeLuca HF (1972) Role of 1,25-dihydroxycholecalciferol in calcification of bone and maintenance of serum calcium concentration in the rat. *J Nutr* 102:1569-1577.
- Theofan G, Nguyen AP, Norman AW (1986) Regulation of calbindin-D28K gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is correlated to receptor occupancy. *J Biol Chem* 261:16943-16947.
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL (2001) Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291:1544-1547.
- Thompson PD, Hsieh JC, Whitfield GK, Haussler CA, Jurutka PW, Galligan MA, Tillman JB, Spindler SR, Haussler MR (1999) Vitamin D receptor displays DNA binding and transactivation as a heterodimer with the retinoid X receptor, but not with the thyroid hormone receptor. *J Cell Biochem* 75:462-480.

- Tizaoui K, Berraies A, Hamdi B, Kaabachi W, Hamzaoui K, Hamzaoui A (2014) Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with asthma risk: systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. *Lung* 192:955-965.
- Toell A, Polly P, Carlberg C (2000) All natural DR3-type vitamin D response elements show a similar functionality in vitro. *Biochem J* 352 Pt 2:301-309.
- Tsai WC, Strieter RM, Mehrad B, Newstead MW, Zeng X, Standiford TJ (2000) CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun* 68:4289-4296.
- Tsui L-C, Buchwald M (1991) Biochemical and Molecular Genetics of Cystic Fibrosis *Adv. Exp. Med. Biol.* 290:9–17
- Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC (1984) 1,25-dihydroxyvitamin D₃: a novel immunoregulatory hormone. *Science* 224:1438-1440.
- Turer CB, Lin H, Flores G (2013) Prevalence of vitamin D deficiency among overweight and obese US children. *Pediatrics* 131:e152-161.
- Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. *Cell* 65:1255-1266.
- Urashima M, Segawa T, Okazaki M, Kurihara M, Wada Y, Ida H (2010) Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr* 91:1255-1260.
- Vanstone MB, Egan ME, Zhang JH, Carpenter TO (2015) Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 50:441-446.
- Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF (2000) Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 374:334-338.
- Verway M, Bouttier M, Wang TT, Carrier M, Calderon M, An BS, Devemy E, McIntosh F, Divangahi M, Behr MA, White JH (2013) Vitamin D induces interleukin-1beta expression: paracrine macrophage epithelial signaling controls *M. tuberculosis* infection. *PLoS Pathog* 9:e1003407.
- Walters MR (1992) Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 13:719-764.

- Walters MR, Wicker DC, Riggle PC (1986) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors identified in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 18:67-72.
- Wang G (2014) Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals (Basel)* 7:545-594.
- Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH (2004) Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 173:2909-2912.
- Wang Y, Zhu J, DeLuca HF (2012) Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* 523:123-133.
- Wayse V, Yousafzai A, Mogale K, Filteau S (2004) Association of subclinical vitamin D deficiency with severe acute lower respiratory infection in Indian children under 5 y. *Eur J Clin Nutr* 58:563-567.
- White JH (2010) Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:234-238.
- Whitsett JA, Alenghat T (2015) Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 16:27-35.
- Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davidson RN (2000) Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 355:618-621.
- Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B (2011) The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 187:434-440.
- Wu S, Xia Y, Liu X, Sun J (2010) Vitamin D receptor deletion leads to reduced level of I κ B α protein through protein translation, protein-protein interaction, and post-translational modification. *Int J Biochem Cell Biol* 42:329-336.
- Xue ML, Zhu H, Thakur A, Willcox M (2002) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Cell Biol* 80:340-345.

- Yim S, Dhawan P, Ragunath C, Christakos S, Diamond G (2007) Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Cyst Fibros* 6:403-410.
- Yoshida T, Yoshida N, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T (2001) Dietary phosphorus deprivation induces 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha-hydroxylase gene expression. *Endocrinology* 142:1720-1726.
- Youssef D, Bailey B, El-Abbassi A, Vannoy M, Manning T, Moorman JP, Peiris AN (2012) Healthcare costs of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* infections in veterans: role of vitamin D deficiency. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:281-286.
- Youssef DA, Miller CW, El-Abbassi AM, Cutchins DC, Cutchins C, Grant WB, Peiris AN (2011) Antimicrobial implications of vitamin D. *Dermatoendocrinol* 3:220-229.
- Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, Goleva E (2012) Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol* 188:2127-2135.
- Zittermann A, Prokop S, Gummert JF, Borgermann J (2013) Safety issues of vitamin D supplementation. *Anticancer Agents Med Chem* 13:4-10.
- Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC (2015) New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*.

6.4 Kongressbeiträge und Publikationen

6.4.1 Kongressbeiträge

Wissenschaftliches Seminar der Mukoviszidose Institut gGmbH 2013 in Mainz, Vortragspräsentation „Vitamin D for the Treatment of CF Lung Disease“

Herbsttagung der Sektionen Infektiologie & Tuberkulose Pathophysiologie/ Aerosolmedizin und Zellbiologie in der DGP 2014 in Lübeck, Vortragspräsentation „Der systemische Mangel an Vitamin D3 führt zu keiner Beeinträchtigung des pulmonalen Immunsystems im Mausmodell“

Kongress der „European Respiratory Society“ 2015 in Amsterdam/Niederlande, Vortragspräsentation „Vitamin D3 deficiency does not result in a breach of pulmonary host defense in mice“

6.4.2 Geplante Publikationen

Castoldi A, Herr C, Niederstraßer J, Ibrahim Labouta H, Melero A, Gordon S, Schneider-Daum N, Bals R, Lehr C-M: Calcifediol-loaded liposomes for local treatment of pulmonary bacterial infections

Niederstraßer J, Herr C, Wolf L, Beisswenger C, Lehr C-M, Bals R: Vitamin D deficiency does not result in a breach of host defense in murine models of pneumonia

6.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Robert Bals für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit, der Bereitstellung des Themas, für die gute Betreuung und die Unterstützung bedanken.

Weiter bedanke ich mich bei Meike, Christopher, Bodo, Anja, Christoph, Christian und besonders bei Lisa für alle konstruktiven Diskussionen, Hilfen, Einführungen und Stressbewältigungssituationen.

Außerdem bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die netten Mittagspausen, entspannten Zusammenkünfte, jedes nette Pläuschchen und lustige Aktionen.

Auch bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Lehr für die gute Zusammenarbeit und die Herstellung der Liposomen.

Zuletzt will ich mich noch bei all meinen Freunden und meiner Familie für all die moralische Unterstützung bedanken.