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

Activin A und Follistatin bei bakteriellen Infektionen

Der Einfluss von Activin A auf Mikrogliazellen *in vitro* und der Einfluss von Follistatin auf den Verlauf einer *E. coli*-K1-Sepsis im Mausmodell

INAUGURAL-DISSERTATION

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

> vorgelegt von Catharina Dießelberg aus Oldenburg

> > Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Nau

II. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. F. Lühder

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2012

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	
1.1 Einführung	1
1.2 Immunsystem	1
1.2.1 Immunantwort des Zentralen Nervensystems (ZNS)	2
1.2.1.1 Mikroglia	3
1.2.2 Toll-like-Rezeptoren	4
1.3 Activin und Follistatin	5
1.3.1 Struktur von Activin und Follistatin	5
1.3.2 Verteilung und Wirkung von Activin A und Follistatin	7
1.3.3 Activin A und Follistatin im zentralen Nervensystem (ZNS)	
1.3.4 Activin A und Follistatin bei peripheren Entzündungsreaktionen	12
1.4. E. coli K1 und assoziierte Erkrankungen	15
1.4.1 E. coli K1	15
1.4.2 E. coli-K1-Meningitis und -Sepsis	16
1.5 Ziele der Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Materialien	
2.1.1 Chemikalien	
2.1.2 Sonstige Materialien	20
2.1.3 Geräte und Software	21
2.1.4 Herstellung von Lösungen	22
2.1.4.1 Herstellung von 70% igem Alkohol	22
2.1.4.2 Herstellung von Phosphate buffered saline (PBS)	22
2.1.4.3 Herstellung von Zellkulturmedium	23
2.1.4.4 Herstellung der Activin-A-Stammlösung	23
2.1.4.5 Herstellung der Follistatin-Stammlösung	23
2.1.4.6 Herstellung des E. coli-K1-Inokulums	23
2.1.4.7 Herstellung des Griess - Reagenz	23
2.1.4.8 Herstellung der Eosin-G-Gebrauchslösung	24
2.2 In-vitro-Versuche	24
2.2.1 Zellkulturen	

2.2.2 Zellernte25
2.2.3 Stimulation der Zellen25
2.2.4 Phagozytose27
2.2.5 TNF-α-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)30
2.2.6 Messung der NO-Freisetzung
2.2.7 Zellvitalitätstest
2.2.8 Zellkultur-Doppelfärbung mit Isolektin und Hämalaun
2.3 In-vivo-Versuche
2.3.1 Versuchstiere
2.3.2 Seiltest
2.3.3 Follistatin-Gabe35
2.3.4 Infektion und Versuchsablauf35
2.3.5 Gewebepräparation und Bearbeitung
2.3.6 Gewebefixation und Anfertigen histologischer Schnitte
2.3.7 H. EFärbung des Cerebrums37
2.4 Statistik
3. ERGEBNISSE
3.1 In-vitro-Versuche
3.1.1 Der Einfluss von Activin A auf die Phagozytose von E. coli K1 durch
Mikroglia
3.1.2 Untersuchung der Beteiligung von MyD88 am Activin-A-Signalweg44
3.1.3 Einfluss von Activin A auf die TNF-α- und NO-Ausschüttung46
3.1.4 Einfluss von Activin A auf Morphologie, Dichte und Vitalität von Mikroglia 48
3.2 In-vivo-Versuche
3.2.1 Der Einfluss von Follistatin auf die Letalität einer E. coli-K1-Sepsis im
Mausmodell
3.2.2 Gewichte und Seiltest52
3.2.3 Bakterienkonzentrationen in Milz- und Kleinhirn-Homogenat
3.2.3 Bakterienkonzentrationen in Milz- und Kleinhirn-Homogenat
3.2.3 Bakterienkonzentrationen in Milz- und Kleinhirn-Homogenat
 3.2.3 Bakterienkonzentrationen in Milz- und Kleinhirn-Homogenat
 3.2.3 Bakterienkonzentrationen in Milz- und Kleinhirn-Homogenat
 3.2.3 Bakterienkonzentrationen in Milz- und Kleinhirn-Homogenat

4.3	Activin A und Follistatin als Thera	pie bei	i Sepsis oder Meningitis?	•••••	66
5.	ZUSAMMENFASSUNG	•••••	••••••		68
6.	VERÖFFENTLICHUNGEN	IM	ZUSAMMENHANG	MIT	DER
DI	SSERTATION	•••••	••••••		
7.	LITERATURVERZEICHNIS	•••••	•••••	•••••	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Act A	Activin A
Act-RI	Activin-Rezeptor Typ I
Act-RII	Activin-Rezeptor Typ II
ARIP	Activin rezeptor-interacting protein
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsantigen)
CD40L	CD40-Ligand
CFU	Colony Forming Units
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
COX	Cyclooxygenase
CpG	Oligonucleotides containing unmethylated cytosine-guanosin motifs
cRBC	chicken red blood cells (rote Hühnerblutzellen)
CRP	C-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	fetal calf serum (Fötales Rinderserum)
FSH	follikelstimulierendes Hormon
HCl	Salzsäure
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline

IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffoxid-Synthase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPKs	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
МНС	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPP+	N-methyl-4-phenylpyridiniumion
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene
NaCl	Natriumchlorid
NaN₃	Natriumazid
NED	Naphthylethylendiamin
NFκB	Nuclear factor κB
NO	Stickstoffoxid
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate bufferd saline
Pam₃CSK₄ = P₃C	Tripalmitoyl-Cystein
Poly (I:C)	Polyinosin:Polycytidyl-Säure
PS	Penicillin + Streptomycin
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted
rhAPC	rekombinantes aktiviertes Protein C
ROS	Reactive oxygen species (Sauerstoffradikale)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TGF-β	transforming growth factor- β

Th-2	T-Helferzellen Typ 2
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrose-Faktor alpha
TRIF	TIR-domain-containing adaptor-inducing-interferon β
U	Units
ZNS	zentrales Nervensystem
-/-	Knockout

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen:

Abb. 1.: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Zusammengehörigkeit der
TGF-ß- Mitglieder Inhibin, Activin und Follistatin
Abb. 2.: Dargestellt ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von Activin A
Abb. 3.: Dargestellt ist der experimentelle Ablauf der Mikroglia-Stimulation
Abb. 4: Dargestellt ist der Ablauf des Phagozytose-Versuchs bis zum quantitativen
Ausplattieren der aus den Mikroglia freigesetzten Bakterien
Abb. 5: Quantitatives Ausplattieren der phagozytierten Bakterien
Abb. 6: Dargestellt ist der Ablauf des In-vivo-Versuches
Abb. 7: Der Einfluss von Activin A auf die Phagozytose von Mikroglia
Abb. 8: Die Grafik zeigt die Stimulation der Phagozytose durch Act A 13 ng/ml in
Kombination mit TLR-Agonisten
Abb. 9: Abgebildet ist der Einfluss von Act A 1,3 ng/ml in Kombination mit den
TLR-Agonisten P₃C, LPS oder CpG auf die Phagozytoseaktivität der Mikroglia
Abb. 10: Dargestellt ist der Einfluss von Act A 0,13 ng/ml in Kombination mit ver-
schiedenen TLR-Agonisten auf die Phagozytose von Mikroglia
Abb. 11: Dargestellt ist der Einfluss von Act A 13 µg/ml in Kombination mit ver-
schiedenen TLR-Agonisten auf die Phagozytose von Mikroglia
Abb. 12: Dargestellt ist die Phagozytose von <i>E. coli</i> K1 durch Wildtyp- bzw. MyD88-/Mikroglia, welche mit Act A 13 ng/ml oder Act A 1,3 ng/ml stimuliert wurden
Abb. 13: Die Abbildung zeigt die TNF-α-Freisetzung durch stimulierte Mikroglia- zellen.
Abb. 14: Dargestellt ist der Einfluss von Activin A 13 µg/ml auf die NO-
Freisetzung von Mikroglia in Kombination mit den TLR-Agonisten CpG 0,1 µg/ml,
P₃C 0,01 µg/ml und LPS 0,0003 µg/ml im Vergleich zu der alleinigen Stimulation
der NO-Ausschüttungen durch die TLR-Agonisten
Abb. 15: Die Abbildung zeigt die Isolektin-Hämalaun-Färbung von Mikroglia
Abb. 16: Dargestellt sind Mikrogliazellen, welche mit Isolektin und Hämalaun an-
gefärbt sind
Abb. 17: Dargestellt ist der Einfluss von Activin A 13 µg/ml auf die Zellvitalität
von Mikroglia
Abb. 18: Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen das Überleben der Mäuse in der Kon-
troll- und Follistatingruppe nach einer intraperitonealen Infektion mit E. coli K 1 2
x 10 ⁵ CFU/ml in Prozent (%)
Abb. 19: Dargestellt sind die Gewichte und die Ergebnisse im Seiltest
Abb. 20: Die Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn- und Milz-Homogenat sind als
CFU/ml (logarithmische Achse) aufgetragen
Abb. 21: Abgebildet sind H. EFärbungen des Großhirns von zwei verschiedenen

Mäusen 5	57
----------	----

Tabellen:

Tab. 1: Dargestellt sind die Gewichte der beiden Versuchsgruppen sowie die mo-	
torische Leistungsfähigkeit im Seiltest zu verschiedenen Zeitpunkten des Versu-	
ches im Überblick	53
Tab. 2: Darstallung der unterschiedlichen Effekte auf die Phagozytose aus ver-	
schiedenen Publikationen in einer Übersicht	60

1. EINLEITUNG

1.1 Einführung

Activin A wurde erstmals als reproduktives Hormon beschrieben (Ling et al. 1986a). Es reguliert die Hormonausschüttung in der Hypophyse, spielt eine Rolle in der zellulären Hämostase sowie in der Entwicklung und Differenzierung von Zellen. Des Weiteren besitzt Activin A immunmodulatorische Eigenschaften und spielt eine wichtige Rolle bei peripheren und zentralen Entzündungsreaktionen. Ihm werden sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Über seine genaue Rolle während einer inflammatorischen Reaktion ist vieles jedoch noch nicht bekannt.

Die Konzentrationen des multifunktionellen Zytokins Activin sowie die seines Bindungsproteins Follistatin sind bei bakterieller Meningitis im Liquor und bei bakterieller Sepsis im Serum erhöht. Bakterielle Meningitis und Sepsis gehen heute trotz effektiver Antibiotikatherapie und zusätzlicher Therapien immer noch mit einer hohen Letalität und bleibenden Schäden einher.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollen das Verständnis der Pathophysiologie der peripheren und zentralen Entzündungsreaktion erweitern sowie die genauere Rolle von Activin A und Follistatin bei Entzündungsreaktionen klären.

1.2 Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus zwei Komponenten: dem angeborenen und dem spezifischen Immunsystem. Das angeborene, unspezifische Immunsystem beginnt mit seiner Abwehr schon an Haut und Schleimhäuten. Es erkennt Mikroorganismen unter anderem durch das Komplementsystem. Mithilfe des Komplementsystems werden die eingedrungenen Mikroorganismen lysiert oder durch Makrophagen und neutrophile Granuloztyen phagozytiert. Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen verschiedene Proteine auf ihrer Zelloberfläche, die charakteristische Merkmale von Mikroorganismen, sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen. Zu den Proteinen auf der Zelloberfläche gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLR), Scavanger-Rezeptoren und andere (Rassow et al. 2008).

Das spezifische, adaptive Immunsystem besteht u.a. aus bestimmten Leukozyten, den Tund B-Lymphozyten. B-Lymphozyten produzieren spezifische Antikörper, welche Bakterien, bakterielle Toxine und Viren neutralisieren können, Pathogene opsonieren und das Komplementsystem aktivieren können. Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage, infizierte Zellen abzutöten. T-Helferzellen aktivieren B-Lymphozyten und Makrophagen (Rassow et al. 2008).

Das angeborene und das adaptive Immunsystem sind eng miteinander verbunden. Dendritische Zellen erkennen Pathogene mittels TLR oder Scavenger-Rezeptoren, phagozytieren die Pathogene und präsentieren die Antigene an ihrer Zelloberfläche mittels MHC-II-Molekülen. Diese Antigene werden dann im Lymphknoten den T-Zellen präsentiert. Makrophagen erkennen und phagozytieren eindringende Prokaryonten. Sie präsentieren die Antigene ebenfalls auf ihrer Zelloberfläche. T-Helferzellen erkennen diese Antigene und stimulieren die Makrophagen dazu, Sauerstoffradikale, Stickoxide sowie andere Toxine zu produzieren, um die Erreger abzutöten. Neben den Toxinen produzieren Makrophagen auch Chemokine und Zytokine (Rassow et al. 2008).

1.2.1 Immunantwort des Zentralen Nervensystems (ZNS)

Das ZNS ist durch die Blut-Hirn-Schranke von Proteinen und Zellen aus dem Blut abgeschirmt.

Makrophagen und dendritische Zellen finden sich in den Meningen und im *Plexus choroideus* (McMenamin 1999; Chinnery et al. 2010). Das Hirngewebe ist frei von dendritischen Zellen (Hart und Fabre 1981), aber aktivierte T-Zellen haben die Möglichkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Wekerle et al. 1986). Das Parenchym enthält Mikrogliazellen. Mikrogliazellen sind die intrinsischen Makrophagen des ZNS und gehören zum angeborenen Immunsystem (Aloisi 2001).

Um in das Hirnparenchym zu gelangen, müssen die Pathogene die Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke überwinden. Dazu nutzen die Bakterien Interaktionen mit verschiedenen endothelialen Rezeptoren in kleinen Blutgefäßen (Kim 2000; Join-Lambert et al. 2010; Orihuela et al. 2009; Ring et al. 1998). Durch Bakterien oder PAMPs kommt es zur Freisetzung verschiedener Zytokine wie Tumornekrose-Faktor (TNF)-α und Interleukin (IL)-1 durch Astroglia, Makrophagen und Endothelzellen. Neben Zytokinen und Chemokinen (Chao et al. 1992; Medana et al. 1997) produzieren und setzen die Abwehrzellen Stickstoffoxid (NO) (Ring et al. 2000; Winkler et al. 2001) sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (Azeh et al. 1998) frei. NO wird von phagozytosefähigen Zellen produziert und spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen Bakterien. Allerdings ist es toxisch für eukaryonte Zellen, sodass es auch die Wirtszellen schädigt und Neurone abtötet (Iliev et al. 2004). Die Zellschädigung und das Absterben der Neurone führen zu Komplikationen während einer Meningitis und zu Langzeitschäden. NO erhöht die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und erleichtert den Bakterien das Eindringen in das ZNS (Shukla et al. 1995). MMPs führen zur Inflammation, Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke und Zellschäden (Kanoh et al. 2008; Meli et al. 2003).

Die periphere und zentrale Immunreaktion wird von Zytokinen gesteuert. Zu den Zytokinen gehören unterschiedliche Proteine mit einem großen Wirkungsspektrum, die zwischen den einzelnen Zelltypen die Informationen überleiten. Bei der Pathogenese der bakteriellen Meningitis spielen vor allem die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 sowie die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β eine wichtige Rolle (Dinarello 1996; Mustafa et al. 1989, 1990; Ohga et al. 1994; Persson et al. 1997). TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 werden in der Initialphase der lokalen Entzündungsreaktion von Mikroglia, Endothelzellen und Astrozyten freigesetzt (Waage et al. 1989). TNF- α ist zum einen für die erfolgreiche Immunantwort wichtig, zum anderen induziert es aber auch die Apoptose von Hippokampusneuronen (Bogdan et al. 1997). Nach der Initialphase werden die Zytokine auch von den angelockten und eingewanderten Monozyten, Makrophagen und Leukozyten freigesetzt (Koedel et al. 2000).

1.2.1.1 Mikroglia

Mikroglia sind mesodermalen Ursprungs und gehören zu der Gruppe der Gliazellen. Man findet sie im Gehirn und im Rückenmark. Mikroglia halten die Hämostase im ZNS aufrecht, haben regenerierende Aufgaben und gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie werden auch als die Makrophagen des ZNS bezeichnet (Aloisi 2001).

Mikroglia besitzen eine Vielzahl verschiedener TLR (Bsibsi et al. 2002), welche durch PAMPs aktiviert werden. Durch die Rezeptor-Ligand-Interaktion verändern sich die ruhenden, verzweigten Zellen zu aktivierten, runderen Mikrogliazellen (Suzumura et al. 1991). Neben der Morphologie ändert sich der Immunphänotyp. Zu den Aufgaben unter inflammatorischen Bedingungen zählen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Sauerstoffradikalen (ROS) sowie eine Erhöhung der Phagozytose-Aktivität (Häusler et al. 2002; Smith ME et al. 1998). Ruhende Mikroglia sind nichtphagozytierende Zellen, aktivierte Mikroglia sind phagozytierende Zellen. Stimuliert man Mikrogliazellen mit Agonisten der TLR 1 / 2, 4 und 9, so erhöht sich die Phagozytose von Bakterien deutlich (Ribes et al. 2009; 2010b). Auf der einen Seite schützen Mikrogliazellen das Gehirn und das Rückenmark vor den Bakterien und auf der anderen Seite setzen sie zum Beispiel NO und TNF- α frei (Ebert et al. 2005). Dadurch werden die Neurone geschädigt (Iliev et al. 2004). Durch Stimulation mit Interferon (IFN)-γ geht die Produktion von neuroprotektiven Faktoren durch Mikroglia zurück (Moran et al. 2007). Neben den TLR besitzen aktivierte Mikroglia auch nucleotide-binding-oligomerization-domain-2(NOD-2)-Rezeptoren (Sterka und Marriott 2006), welche bei bakteriellen Infektionen funktionell exprimiert werden. NOD-2-Rezeptoren sind intrazelluläre Rezeptoren und erkennen ein kleines Motiv, welches in allen bakteriellen Peptidoglykanen zu finden ist. Des Weiteren besitzen stimulierte Mikrogliazellen auch Komplement-Rezeptor 3 (Ling EA et al. 1990) und MHC-II (Grenier et al. 1989) auf ihrer Zelloberfläche.

1.2.2 Toll-like-Rezeptoren

TLR spielen eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem und werden vor allem auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Des Weiteren sind TLR auf B-Zellen zu finden, welche zum adaptiven Immunsystem gehören. Es gibt im menschlichen Körper die TLR 1 bis 11, die jeweils spezifisch PAMPs erkennen (Hughes AL 1998; Levashina et al. 1999). In Mäusen werden die TLR 1 bis 13 exprimiert (Kawai und Akira 2006). TLR 2 und 4 befinden sich auf der Zelloberfläche und erkennen Bestandteile aus bakteriellen Zellwänden (Muzio und Mantovani 2000). TLR 9 wird in intrazellulären Vesikeln (z.B. Endosomen und Lysomen) exprimiert (Muzio und Mantovani 2000). TLR 2 wird durch Tripalmitoyl-Cystein (Pam₃CSK₄ = P₃C) stimuliert (Takeuchi et al. 1999). P₃C wird synthetisch hergestellt und in Versuchen als Analogon für Bestandteile von Zellwänden grampositiver Bakterien verwendet. Lipopolysaccharide (LPS) aktivieren TLR 4 (Hoshino et al. 1999; Poltorak et al. 1998), befinden sich in den Zellwänden von gram-negativen Bakterien und können einen septischen Schock verursachen. *Oligonucleotides containing un*-

methylated cytosine-guanosin motif (CpG) bindet an TLR 9 (Hemmi et al. 2000). Es ist ein synthetisches Analogon für bakterielle CG-Motive, welche zur bakteriellen DNA bei gram-negativen und gram-positiven Bakterien gehören. CpG kann einen septischen Schock (Sparwasser et al. 1997) sowie eine cerebrale Entzündung verursachen (Tauber et al. 2009). Polyinosin:Polycytidyl-Säure (Poly [I:C]) ist ein synthetischer Agonist des TLR 3 (Alexopoulou et al. 2001) und wird anstelle von viralen Bestandteilen in Experimenten eingesetzt. Poly (I:C) erhöht die Phagozytose von *E. coli* K1 durch Mikrogliazellen (Ribes et al. 2010a). TLR werden während einer Inflammation im ZNS, z.B. bei Meningitis, verstärkt exprimiert (Böttcher et al. 2003).

Stimulation der TLR führt zur Aktivierung des *Myeloid differentiation primary response gene* (MyD88)-Signalwegs oder des MyD88-unabhängigen-Signalwegs (Akira und Hoshino 2003). Der MyD88-unabhängige-Signalweg wird nur von TLR 3 und 4 aktiviert. Stimulation des TLR 3 führt zur Aktivierung des *TIR-domain-containing adaptor-inducinginterferon-* β (TRIF)-Signalwegs (Yamamoto et al. 2002a). TLR 4 aktiviert neben dem MyD88-unabhängigen-Signalweg auch den MyD88-Signalweg. Die Aktivierung des Signalmoleküls MyD88 ist wichtig für eine effektive Immunantwort während einer bakteriellen Meningitis (Koedel et al. 2004) und führt zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *Nuclear factor* (NF)- κ B und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs). Infolge der Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren kommt es zu einer Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen. Der MyD88-unabhängige-Signalweg führt ebenfalls über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und Interferon Typ 1 (Yamamoto et al. 2002b).

Infolge einer Stimulation des TLR 4 durch LPS kommt es im Mausmodell zu einer Aktivierung des MyD88-Signalwegs und anschließend zu einer Freisetzung von Activin A (Jones et al. 2007). Dies bedeutet, dass die Freisetzung von Activin A von einer Aktivierung des TLR 4 abhängt. In neueren Studien wird vermutet, dass Activin A auch durch den TRIF-Signalweg MyD88-unabhängig freigesetzt werden kann (Hedger et al. 2011).

1.3 Activin und Follistatin

1.3.1 Struktur von Activin und Follistatin

Activin gehört zu der großen transforming growth factor (TGF)-β-Superfamilie. Es besteht

aus zwei Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Activine sind Homo- oder Heterodimere der β -Untereinheit des Inhibins. Inhibin gehört genau wie Activin zur TGF- β -Superfamilie (Vale et al. 1986). Activin A ist ein Homodimer und besteht aus zwei β A-Untereinheiten (Ling N et al. 1986a), das Homodimer Activin B aus zwei β B-Untereinheiten und das Heterodimer Activin AB besteht aus je einer Untereinheit β A und β B (Mason et al. 1989) (s. Abb. 1). Die verschiedenen Formen von Activin sind alle bioaktiv.

Am meisten ist über Activin A bekannt (Robertson et al. 1992). Activin A ist immunoaktiv (Foulds et al. 1998) und wird bereits als aktives Homodimer freigesetzt (Gray und Mason 1990).

Follistatin wurde aus boviner (Robertson et al. 1987) und porciner ovarieller (Ueno et al. 1987; Ying et al. 1987) Follikelflüssigkeit isoliert. Follistatin hat eine Inhibinähnliche Wirkung und wurde zunächst als "FSH-suppressing protein" bezeichnet (Robertson et al. 1987). Follistatin gehört strukturell nicht zur TGF-β-Superfamilie, wird aber funktionell aufgrund der engen Bindung zu Activin dazu gezählt (Phillips und de Kretser 1998).

Follistatin ist ein einzelsträngiges Glykoprotein und unterliegt dem alternativen Splicing der mRNA, sodass es neben Follistatin 288 auch Follistatin 315 gibt (Phillips und de Kretser 1998). Neben dem alternativen Splicing wird das Protein durch proteolytische Spaltungen und Glykosylierungen bei der Prozessierung des Gens modifiziert (Robertson et al. 1987; Ueno et al. 1987). Im Plasma ist hauptsächlich Follistatin 315 zu finden, während Follistatin 288 an Zelloberflächen bindet (Lerch et al. 2007). Follistatin bindet neben Activin auch andere TGF-β-Superfamilie-Mitglieder wie zum Beispiel Inhibin (Shimonaka et al. 1991) und Myostatin (Stamler et al. 2008). Allerdings ist diese Bindung nicht so stark wie die Bindung zu Activin.



Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Zusammengehörigkeit der TGF-β-Mitglieder Inhibin, Activin und Follistatin.— = β-Kette;— = β-B-Kette.

1.3.2 Verteilung und Wirkung von Activin A und Follistatin

Follistatin und Activin A sind in der Regel in den gleichen Organen zu finden, allerdings nicht immer in den gleichen Zelltypen innerhalb des Organs (Roberts und Barth 1994; Al bano et al. 1994; Feijen et al. 1994). Follistatin und Activin werden auf mRNA-Ebene exprimiert (Meunier et al. 1988; Michel et al. 1990; Schneider et al. 2000; Tuuri et al. 1994) und auf Proteinebene (Kogawa et al. 1991; Wada et al. 1996) in verschiedenen Organen gebildet.

Activin A entfaltet seine Wirkung auf zellulärer Ebene durch eine spezifische Bindung an einen transmembranen Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor. Es gibt den Activin-Rezeptor-I (Act-RI) sowie den Activin-Rezeptor-II (Act-RII). Außerdem gibt es unterschiedliche Subtypen der beiden Untereinheiten des Activin-Rezeptors (IA, IB, IIA, IIB 1–4) (Mathews und Vale 1991; Attisano et al. 1992). Activin A bindet zuerst an Act-RII, eine konstitutiv aktive Kinase. Act-RII phosphoryliert anschließend Act-RI (Massagué und Weis-Garcia 1996; Inouye et al. 1991; Persson et al. 1997; Shimasaki et al. 1988). Der phosphorylierte Act-RI phosphoryliert dann wiederum die Proteine Smad 2 und Smad 3 (You und Kruse 2002; Shimizu et al. 1998). Sind Smad 2/3 aktiviert, können sie einen Komplex mit Smad 4 bilden. Dieser Komplex verstärkt die Wirkung von Activin A (Chen W et al. 2000). Smad 2/3 alleine oder der Komplex mit Smad 4 gelangen anschließend in den Nukleolus und aktivieren die Transkription der Zielgene. Neben dem Weg über die Smad-Proteine, können Act-RII und Act-RI auch die MAPKs aktivieren. Die MAPKs beeinflussen die Zellproliferation und -differenzierung, die Apoptose und intrazelluläre Signale (Cocolakis et al. 2001; Huang et al. 2006; Ogihara et al. 2003; Zhang L et al. 2005).

Follistatin 315 bindet Activin spezifisch (Nakamura et al. 1990) und neutralisiert die Wirkung von Activin, indem es die Interaktion mit Act-RII verhindert (De Winter et al. 1996). Follistatin 288 fördert den lysosomalen Abbau von Activin A (Hashimoto O et al. 1997).

Follistatin und Activin sind im menschlichen Plasma nachweisbar (Demura et al. 1992). Die Konzentration von Follistatin steigt mit dem Alter (Wakatsuki et al. 1996) und in der Schwangerschaft an (Kettel et al. 1996; Khoury et al. 1995; Macconell et al. 1996; O'Connor et al. 1999). Unter normalen physiologischen Bedingungen sind die Plasmaspiegel konstant. Follistatin liegt im Plasma fast nur an Activin gebunden vor, lediglich ein kleiner Teil ist freies Follistatin (Sakamoto et al. 1996). Die Konzentration von Activin A ist im Hoden physiologisch hoch. Dort reguliert Activin A die Spermatogenese sowie die Proliferation und Differenzierung von Sertoli-Zellen (Meehan et al. 2000).

Activin A ist ein multifaktorielles Zytokin und hat im menschlichen Körper viele verschiedene Aufgaben. Activin A stimuliert die Freisetzung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) aus gonadotropen Zellen der Hypophyse (Ling N et al. 1986a, 1986b; Vale et al. 1986), hemmt die Wachstumshormonausschüttung (Billestrup et al. 1990), die Prolaktin-Freisetzung (Kitaoka et al. 1988) und die Ausschüttung von adrenokortikotropem Hormon (Vale et al. 1986) aus verschiedenen Zellen der Hypophyse. Im Gegensatz zu Activin A hemmt Follistatin die FSH-Freisetzung aus der Hypophyse und wird auch als FSHsuppressing-Hormon bezeichnet (Robertson et al. 1987). Activin A induziert die Differenzierung in der Erythropoese und ist identisch mit dem Erythrozytendifferenzierungsfaktor (EDF) (Eto et al. 1987). Es stimuliert die multipotenten und erythrozytären Vorläuferzellen (Broxmeyer et al. 1988) sowie die Differenzierung einer humanen Promyelozyten-Zellline zu Monozyten/Makrophagen-ähnlichen Zellen (Yamada et al. 1992). Im Gegensatz dazu hemmt Activin A die Proliferation von B- und T-Zellen und induziert deren Apoptose (Hedger und Clarke 1993; Brosh et al. 1995; Hedger et al. 1989). Neben dem Einfluss auf die Hämatopoese im Knochenmark hat Activin A auch Einfluss auf die menschliche Embryogenese und Entwicklung (Tuuri et al. 1994).

Des Weiteren spielt Activin A eine wichtige Rolle in der Gefäßwand: Endothelzellen besitzen Activin-Rezeptoren, produzieren Activin A (McCarthy und Bicknell 1993, 1994) und exprimieren Follistatin-mRNA (Roberts und Barth 1994). Activin A wiederum hemmt autokrin das Wachstum von Endothelzellen (McCarthy und Bicknell 1993). Außerdem kann man in atherosklerotischen Plaques Follistatin und Activin A (Inoue et al. 1993, 1994) nachweisen. Dies lässt vermuten, dass sie wahrscheinlich an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind. Activin A ist bei einem akuten Koronar-Syndrom im Serum erhöht (Smith C et al. 2004; Smith ME et al. 1998). Nach einem Myokardinfarkt sind die Activin-A-Rezeptoren IA, IB, IIA und IIB vermehrt exprimiert (Yndestad et al. 2004). Diese Ergebnisse legen eine Beteiligung von Activin A an der Pathophysiologie von Herzerkrankungen nahe.

In der Leber hat das multifunktionelle Zytokin ebenfalls verschiedene Aufgaben. Activin A hemmt die DNA-Synthese von Hepatozyten und induziert die Apoptose von Hepatozyten (Schwall et al. 1993; Yasuda et al. 1993). Des Weiteren synthetisieren fibrotische Leberzellen Activin A (De Bleser et al. 1997). Activin A stimuliert zusammen mit TGF- β die Kollagen-Synthese von Leberzellen (Sugiyama et al. 1998), welche zu einer weiteren Fibrosierung der Leber führt. Bei Patienten mit Leberzellkarzinom (Pirisi et al. 2000; Yuen et al. 2002) oder akutem Leberversagen (Hughes RD und Evans 2003) ist die Plasma-Konzentration von Activin A erhöht. Insgesamt spielt Activin A eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Lebergewebe zur Regeneration der Hepatozyten beitragen (Kogure et al. 1995). Neben der Beteiligung an den fibrotischen Lebererkrankungen ist Activin A auch an der Pathogenese der Lungenfibrose beteiligt (Matsuse et al. 1996). Erhöhte Activin-A-Spiegel finden sich auch bei der Wundheilung und Narbenbildung von Epidermis und Dermis nach Verletzungen (Hübner et al. 1997).

In der Lunge ist die Konzentration von Activin A auch bei pulmonaler Hypertension erhöht. In einem Mausmodell sowie bei Patienten mit pulmonaler Hypertension wurden erhöhte Activin-A-Konzentrationen in den Alveolarmakrophagen, bronchialen Epithelzellen und in der glatten Muskulatur gefunden. Ebenso war die mRNA von Activin A und Follistatin im Lungengewebe bei pulmonaler Hypertension erhöht (Yndestad et al. 2009). Activin A scheint auch an dem Gewebeumbau in den Atemwegen bei Rauchern und ehemaligen Rauchern mit oder ohne chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) beteiligt zu sein: eine erhöhte Activin-A-Konzentration wurde in der klinischen Studie bei Rauchern und ehemaligen Rauchern mit COPD gefunden. Dabei korrelierte die Höhe der Activin-A-Konzentration mit der Anzahl von dendritischen Zellen in den Atemwegen (Van Pottelberge et al. 2010).

Follistatin schwächt die fibrotische Wirkung von Activin A in Leber (Patella et al. 2006), Lunge (Aoki et al. 2005) und Darm (Dohi et al. 2005) ab. Aus diesen Studien lässt sich schließen, dass Follistatin in Zukunft vielleicht als antifibrotische Therapie benutzt werden kann.

Im Knochen stimuliert Activin A die Proliferation von Chrondozyten und Osteoblasten und fördert damit den Knochenaufbau, während Follistatin den Knochenabbau unterstützt (Hashimoto M et al. 1992). Neben dem Einfluss auf die Knochen hat Follistatin auch eine Wirkung auf die Skelettmuskulatur. In einem Mausmodell einer Muskeldystrophie Typ Duchenne zeigte sich, dass Follistatin Myostatin, welches den Muskelaufbau inhibiert, antagonisiert und damit den Muskelabbau vermindert (Abe S et al. 2009).

Die oben genannten Aufgaben des multifaktoriellen Zytokins Activin sind lediglich ein kleiner Einblick in die vielfältigen Funktionen. Follistatin, der Gegenspieler und das Bindungsprotein von Activin A, hat ebenfalls viele Aufgaben und antagonisiert im Prinzip die Wirkung von Activin A. Activin A und Follistatin haben also vielfältige Aufgaben im Bereich von Proliferation, Differenzierung, Gewebeumbau und Fibrose sowie Inflammation (s.u.).

1.3.3 Activin A und Follistatin im zentralen Nervensystem (ZNS)

Die mRNA von Activin und Follistatin sowie die entsprechenden Proteine wurden im ZNS nachgewiesen (Macconell et al. 1996; Roberts et al. 1996; Schneider et al. 2000). Die mRNA von Follistatin wurde zum Beispiel im *Plexus choroideus* gefunden (Michel et al. 1996). Die Zugabe von LPS, einem Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, induziert in Mikrogliazellen die mRNA von Activin A (Sugama et al. 2007). Die höchsten Konzentrationen von Activin A wurden im Gehirn, im Rückenmark, in den Spinalganglien sowie im *Ganglion trigeminale* gefunden (Roberts et al. 1996). Neben dem Hirnparenchym ist Activin A auch im Liquor zu finden. Die Activin-A-Konzentration im Liquor ist altersabhängig, unterscheidet sich bei Männern und Frauen nicht und ist bei bakterieller Meningitis erhöht (Ebert et al. 2006). Im ZNS gibt es einen für Neuronen spezifischen Act-RII (Shoji et al. 1998).

Activin A ist, wie die folgenden Beispiele zeigen, neuroprotektiv (Schubert et al. 1990). Activin A unterstützt in einem Tiermodell der Chorea Huntington die Erholung der striatalen Neurone und schützt diese vor dem degenerativen Untergang (Hughes PE et al. 1999). Des Weiteren stärkt Activin A das Überleben von mesenzephalen dopaminergen Neuronen und schützt diese vor dem toxischen N-methyl-4-phenylpyridiniumion (MPP+), welches *in vivo* ein Parkinson-ähnliches Syndrom hervorruft (Krieglstein et al. 1995).

Activin A verstärkt die Proliferation von Mikrogliazellen und reduziert die Synthese des neurotoxischen Stickstoffoxids sowie die Freisetzung von immunmodulatorischen Zytokinen durch aktivierte Mikrogliazellen *in vitro* (Wilms et al. 2010). Im Rattenmodell wird Activin A als Folge einer Läsion des Hippokampus vermehrt exprimiert (Lai et al. 1997; Tretter et al. 1996). Activin A scheint *in vitro* einen neurotrophischen Effekt auf hippokampale Neurone zu haben (Iwahori et al. 1997). Activin A hat im Rattenmodell auch in hypoxisch-ischämischen Gehirnen eine neuroprotektive Wirkung (Wu et al. 1999).

Die Konzentration von Activin A im Liquor bei Patienten mit traumatischen Gehirnverletzungen ist in den ersten Tagen nach dem Ereignis erhöht. Die Konzentration im Plasma ist jedoch unverändert (Phillips et al. 2006). Im Liquor von Patienten mit Meningitis findet man eine erhöhte Konzentration von Activin A, die Konzentration im Blut ist unverändert (Ebert et al. 2006; Wilms et al. 2010). Wilms et al. zeigten, dass der Activin A-Spiegel im Liquor bei einer bakteriellen Meningitis wesentlich höher ist als bei einer viralen Meningitis (Wilms et al. 2010). Bei einer Streptococcus-pneumoniae-Meningitis im Kaninchenmodell sind die Konzentrationen von Activin A im Liquor ebenfalls erhöht (Michel et al. 2003b). Die Activin-Konzentration im Liquor während einer Meningitis korrelierte mit der Anzahl der apoptotischen Neurone im Gyrus dentatus (Michel et al. 2003b). Michel et al. zeigten zudem, dass Activin in Mikrogliazellen, den Abwehrzellen des ZNS, und infiltrierenden Makrophagen lokalisiert ist (Michel et al. 2003b). Neben der erhöhten Activin-A-Konzentration ist auch die Konzentration von Follistatin während einer bakteriellen Meningitis im Liquor erhöht. Der Liquor-Serum-Quotient impliziert eine Freisetzung und/ oder Produktion durch im ZNS ansässige Zellen. Anhand der Follistatin-Konzentration kann allerdings nicht zwischen viraler und bakterieller Meningitis unterschieden werden (Michel et al. 2000).

Die Stimulation mit TLR-Agonisten in einem Zellkulturversuch mit primären Maus-Mikrogliazellen bewirkt eine vermehrte Freisetzung von Activin A (Ebert et al. 2007) und lässt vermuten, dass Mikrogliazellen eine Quelle von Activin A bei Entzündungsreaktionen sind. Dies wird unterstützt durch die Ergebnisse von Wilms *et al.* Sie zeigten kürzlich, dass Mikrogliazellen Activin-A-mRNA exprimieren. Des Weiteren scheinen Mikrogliazellen nicht nur die Quelle von Activin A zu sein, sondern auch eine Zielzelle. Mikrogliazellen exprimieren nämlich sowohl Act-RI als auch Act-RII (Wilms et al. 2010). Neben den neuroprotektiven Aufgaben und der Beteiligung an inflammatorischen Ereignissen im ZNS hat Activin A auch Aufgaben als Neurotransmitter. Activin A reguliert zum Beispiel den Phänotyp von kultivierten, sympathischen Neuronen (Fann und Patterson 1994).

1.3.4 Activin A und Follistatin bei peripheren Entzündungsreaktionen

Bei einer Vielzahl von akuten und chronisch entzündlichen Erkrankungen sind Activin A und Follistatin an der Pathogenese beteiligt. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* ist die Activin- β A-mRNA in der Mukosa und Submukosa im entzündeten Gewebe stark exprimiert (Hübner et al. 1997). In einem Mausmodell verbesserte eine Therapie mit Follistatin die Symptome der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Dohi et al. 2005). Patienten mit Gicht oder rheumatoider Arthritis haben eine erhöhte Activin-A-Konzentration in der Gelenkflüssigkeit (Yu et al. 1998). In einem Tiermodell des allergischen Asthmas ist die Konzentration von Activin A in der bronchoalveolären Lavage erhöht (Hardy et al. 2006; Le et al. 2007). In einer klinischen Studie wurde außerdem gezeigt, dass CD- 4-positive T-Lymphozyten von Patienten mit allergischen Asthma eine höhere Activin- β A- und β B-mRNA-Expression haben als die Kontrollgruppe (Wohlfahrt et al. 2003). Des Weiteren haben Patienten mir allergischen Asthma eine erhöhte Activin-A-Konzentration im Serum (Karagiannidis et al. 2006).

Die Konzentrationen von Activin A und Follistatin sind bei Sepsis, verursacht durch *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylokokken*, *Neisseria meningitis* oder *Escherichia coli* (*E. coli*), im Serum erhöht (Michel et al. 1998, 2003a). Die Follistatin-Spiegel korrelieren mit dem C-reaktiven Protein (CRP), nicht aber mit der Anzahl der Leukozyten. Patienten, die an der Sepsis verstarben, hatten tendenziell höhere Follistatin-Konzentrationen im Serum. Allerdings gab es keine enge Korrelation zwischen Überleben und Höhe der Follistatin-Konzentration (Michel et al. 2003a). Follistatin wird von vaskulären Endothelzellen nach Stimulation mit LPS oder Glukokortikoiden freigesetzt (Michel et al. 1996). Vaskuläre Endothelzellen reagieren auf Entzündungen mit einer Veränderung in der Zytokin-Expression (Gerritsen und Bloor 1993; Mantovani et al. 1992), sodass die Endothelzellen eine mögliche Quelle von Follistatin während einer akuten Entzündungsreaktion sind. Follistatin wird im Schaf nach einer bilateralen Ovariektomie und nach einer scheinbaren Ovariektomie nach 10 bis 12 Stunden freigesetzt (Klein et al. 1993). Neben der Sekretion

Ovariektomie nach 10 bis 12 Stunden freigesetzt (Klein et al. 1993). Neben der Sekretion durch chirurgischen Stress, wird Follistatin auch nach einer LPS-Injektion freigesetzt (Klein et al. 1996). Activin A wird ebenfalls durch eine Stimulation durch LPS-Injektion im Tiermodell sezerniert. Die Freisetzung von Activin erfolgt bereits eine Stunde nach Injektion. Die Sekretion von Activin A erfolgt damit viel eher als die Freisetzung von Follistatin (nach 5 Stunden). Die Konzentration von Activin A steigt sogar noch eher als die Konzentration von TNF-a, eines der am schnellsten freigesetzten Zytokine, an (Jones et al. 2000). Die Sekretion von Activin nach LPS-Injektion verläuft biphasisch (Jones et al. 2004). Bei der ersten schnellen Freisetzung nach 40 Minuten wird wahrscheinlich gespeichertes Activin A freigesetzt. Die zweite Freisetzung, nach ein paar Stunden, könnte neu synthetisiertes Activin A sein. Die Synthese und Sekretion von Activin A infolge eines inflammatorischen Stimulus erfolgt über Aktivierung des TLR 4 und den MyD88-Signalweg (Jones et al. 2007). Durch eine LPS-Injektion erhöht sich die Activin-A-Freisetzung sowohl in Tieren ohne Gonaden als auch in Tieren mit Gonaden (McClure et al. 2005). Damit sind die Gonaden nicht die einzige Quelle von Activin A. Activin A kann nach inflammatorischer Stimulation durch Monozyten (Erämaa et al. 1992), Makrophagen (Ebert et al. 2007), dendritischen Zellen (Robson et al. 2008), Endothelzellen (Wilson et al. 2006), Mikrogliazellen (Ebert et al. 2007), Mastzellen (Cho et al. 2003), murine CD-4positive T-Lymphozyten aus der Milz (Ogawa et al. 2006) und Thymozyten (Licona et al. 2006) synthetisiert und freigesetzt werden. TNF- α stimuliert humane neutrophile Granulozyten, gespeichertes Activin A freizusetzen (Chen Y et al. 2011).

Hohe Konzentrationen von Follistatin nach einer LPS-Injektion scheinen die Letalität im Mausmodell zu reduzieren (Jones et al. 2007). Jones *et al.* zeigten in der gleichen Studie, dass durch eine Blockade von Activin A mittels Follistatin das Zytokin-Freisetzungsprofil moduliert wird. *In-vitro*-Versuche an dendritischen Zellen zeigten, dass Follistatin Activin A blockt (Robson et al. 2008). Dendritrische Zellen sind *in vitro* in der Lage, auf einen inflammatorischen Stimulus Activin A freizusetzen (s.o.). Eine Stimulation mit dem CD40-Liganden (CD40L) führt zu einer vermehrten Freisetzung von Activin A durch dendritische Zellen. Diese Freisetzung wird durch Zugabe von Follistatin blockiert (Robson et al. 2008). Durch Stimulation der dendritischen Zellen mittels CD40L und gleichzeitige Gabe von Follistain wird IL-6 vermehrt freigesetzt. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass durch die Blockierung von Activin A mit Follistatin die Expansion von CD8+-

T-Zellen, welche spezifisch auf virale Antigene reagieren, erhöht wird. Robson *et al.* zeigten somit zum ersten Mal, dass Activin A in dendritischen Zellen immunoregulativ ist (Robson et al. 2008).

Das multifunktionelle Zytokin Activin hat sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften. Es interagiert unter inflammatorischen Bedingungen mit anderen Zytokinen auf parakrinem und autokrinem Weg. Zu den proinflammatorischen Eigenschaften zählt die Stimulation der Produktion von TNF- α , IL-1 β , Cyclooxygenase (COX)-2 sowie die Induktion der induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase (iNOS) (Nüsing und Barsig 1999). Des Weiteren ist Activin A chemotaktisch für periphere Monozyten (Petraglia et al. 1991). Es unterdrückt außerdem die Wirkung des antiinflammtorischen Zytokins IL-10 (Wang M et al. 1999). Zu den antinflammatorischen Eigenschaften zählt, dass Activin A antagonistisch zu den proinflammatorischen Zytokinen IL-6, IL-11 und IL-1 β wirkt (Brosh et al. 1995). Activin A inhibiert nach Stimulation durch *E. coli*, CD40L oder TLR-Liganden die Sekretion der Zytokine IL-6, IL-12p70, TNF- α , IL-10 und der Chemokine IL-8, IP-10, RANTES und MCP-1 (Robson et al. 2008). Diese Studie zeigt, dass Activin A sowohl proals auch antiinflammtorische Eigenschaften hat: Antiinflammatorisch ist die reduzierte Freisetzung von TNF- α und IL-6, proinflammatorisch die verminderte Sekretion von IL-10.

Bezüglich der Wirkung von Activin A auf IL-1 β gibt es verschiedene Aussagen. In Makrophagen aus dem Knochenmark stimuliert Activin A die IL-1 β -Produktion (Nüsing und Barsig 1999); in ruhenden Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 stimuliert Activin A die Sekretion von IL-1 β , in LPS-aktivierten Makrophagen scheint Activin A eine hemmende Wirkung zu haben (Wang S et al. 2008).

In Rattenmakrophagen aus dem Knochenmark (Nüsing und Barsig 1999) und in LPSaktivierten Maus-Peritonealmakrophagen (Wang S et al. 2008) inhibiert Activin A die Freisetzung von NO. Allerdings stimuliert Activin A die NO-Freisetzung in ruhenden Makrophagen (Zhang XJ et al. 2005; Zhou et al. 2009). Es hemmt die Pinozytose von *Natural red* in LPS-aktivierten Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 (Wang S et al. 2008). Des Weiteren hemmt Activin A die Phagozytose von roten Hühnerblutzellen (cRBC) durch LPS-stimulierte Makrophagen *in vivo* und *in vitro* (Wang Y et al. 2009). Activin A reduziert die Expression von CD 14 und CD 68 auf der Oberfläche von LPS-aktivierten Makrophagen (Wang S et al. 2008). Activin A hemmt auch die Expression von TLR-4 auf Makrophagen, die Proliferation von Makophagen durch Activin A wird hingegen nicht beeinflusst (Wang S et al. 2008). Activin A scheint eine überschießende Immunantwort in späten Stadien der Entzündung zu verhindern, indem es LPS-aktivierte Maus-Peritonealmakrophagen herunterreguliert (Zhang XJ et al. 2005; Zhou et al. 2009). Activin A hat auf verschiedene ruhende Zellen also eher einen proinflammatorischen Einfluss. Auf aktivierte Zellen hingegen hat Activin A eher antiinflammatorische Wirkungen, weil es die Ausschüttung proinflammatroischer Zytokine vermindert. Der Act-RII wird auf Makrophagen in einer hohen Dichte exprimiert und die Transduktion des Rezeptors wird durch das *Activin receptor-interacting protein* (ARIP) kontrolliert (Zhang XJ et al. 2005). Die stimulierte NO-Freisetzung durch Activin A (s. S. 14) wird durch Act-RII reguliert (Zhang XJ et al. 2005).

Activin A stimuliert die Differenzierung von Makrophagen in aktivierte Makrophagen und kann durch direkte Interaktion mit ruhenden B-Zellen die Produktion von IgG und IgE verstärken (Ogawa et al. 2006). Es hemmt die Proliferation von Thymozyten, die periphere T-Zell-Aktivierung (Hedger und Clarke 1993; Hedger et al. 1989, 2000) und das Überleben und Wachstum einer Plasmozytom-Zelllinie (Brosh et al. 1995; Sternberg et al. 1995). Des Weiteren ist Activin A ein lokaler Regulator von Lymphozyten im Knochenmark (Shoham et al. 2003). Interaktionen zwischen Monozyten und aktivierten T-Zellen über den CD40-Liganden führen zu einer vermehrten Sekretion von Activin A (Abe M et al. 2002).

1.4. E. coli K1 und assoziierte Erkrankungen

1.4.1 E. coli K1

E. coli K1 ist ein gram-negatives Bakterium, welches Entzündungen im Urogenitaltrakt, Abdomen, im Weichteilgewebe sowie Pneumonie, Sepsis und Meningitis verursachen kann (Russo und Johnson 2000). Trotz adjuvanter Antibiotika-Therapie sind die Langzeitschäden und die Letaliät bei Sepsis und Meningitis durch *E. coli* K 1 hoch. Dies betrifft vor allem Kinder (z.B. Neugeborenen-Meningitis), immunsupprimierte und ältere Patienten (Russo und Johnson 2003). *E. coli* K1 besitzt eine Kapsel, welche die Phagozytose erschwert. Durch die Kapsel ist dieses Bakterium besonders pathogen. In Mikroglia-Zellkulturen wird die Phagozytose von *E. coli* K1durch TLR-Stimulation erhöht (Ribes et al. 2009).

1.4.2 E. coli-K1-Meningitis und -Sepsis

E. coli K1 ist ein häufiger Erreger der frühen neonatalen Meningitis, welche mit einer hohen Letalität und bleibenden Schäden einher geht. Intraventrikuläre Blutungen, Hirnblutungen, Hydrozephalus und Krampfanfälle zählen zu den akuten Komplikationen einer neonatalen Meningitis (Koletzko 2007) Zu den möglichen Langzeitschäden gehören Wachstumsstörungen, Entwicklungsverzögerung, Hörverlust sowie körperliche Behinderung und neurologische Spätschäden (Unhand et al. 1993). Symptome einer neonatalen Meningitis sind Störungen der Atmung, Temperaturregulation und des Muskeltonus sowie Krampfanfälle, schrilles Schreien und gespannte Fontanellen (Koletzko 2007). Therapiert wird die neonatale E. coli-Meningitis mit Ceftriaxon. Eine adjuvante Therapie mit Dexamethason wird aufgrund von fehlenden Ergebnissen bei Neugeborenen erst ab der 6. Lebenswoche empfohlen (Koletzko 2007), ist aber kein Bestandteil der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Deutsche Gesellschaft für Neurologie). Im Erwachsenenalter ist E. coli K1 vor allem bei älteren oder immunsupprimierten Patienten, nach neurochirurgischen Operationen und nach Unfällen Erreger einer Meningitis (Mofredj et al. 2000). Symptome einer Meningitis bei Erwachsenen sind Kopf-, Nacken- und Rückenschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, hohes Fieber, Photophobie, Somnolenz, epileptische Anfälle (Masuhr und Neumann 2007). Vor der Therapie mit Antibiotika wird bei Erwachsenen mit außerhalb des Krankenhauses erworbener Meningitis die Gabe von 10 mg Dexamethason in den Leitlinien empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie).

Neben der Meningitis ist *E. coli* ein häufiger Erreger sowohl einer neonatalen Sepsis als auch einer Sepsis im Erwachsenenalter. Symptome einer neonatalen Sepsis sind eine Blässe der Haut oder grau marmorierte Haut, Tachypnoe, Apnoen, Einziehungen des Thorax, abdominelle Symptome und eine Hypothermie. Der Verlauf einer frühen neonatalen Sepsis ist oft fulminant. Die Letalität ist mit 10–25% immer noch hoch und 25% der Patienten entwickeln im Verlauf eine bakterielle Meningitis (s.o.). Der Nachweis erfolgt über Blutkulturen. Neben Listerien, Enterokokken und *Staphylococcus aureus* ist *E. coli* einer der häufigsten Erreger einer frühen neonatalen Sepsis. Die *E. coli*-Sepsis wird systemisch mit Ceftriaxon therapiert (Koletzko 2007). Für die Diagnose einer Sepsis bei Erwachsenen müssen eine Bakteriämie und ein *Systemic Infammatory Response Syndrome* (SIRS) vorliegen. Für die Diagnose SIRS müssen aus folgenden Kriterien mindestens zwei erfüllt sein: Temperatur über 38°C oder unter 36°C, Tachykardie über 90/Minute, Tachypnoe mit über 20/Minute, ein Kohlenstoffdioxid-Partialdruck unter 32 mmHg, Leukozyten über 12 000/µl oder unter 3 800/µl, Stabkernige Neutrophile über 10% (Herold 2010). Eine schwere Sepsis geht mit Organfehlfunktionen einher. Die häufigsten Ursachen für eine Sepsis im Erwachsenenalter sind nosokomiale Infektionen, Pankreatitis, Schock und Polytrauma (Herold 2010). *Staphylococcus aureus* und *E. coli* sind mit ungefähr 25% auch die häufigsten Erreger einer Sepsis bei Erwachsenen (Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin). Neben der kalkulierten Antibiotikatherapie und supportiven Maßnahmen wird bei schwerer Sepsis oder septischen Schock und hohem Sterberisiko die Gabe von rekombinantem aktivierten Protein C (rhAPC) empfohlen. Des Weiteren kann die Gabe von Immunglobulinen, welche mit IgM angereichert sind, bei schwerer Sepsis oder septischen Schock erwogen werden. Die Behandlung mit Glukokortikoiden, Antithrombin oder IgG sowie die intensivierte intravenöse Insulintherapie werden bei schwerer Sepsis oder septischen Schock nicht empfohlen (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.).

1.5 Ziele der Arbeit

Trotz effektiver Gabe von Antibiotika und adjuvanter Therapien ist die Letalität bei bakterieller Meningitis und Sepsis nach wie vor hoch. Patienten, die eine bakterielle Meningitis überlebt haben, leiden häufig an Residualschäden. Das Ziel sollte also sein, die Therapien zu optimieren. Aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber Antibiotika müssen neue Therapiemöglichkeiten gefunden werden.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Konzentrationen von Activin A und Follistatin bei bakterieller Meningitis im Liquor erhöht sind. Mikroglia setzen während einer Inflammation Activin A frei, aber sie exprimieren auch Rezeptoren für Activin A und sind daher ebenfalls eine Zielzelle von Activin A. Der genaue Einfluss von Activin A auf Mikroglia ist allerdings noch unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit soll im Zellkulturmodell untersucht werden, welche Effekte Activin A auf Mikroglia während einer bakteriellen Entzündung hat. Dabei sollen insbesondere folgende Fragen geklärt werden: Verändert Activin A die Fähigkeit von Mikroglia, Pathogene zu phagozytieren? Verändert Activin A die Ausschüttung von Zytokinen und NO während einer inflammatorischen Reaktion? Verändert Activin A die Morphologie von Mikroglia oder ist es sogar zelltoxisch? Könnte die Wirkung von Activin A während einer bakteriellen Entzündung ein möglicher Angriffspunkt für neue Therapien sein? Die Konzentrationen von Activin A und Follistatin sind bei einer bakteriellen Sepsis im Serum erhöht. Es wurde bereits gezeigt, dass eine intraperitonale Gabe von Follistatin in einem Mausmodell die Letalität bei einer LPS-induzierten systemischen Inflammation reduzieren kann (Jones et al. 2007). Damit wäre die Blockierung von Activin A durch Follistatin eine mögliche Therapieoption für bakterielle systemische Infektionen in der Zukunft. Allerdings muss noch geklärt werden, ob erhöhte Follistatin-Konzentrationen auch die Letalität einer bakteriellen Infektion reduzieren können oder ob dies lediglich im LPS-Modell gelingt. Im Rahmen dieser Arbeit soll anhand des Mausmodells der *E. coli*-K1-Sepsis geklärt werden, ob eine intraperitoneale Gabe von Follistatin die Letalität einer systemischen *E. coli*-K1-Infektion reduzieren oder das Behandlungsergebnis verbessern kann und ob die Gabe von Follistatin in Zukunft eine adjuvante Therapieoption bei bakterieller Sepsis sein könnte.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien Activin A: R&D SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA Sigma, St. Louis, MO, USA Avidin-Biotin-Komplex: Diaminobenzidin (DAB): Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland Serva, Heidelberg, Deutschland DePeX: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM + GlutaMAX): GIBCO, Darmstadt, Deutschland E. coli K1: G. Zysk, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf, Deutschland ELISA-Kit (TNF-α): R&D Systems, Minneapolis, MN, USA Eosin G: Merck, Darmstadt, Deutschland Essigsäure: Merck, Darmstadt, Deutschland Ethanol: Merck, Darmstadt, Deutschland Fötales Rinderserum (FCS): GIBCO, Darmstadt, Deutschland Follistatin: R&D SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA Formalin 4%: Merck, Darmstadt. Deutschland Gentamicin: Sigma, St. Louis, MO, USA Sigma, St. Louis, MO, USA Interferon (IFN)-γ: Isolektin B₄: Sigma, St. Louis, MO, USA Isopropanol: Merck, Darmstadt, Deutschland

Lipopolysaccharid (LPS): Escherichia coli Serotyp 026:B6: Sigma, St. Louis, MO, USA Mayers Hämalaunlösung: Merck, Darmstadt, Deutschland Oligonucleotides containing unmethylated cytosine-guanosin motifs (CpG): TIB Molbiol, Berlin, Deutschland Paraplast Plus: Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland Penicillin, Streptomycin: GIBCO, Darmstadt, Deutschland Phosphate buffered saline (PBS) Dulbecco: BIOCHROM KG, Berlin, Deutschland Poly (I:C): Invivo Gen, San Diego, CA, USA Rinderserumalbumin (BSA): Merck, Darmstadt, Deutschland Salzsäure 25%: Merck, Darmstadt, Deutschland Tripalmitoyl-Cystein ($Pam_3CSK_4 = P_3C$): EMC microcollections, Tübingen, Deutschland Triton X-100: Sigma, St. Louis, MO, USA Trypanblau: Sigma, St. Louis, MO, USA WST-1 Zellproliferationslösung: Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland Xylol: Merck, Darmstadt, Deutschland 2.1.2 Sonstige Materialien 1-ml-Insulinspritzen: Braun, Melsungen, Deutschland 1,5-ml- und 2-ml-Cups:

15-ml-Röhrchen:

20-ml-Röhrchen und 50-ml-Röhrchen:

Braun, Melsungen, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

24-Well-Platte:	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
96-Well-Platte:	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Blutagar-Platten:	Mikrobiologie, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
Coverslips:	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Cryoröhrchen:	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Deckgläschen:	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einbettkassetten:	KABE Labortechnik, Nümbrecht, Deutschland
Einwegkanülen:	Braun, Melsungen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer:	LO-Laboroptik, Bad Homburg, Deutschland
Objektträger 76 x 26 mm:	Knittel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm:	Pechiney, Nothbrook, IL, USA
Petrischale:	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhau- sen, Deutschland
Pipetten und Pipettenspitzen:	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spatel:	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen:	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland

2.1.3 Geräte und Software

Brutschrank:

Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland

Einbettautomat:	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Eingießstation:	Shandon, Frankfurt, Deutschland
Elektropipette:	HIRSCHMANN Laborgeräte, Eber- stadt, Deutschland
Genios multiplate reader:	Tecan, Männerdorf, Schweiz
GraphPad Prism 4.0 Software:	GraphPad, San Diego, CA, USA
Mikroskop (Vergrößerung: 40 x):	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop 100 x mit Kamera "Color View	
Softing Imaging System":	Olympus, Hamburg, Deutschland
Rotamix:	BIOBLOCK Scientific AG, Frenken- dorf, Schweiz
Schlittenmikrotom:	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Vortexer:	Heidolph REAX top, Schwabach, Deutschland
Wasserbad:	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge:	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.4 Herstellung von Lösungen

2.1.4.1 Herstellung von 70% igem Alkohol

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

2.1.4.2 Herstellung von Phosphate buffered saline (PBS)

Es wurden 23,875 g PBS Dulbecco-Pulver mit 2,5 l destilliertem Wasser vermengt und mit Hilfe des Magnet-Rotors gut vermischt. Anschließend wurde die PBS-Lösung autoklaviert.

2.1.4.3 Herstellung von Zellkulturmedium

Für die Zellkulturen wurden 450 ml *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) mit 50 ml hitzeinaktiviertem fetalen Kalbserum (FCS) und 5 ml Penicillin und Streptomycin (= 10 000 Units[U]/ml Penicillin, 10 000 μ g/ml Streptomycin) (PS) gemischt, um das Zellwachstum zu stimulieren und Bakterienwachstum zu verhindern. Damit enthielt das Medium 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin.

Für die Phagozytose-Versuche wurden 450 ml DMEM nur mit 50 ml FCS gemischt.

2.1.4.4 Herstellung der Activin-A-Stammlösung

Activin A (rekombinantes Human/Mouse/Rat Activin A) wurde gemäß der Anleitung von R&D Systems in 962 ml DMEM + FCS + PS gelöst, sodass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 26 μ g/ml entstand. Die Lösung war bei 4°C für 4 Wochen haltbar.

2.1.4.5 Herstellung der Follistatin-Stammlösung

Um eine Stammlösung von 100 µg/ml herzustellen, wurde Follistatin (rekombinantes Human/Mouse/Rat Follistatin) in 1 ml NaCl 0,9% gelöst. Die Lösung war bei 2–8 °C für 4 Wochen haltbar. Die Herstellung der Stammlösung wurde von R&D Systems empfohlen.

2.1.4.6 Herstellung des E. coli-K1-Inokulums

50 μl der *E. coli*-K1-Bakterienkultur wurden in 5 ml sterilem NaCl 0,9% verdünnt. Je 1 ml dieser Lösung wurde auf jeweils eine Blutagarplatte gegeben. Die Agarplatten wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkulturen wurden in insgesamt 5 ml NaCl 0,9% aufgenommen. Die Bakterienkulturen wurden dann in einen Eppendorf-Cup überführt, gut gemischt und auf kleine Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden bei -80°C eingefroren. Nach zwei Tagen wurde die Bakterienkonzentration des Inokulums bestimmt.

2.1.4.7 Herstellung des Griess - Reagenz

Das Griess-Reagenz bestand aus Lösung A und B in gleichen Volumina. Lösung A bestand aus 1 g Sulfonamid, 30 ml Actetat und 70 ml Wasser. Um das Sulfonamid zu lösen, wurde es auf dem Rüttelgerät geschüttelt und kurz erhitzt. Lösung B bestand aus 0,1 g Naphthylethylendiamin (NED), 60 ml Acetat und 40 ml Wasser. Das NED löste sich von alleine auf.

2.1.4.8 Herstellung der Eosin-G-Gebrauchslösung

Die Eosin-Stammlösung bestand aus 2 g Eosin, 40 ml zweifach-destilliertem Wasser und 160 ml Ethanol 95%. Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung 1:10 mit Aqua bidestilliert verdünnt. Zu der Verdünnung wurde dann 1 Tropfen konzentrierte Essigsäure gegeben.

2.2 In-vitro-Versuche

2.2.1 Zellkulturen

Die Verwendung von Mäusen zur Gewinnung von Mikrogliazellen wurde von der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen und der Bezirksregierung Braunschweig, Niedersachsen, genehmigt.

Die Präparation der primären Mikrogliazellen, die Zellernte und die Zusammensetzung des Mediums wurden bereits beschrieben (Ebert et al. 2005) und genauso durchgeführt.

Die primären Mikroglia-Zellkulturen wurden aus 0 bis 3 Tage alten C57BL6-N-Mäusen präpariert. Die MyD88-defizienten Mikrogliazellen wurden aus C52B6J-MyD88-defizienten Mäusen gewonnen. In den Knockout (-/-)-Versuchen wurden die Wildtyp-Mikrogliazellen von C52B6J-Mäusen als Kontrolle genommen. Die C52B6J-Wildtyp-Zellen sind den Zellen vom C57BL6-Typ ähnlich.

Die Mäuse wurden durch Dekapitation getötet. Das Cranium wurde mit 70% igem Alkohol desinfiziert. Anschließend wurde das Gehirn mit Pinzetten herauspräpariert. Die Meningen wurden unter dem Mikroskop mittels Pinzetten abgelöst. Die präparierten Gehirne wurden in kaltem PBS in 50-ml-Röhrchen bei 4°C mit 1000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellsuspension mit 0,5 ml Medium (DMEM + FCS + PS) pro Gehirn vermengt. In eine T75-Kulturflasche kamen 2 Gehirne. Damit wurde in jede Zellkulturflasche, in die vorher 11 ml Medium gefüllt wurden, 1 ml der Zellsuspension gegeben. Die Zellkulturen wurden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Zweimal pro Woche wurde das Medium gewechselt. Nach 10 Tagen konnten die Mikrogliazellen zum ersten Mal geerntet werden.

2.2.2 Zellernte

Vor der Zellernte wurden die Zellen im Mikroskop angeschaut. Es sollte sich ein dichter Astrozytenrasen gebildet haben, auf dem sich Mikrogliazellen befinden. Waren die Zellen gut gewachsen, wurden die Zellkulturflaschen auf dem Rotamix 200 Mal pro Minute für 30 Minuten geschüttelt. Durch das Schütteln wurden die Mikroglia vom Boden abgelöst und somit von den Astrozyten getrennt. Die Überstände, in denen die Mikroglia schwammen, wurden mit der Elektropipette abgesaugt und in 50-ml-Röhrchen gesammelt. In die Zellkulturflaschen wurde 12 ml neues Medium gegeben. Nach 7 bis 10 Tagen Wachstum konnten die Zellen dann erneut geerntet werden. Die geernteten Zellen wurden bei 250 g und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellsuspension gut durchmischt. 10 µl der Suspension wurden mit 90 µl Trypanblau gefärbt, um die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer zu bestimmen. Nach der Zellzahlbestimmung und Verdünnung wurden die Zellen in einer 96-Well-Platte mit einer Konzentration von ungefähr 50 000 Zellen in 200-300 µl/ Well ausgesät. Die Platten wurden für 2 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂). In dieser Zeit sanken die Zellen auf den Boden der Platte ab. Anschließend wurde das Medium in der Platte zum Teil getauscht und die Zellen stimuliert (s.u.).

2.2.3 Stimulation der Zellen

Die Zellen wurden entweder mit Activin A alleine oder in Kombination mit verschiedenen TLR-Agonisten stimuliert. Die Kostimulatoren waren LPS 0,01 µg/ml (TLR-4-Agonist), P₃C 0,1 µg/ml (TLR-2-Agonist) und CpG 1 µg/ml (TLR-9-Agonist). Die Konzentration der TLR-Agonisten basierte auf der NO-Freisetzung, die sie in den Mikrogliazellen induzieren. Es wurde die niedrigste Konzentration der jeweiligen TLR-Agonisten gewählt, die eine maximale NO-Freisetzung hervorriefen (Ebert et al. 2005). Zuvor war bereits gezeigt worden, dass die gewählten Konzentrationen der TLR-Agonisten die Phagozytose von *E. coli* K1 durch Mikrogliazellen erhöhen (Ribes et al. 2009). Die optimale Activin-A-Konzentration wurde durch eine Dosis-Wirkungs-Kurve gefunden (s. S.26).

Nach 2 Stunden wurde das Medium bis auf 50 μ l entfernt und verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Activin A stimuliert. Als negative Kontrolle bei diesen Versuchen dienten unstimulierte Zellen, welche nur mit Medium behandelt wurden. Als positive Kontrolle dienten nur mit 1 μ g/ml LPS stimulierte Zellen.

Um die optimale Konzentration von Activin A zu finden, wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. In der Literatur wurden Konzentrationen von Activin A 1-20 ng/ml für invitro-Versuche verwendet. Im Liquor von Patienten mit bakterieller Meningitis wurden Activin-A-Konzentrationen von 0,14 ng/ml gefunden (Ebert et al. 2006). Es wurde eine wesentlich höhere Dosis als Beginn der Dosis-Wirkungs-Kurve gewählt (Activin A 1,3 µg/ml) und dann in Zehnerschritten verdünnt bis auf eine wesentlich niedrigere Dosis (Activin A 0,0000013 ng/ml). Aufgrund der Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Kurve (s. Abb. 2) wurden die weiteren Versuche mit Activin A 13 ng/ml (entspricht 1 nM), Activin A 1,3 ng/ml (entspricht 0,1 nM) sowie Activin A 0,13 ng/ml (entspricht 0,01 nM) durchgeführt. Des Weiteren wurde eine höhere Konzentration (Activin A 13 μ g/ml [entspricht 1 μ M]), welche in der Dosis-Wirkungs-Kurve noch nicht verwendet wurde, für die weiterführenden Experimente gewählt. Die Activin-A-Stammlösung wurde mit DMEM + FCS + PS auf 26 µg/ml, 26 ng/ml, 2,6 ng/ml und 0,26 ng/ml verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden 50 µl in die entsprechenden Wells hinzugegeben. Zu den Zellen, die nur mit TLR-Agonisten stimuliert werden sollten, wurden 50 µl Medium pro Well gegeben. Zu der negativen und positiven Kontrolle wurden ebenfalls nur 50 µl/Well neues Medium geben. Die 96-Well-Platten wurden dann über Nacht inkubiert (s. Abb. 3).



Abb. 2: Dargestellt ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von Activin A. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte plus Standardabweichung abgebildet.
Am nächsten Tag wurden 11 µl/Well Medium zu der negativen Kontrolle hinzugefügt. Die positive Kontrolle wurde mit LPS 1 µg/ml (11 µl/Well der 10 µg/ml LPS-Lösung) stimuliert. Zu den Zellen, die nur mit Activin A stimuliert werden sollten, wurde ebenfalls 11 µl/Well frisches Medium gegeben. Zu den Zellen, die mit LPS 0,01 µg/ml stimuliert wurden, wurden 11 µl/Well LPS 0,1 µg/ml gegeben. Die Zellen, die mit P₃C 0,1 µg/ml stimuliert wurden, bekamen 11 µl/Well P₃C 1 µg/ml. Zu den Zellen, die mit CpG 1 µg/ml kostimuliert wurden, wurden 11 µl/Well CpG 10 µg/ml hinzugefügt. In den Versuchen mit MyD88-defizienten Mikroglia diente Poly (I:C) (TLR 3-Agonist) 1 µg/ml als Kontrolle. Zu den Zellen, welche mit Poly (I:C) stimuliert werden sollen, wurden 11 µl/Well Poly (I:C) 10 µg/ml hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert (s. Abb. 3). Die n-Zahl in den Phagozytoseversuchen war für die TLR- Kombination mit Activin A 13 ng/ml, Activin A 1,3 ng/ml und Activin A 0,13 ng/ml in 3 zusammengewerteten Versuchen zusammen größer 11 . Bei den Kostimulationen mit Activin A 13 µg/ml war die n-Zahl in 3 zusammengewerteten Versuchen größer 8.



Abb. 3: Dargestellt ist der experimentelle Ablauf der Mikroglia-Stimulation. Zunächst wurden die Mikrogliazellen mit Activin A (Act A) in den unterschiedlichen Konzentrationen über Nacht stimuliert. Die Kontrolle und die Zellen, welche nur mit TLR-Agonisten stimuliert werden sollten, erhielten Medium. Am nächsten Tag erfolgte die Kostimulation mit den jeweiligen TLR-Agonisten. Die Kontrolle und die Zellen, welche nur mit Act A stimuliert werden sollten, erhielten Medium. Die Kontrolle und die Zellen, welche nur mit Act A stimuliert werden sollten, erhielten Medium. Die Stimulation mit den TLR-Agonisten erfolgte über 24 Stunden.

2.2.4 Phagozytose

Die Methode wurde 1985 erstmals an Tierzellen in Zellkultur durchgeführt (Isberg und Falkow 1985). Damals wurden die phagozytierten Bakterien im Mikroskop gezählt. Ein Jahrzehnt später wurde die gleiche Methode mit primären Makrophagen durchgeführt und die Bakterien durch quantitatives Ausplattieren bestimmt (Segura et al. 1998). Ribes *et al.* führten diese Methode dann bei primären Mikrogliazellen ein (Ribes et al. 2009). An der

Durchführung wurde nur die Zahl der Mikroglia von 60 000 Zellen/Well auf 50 000 Zellen/Well geändert.

Die Überstände wurden nach Stimulation in neue 96-Well-Platten überführt und bei -20° C eingefroren, um später Zytokine zu messen. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Well 250 µl E. coli K1 1 x 107 Colony Forming Units (CFU)/ml hinzugefügt. Damit kamen in einem Well 2,5 x 10⁶ Bakterien auf ungefähr 50 000 Mikrogliazellen. Für die Bakterienlösung wurde die E. coli- K1-Stammlösung 4,1 x 10¹¹ CFU/ml in zwei Schritten mit DMEM + FCS ohne Penicillin/Streptomycin verdünnt. Die 96-Well-Platte wurde mit der Bakterienlösung für 90 Minuten inkubiert. Um die tatsächlich pipettierte Bakterienanzahl zu bestimmen, wurde eine 100-fache, eine 1 000-fache, eine 10 000fache, eine 100 000-fache, eine 1 000 000-fache und eine 10 000 000-fache Verdünnung mit NaCl 0,9% auf Blutagar-Platten durchgeführt. Dieses Inokulum wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 90 Minuten wurde die Bakterienlösung entfernt und verworfen. Es wurde einmal mit PBS gewaschen. Die Gentamicin-Stammlösung 10 mg/ml wurde mit DMEM + FCS auf 100 µg/ml verdünnt. Von der verdünnten Gentamicin-Lösung wurden 250 µl/well hinzugefügt und die Platten für 60 Minuten inkubiert (s. Abb. 4). Gentamicin tötet die extrazellulär verbliebenen Bakterien ab, nicht aber die intrazellulären. Allerdings ist Gentamicin in hohen Konzentrationen zelltoxisch. Daher wurde versucht die Konzentration so niedrig wie möglich zu halten, um die Mikrogliazellen nicht zu töten. Es wurde mit einer Konzentration von Gentamicin 200 µg/ml begonnen. Dann wurde in 50 µg-Schritten abwärts getestet, ob alle extrazellulären Bakterien getötet wurden. Dazu wurden nach der Inkubation einige Gentamicin-Überstande auf Blutagar-Platten pipettiert und über Nacht inkubiert. Bei Gentamicin 50 µg/ml wuchsen noch Bakterien, sodass sich Gentamicin 100 µg/ml als die optimale Konzentration erwies. Diese wurde für die weiteren Versuche verwendet.



Abb. 4: Dargestellt ist der Ablauf des Phagozytose-Versuchs bis zum quantitativen Ausplattieren der aus den Mikroglia freigesetzten Bakterien. Zunächst wurde das Medium der stimulierten Zellen entfernt. Anschließend wurde für 90 Minuten *E. coli* K1 dazugegeben. Dann wurden die Überstände entfernt und für 60 Minuten Gentamicin 100 μ g/ml auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mit 100 μ l destilliertem Wasser lysiert, sodass die intrazellulären Bakterien freigesetzt wurden. Die Anzahl der lysierten Bakterien wurde durch quantitatives Ausplattieren bestimmt (s.u.).

Nachdem die Gentamicin-Überstände entfernt worden waren, wurde zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend mussten die Zellen lysiert werden, um die intrazellulären Bakterien freizusetzen. Dazu wurden pro Well 100 µl steriles destilliertes Wasser hinzugefügt und mit der Pipette Blasen erzeugt. Um die Bakterien zählen zu können, wurden diese in einer Verdünnungsreihe auf Blutagar-Platten auspipettiert. 10 µl wurden direkt aus dem Well ausplattiert. 10 µl aus dem Well wurden in 90 µl Nacl 0,9% verdünnt und anschließend ausplattiert (s. Abb. 5). Diese Verdünnungsreihe wurde fortgesetzt, bis die Bakterien 10 000-fach verdünnt ausplattiert waren. Die Blutagar-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend die Bakterien ausgezählt. Das Detektionslimit beim Ausplattieren lag bei 100 CFU/ml.



Abb. 5: Quantitatives Ausplattieren der phagozytierten Bakterien. Es wurden jeweils 10 μ l ausplattiert. Zunächst wurden 10 μ l direkt aus dem Well ausplattiert (nicht abgebildet). Anschließend wurden 10 μ l aus dem Well in 90 μ l NaCl 0,9% in einem Eppendorf-Cup (http://www.clker.com/clipart-1ml-eppendorf-tube-3.html) verdünnt. Davon wurden zum einen 10 μ l auf die Blutagar-Platte pipettiert und zum anderen wieder 10 μ l in 90 μ l NaCl 0,9% verdünnt. Dies wurde mindestens bis zur 10 000-fachen Verdünnung durchgeführt.

2.2.5 TNF-α-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine, Viren, Hormone, Toxine uvm. Das Verfahren wurde erstmals 1971 für Immunglobulin G durchgeführt (Engvall und Perlmann 1971). Man nutzt für ELISAs die Eigenschaft spezifischer Antikörper, Antigene, welche mit diesem Verfahren nachgewiesen werden sollen, zu binden. Das Antigen oder der Antikörper wird mit einem Enzym markiert. Dieses Enzym katalysiert eine Reaktion, welche als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens dient. Bei dieser Reaktion entsteht ein Reaktionsprodukt, welches einen Farbumschlag verursacht. Dieser Farbumschlag kann mittels Extinktionsmessung ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde mittels ELISA die Konzentration des Zytokins TNF- α , welches von den stimulierten Mikrogliazellen freigesetzt wurde, bestimmt. Das ELISA-Set für die Messung von TNF- α stammte von R&D Systems und wurde nach deren Anleitung durchgeführt. Die Überstände wurden bis zum Messen von TNF- α mittels ELISA bei –20°C eingefroren. Zum Messen wurden die Platten langsam über Nacht wieder aufgetaut.

Der Antikörper wurde laut Vorschrift angesetzt und in PBS verdünnt (7,5 ml PBS + 27,5 µl Antikörper). Pro Well wurden 50 µl aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es wurde dreimal mit Wasch-Puffer (0,5 g Tween 20 mit 1 Liter PBS verdünnt) gewaschen, bevor mit 300 µl pro Well Blockpuffer (15 ml Natriumazid [NaN₃] + 15 g Sucrose + 3 g Rinderserumalbumin [BSA] + 300 ml PBS) geblockt wurde. Anschließend wurde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für eine Stunde inkubiert. Nach dem Blocken wurde dreimal gewaschen. Anschließend wurde pro Well 50 µl der aufgetauten und verdünnten Proben hinzugefügt. Die Verdünnung der Proben erfolgte mit Reagent Diluent 1 (1 g BSA + 100 ml PBS). Neben den Proben wurde immer eine Standardreihe aufgetragen (im Kit enthalten). Nun wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Pro Well wurden 50 µl Detektionsantikörper (7,5 ml Reagent Diluent 1 + 27,5 µl Antikörper) hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde dreimal gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 50 µl HRP-Diluent (40 ml Wasch-Puffer + 40 mg BSA + 1 µl Streptavidin HRP conjugate Biosource SNN 2004) pro Well hinzugeben und die Platten 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem Inkubieren wurde dreimal waschen und 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) -Substratlösung pro Well hinzufügt. Sobald sich erste blaue Präzipitate im höchsten Standard gebildet hatten, wurde die Reaktion mittels 50 µl Stopplösung (1N Schwefelsäure) pro Well gestoppt. Es erfolgte ein Farbumschlag zu gelb. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 450 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten (Referenzfilfter 540/570nm).

2.2.6 Messung der NO-Freisetzung

Die Messung von NO wurde 2005 modifiziert (Ebert et al. 2005) und im Rahmen dieser Arbeit von Frau Dr. med. Sandra Schütze durchgeführt, die freundlicherweise ihre Daten zur Verfügung stellte. NO wird von stimulierten Mikrogliazellen freigesetzt. In diesem Versuch wurde mittels des Griess-Reagenz indirekt die NO-Freisetzung gemessen. Es wurde das stabile Nitrit, welches aus dem sehr kurzlebigen NO entsteht, ermittelt. Für die Messung der NO-Freisetzung wurde Activin A 13 μ g/ml (entspricht 1 μ M) gewählt, weil nur in dieser Konzentration ein Effekt auf die NO-Ausschüttung zu erkennen war.

Die Zellen wurden für die Messung von NO zunächst für 24 Stunden mit Activin A 13 μ g/ml stimuliert. Anschließend wurden für 48 Stunden die jeweiligen TLR-Agonisten P₃C 0,01 μ g/ml, CpG 0,1 μ g/ml und LPS 0,0003 μ /ml zusammen mit IFN- γ 100 U/ml hinzugefügt. Die verwendeten Konzentrationen der TLR-Agonisten für die NO-Messung erreichten eine 50%-ige Stimulation der NO-Freisetzung im Vergleich zu der 100%-igen Freisetzung durch LPS 1 μ g/ml. Die positive Kontrolle, welche eine maximale NO-Freisetzung erzielte, war LPS 1 μ g/ml. Die positive Kontrolle wurde nur mit LPS 1 μ g/ml plus IFN- γ behandelt. Die negative Kontrolle wurde nur mit IFN- γ behandelt. Nach der Stimulation wurden von den Überständen 50 μ l/ Well abgenommen und in eine neue 96-Well-Platte überführt. Anschließend wurden 50 μ l/ Well Griess Reagenz hinzugegeben. Eine Rotfärbung trat auf. 5 Minuten nachdem die Färbung aufgetreten war, wurde im Mikroplatten-Leser bei 570 nm die Absorption gemessen.

Als Referenz diente eine Standardreihe mit Natriumnitrit (0–100 μ M), wobei der Standard 0 μ M destilliertes Wasser war.

2.2.7 Zellvitalitätstest

Die Chemikalien, welche für diesen Test benötigt wurden, stammten von Roche Applied Science. Die Versuche wurden gemäß der Anleitung von Roche von Frau Dr. med. Sandra Schütze durchgeführt, die freundlicherweise ihre Daten für die Dissertation zur Verfügung gestellt hat.

Der Zellvitalitätstest wurde durchgeführt, um die Zellvitalität nach Zugabe von Activin A oder anderen Substanzen zu messen. Das Tetrazolium-Salz WST-1 wird von aktiven Mitochondrien in das lösliche Formazan gespalten. Aktive Mitochondrien gibt es nur in lebenden Zellen und somit kann die Vitalität bestimmt werden.

500 µl der WST-1-Zellproliferationslösung wurden mit 4,5 ml DMEM verdünnt.

Die Zellen wurden mit Activin A 13 µg/ml stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Medium behandelt worden sind. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und 100 µl verdünnte WST-Lösung/

Well hinzugegeben. 6 Wells ohne Zellen mit 100 µl WST dienten als Kontrolle. Die 96-Well-Platten wurden anschließend für 1 bis 4 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Die Absorption wurde im Mikroplatten-Leser bei 490 nm gemessen.

2.2.8 Zellkultur-Doppelfärbung mit Isolektin und Hämalaun

Die Doppelfärbung mit Isolektin und Hämalaun ist eine immunhistochemische Färbung. Während Hämalaun Kerne aller Zelltypen anfärbt, färbt Isolektin speziell Mikroglia.

In eine 24-Well-Platte wurden *Coverslips* gelegt und 50 000 Zellen/Well hinzugegeben. Die Zellen wurden für 2 Stunden inkubiert, damit sie auf den Boden der Platte absinken konnten. ³/₄ des Mediums wurden entfernt und ¹/₄ verdünnte Activin-A-Lösung hinzugegeben. Activin A wurde in den Konzentrationen 13 µg/ml, 13 ng/ml, 1,3 ng/ml, 0,13 ng/ml oder 0,0000013 ng/ml hinzugegeben und mit DMEM + FCS + PS verdünnt. Als Kontrolle diente DMEM + FCS + PS. Die Zellen wurden für 2 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Überstände wurden komplett entfernt und die Wells einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 4% igem Formalin fixiert: Pro Well wurden 500 µl Formalin 4% hinzugegeben, die Zellen für eine Stunde inkubiert, die Überstände abgenommen und PBS in die Wells gegeben. Die Platten kamen dann über Nacht bei 4°C in den Kühlschrank.

Die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Triton 1%, welches in PBS gelöst war, für 30 Minuten auf die Platten gegeben. Danach wurde dreimal mit PBS waschen und FCS 10%, welches in PBS gelöst war, für 30 Minuten dazugeben. Im nächsten Schritt wurden die *Coverslips* aus den Wells entfernt. Die Antikörper-Inkubation wurde auf Parafilm durchgeführt.

Pro *Coverslip* wurde 50 µl Isolektin B₄, welches im Verhältnis 1:40 in PBS gelöst war, für 90 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt. Dann wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und der Avidin-Biotin-Komplex für 30–40 Minuten bei Raumtemperatur dazugeben. Der Avidin-Biotin-Komplex wurde 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt: Zu 98 µl PBS wurde 1 µl Avidin und 1µl Biotin gegeben. Dieser Komplex war Peroxidase konjugiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen, wobei das 3. Mal in einer kleinen Petrischale gewaschen wurde. Für die Farbentwicklung wurde für ungefähr eine Minute Diaminobenzidin (DAB) hinzugegeben und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Gegenfärbung mit Hämalaun erfolgte nach neuropathologischer Standardmethode. Die *Coverslips* wurden mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die *Coverslips* werden mit DePeX eingedeckelt.

2.3 In-vivo-Versuche

2.3.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Göttingen befürwortet und von der Bezirksregierung Braunschweig, Niedersachsen, genehmigt.

Die Versuchstiere waren männliche, drei Monate alte C57BL6-N-Mäuse. Die Tiere wurden bei konstanten 20°C, einer relativen Luftfeuchte von 55% mit maximal 7 Tieren zusammen in einem Gemeinschaftskäfig gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden alle Mäuse individuell markiert und gewogen, der Seiltest wurde durchgeführt. Die Mäuse wurden zufällig der Kontroll- oder Interventionsgruppe zugeordnet. Insgesamt gab es 50 Mäuse (1. Versuch: 15 Mäuse, 2. Versuch: 35 Mäuse).

2.3.2 Seiltest

Der Seiltest wurde durchgeführt, um die motorischen Fähigkeiten der Versuchstiere zu testen (Ebert et al. 2010a; Wellmer et al. 2000). Das Seil war 60 cm lang und wurde 60 cm über dem Boden zwischen zwei Plattformen aufgespannt. Die Mäuse wurden mit ihren Vorderpfoten in die Mitte des Seils gehängt und sollten dann eine der beiden Plattformen erreichen. Die Zeit, die die Maus zum Erreichen der Plattform benötigte bzw. die sich die Maus am Seil halten konnte ohne herunter zu fallen, wurde gestoppt und anschließend in einen Score umgewandelt. Der niedrigste Score war Score 0, der höchste Score 20. Erreichte die Maus die Plattform in weniger als 6 Sekunden, so erhielt sie Score 0. Für weitere 6 Sekunden an dem Seil, aber erreichte keine Plattform, bekam sie Score 10. Fielen die Mäuse vor Erreichen der 60 Sekunden von dem Seil, bekamen sie für je 6 Sekunden, die sie eher als 60 Sekunden von dem Seil fielen, einen zusätzlichen Punkt.

2.3.3 Follistatin-Gabe

Die Follistatin-Gabe in der Interventionsgruppe erfolgte bezüglich des Zeitpunkts und der Konzentration wie von Jones *et al.* beschrieben (Jones et al. 2007). Im ersten Versuch bekamen sieben Mäuse eine halbe Stunde vor Infektion 10 μ g Follistatin in 100 μ l NaCl 0,9% gelöst intraperitoneal gespritzt. Im 2. Versuch waren es 17 Mäuse. Der Kontrollgruppe (1. Versuch: 8 Mäuse, 2. Versuch: 18 Mäuse) wurde eine halbe Stunde vor Infektion 100 μ l NaCl 0,9% intraperitoneal gespritzt (s. Abb. 6).

2.3.4 Infektion und Versuchsablauf

Die systemische Infektion wurde durch eine intraperitoneale Injektion von 500 μ l NaCl 0,9% mit *E. coli* K1 2 x 10⁵ CFU/ml induziert. Die Mäuse wurden nicht antibiotisch behandelt. Nach der Infektion wurde zunächst alle 12 Stunden ein Seiltest und eine Gewichtskontrolle durchgeführt. Nach 72 Stunden wurden die Kontrollen nur noch alle 24 Stunden durchgeführt. Konnte eine Maus nicht mehr laufen, wurde sie aus ethischen Gründen getötet. Nach 7 Tagen wurde der Versuch beendet und die überlebenden Mäuse getötet (s. Abb. 6).



Abb. 6: Dargestellt ist der Ablauf des *In-vivo*-Versuches. Nach der Infektion wurden die Mäuse zunächst alle 12 Stunden kontrolliert. Konnten sie nicht mehr laufen, wurden sie aus ethischen Gründen getötet. Nach 3 Tagen wurden die Mäuse nur noch alle 24 Stunden kontrolliert. 168 Stunden nach Infektion wurde der Versuch beendet und die überlebenden Tiere getötet. Das Gewebe der gestorbenen/ getöteten Mäuse wurde anschließend präpariert (s.u.). h = Stunde; p.i. = *post infektionem*; i.p. = *intraperitoneal*.

2.3.5 Gewebepräparation und Bearbeitung

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde beim Abtrennen des Kopfes versucht, möglichst viel Blut zu gewinnen. Das Blut wurde in 1,5-ml-Gefäßen gesammelt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Das Blut wurde dann bei 250 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert und das Serum anschließend in einem neuen Eppendorf-Cup bei -20°C eingefroren (Jones et al. 2007).

Das Gehirn wurde aus der Schädelkalotte herauspräperiert und die beiden Hemisphären voneinander getrennt. Die rechte Hemisphäre inklusive Cerebellum wurde in 10 ml 4% igem Formalin fixiert. Das linke Kleinhirn wurde in 500 μ l NaCl 0,9% gegeben, mit einem Homogenisator zerkleinert, geschüttelt und verdünnt auf Blutagar-Platten ausplattiert. Die Verdünnung erfolge im Verhältnis 1:10 mit NaCl 0,9% in 8 Schritten. Von jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 10 μ l auf Blutagarplatten auspipettiert. Die Agarplatten wurden über Nacht inkubiert und die Bakterienzahlen ausgezählt, um den Bakterientiter im Kleinhirn der gestorbenen Mäuse zu bestimmen. Die linke Großhirnhemisphäre wurde getrennt: das frontale Cerebrum in ein Eppendorf-Cup und das okzipitale Cerebrum kam in ein weiteres Eppendorf-Cup. Diese wurden zunächst im flüssigen Stickstoff gefroren und anschließend bei -20° C gelagert.

Die Milz wurde herauspräpariert und halbiert. Eine Milzhälfte wurde in einem leeren Eppendorf-Cup im flüssigen Stickstoff gefroren und bei -20° C gelagert. Die andere Hälfte wurde in 500 µl NaCl 0,9% zerkleinert und verdünnt auf Blutagar-Platten ausplattiert (Verdünnung s. S. 30). Die Platten wurden über Nacht inkubiert. Durch Auszählen wurde die Bakterienanzahl in der Milz ermittelt.

Das Kleinhirn- und Milz-Homogenat wurde anschließend ebenfalls bei -20°C eingefroren.

2.3.6 Gewebefixation und Anfertigen histologischer Schnitte

Die rechte Hemisphäre des Cerebrums wurde nach der Entnahme für 24 Stunden in 4% igem Formalin fixiert. Das Formalin wurde anschließend durch zweistündiges Waschen mit H₂O entfernt. Die Einbettung in Paraffinharz erfolgte vollautomatisch über 16 Stunden in einem Einbettautomaten. Die Gewebestücke wurden dazu an der Eingießstation in Gießschälchen gelegt und mit heißem Paraffin übergossen. Im nächsten Schritt wurde das mit Paraffin übergossene Gewebe zu einem Paraffinblock verarbeitet, wobei die Einbettkasset-

te den Blockträger gebildet hat. Nach dem Abkühlen des Paraffinblocks wurden mit einem Schlittenmikrotom 3 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden in 40°C warmem Wasser gestreckt und auf Objektträger übertragen.

2.3.7 H. E.-Färbung des Cerebrums

Die Hämatoxylin-Eosin (H. E.) -Färbung basiert auf dem Zusammenspiel des natürlichen Farbstoffs Hämatoxylin und des synthetischen Farbstoffs Eosin. Hämatoxylin muss in Hämalaun aufbereitet werden, um färbende Eigenschaften zu erhalten. Hämalaun färbt basophile Strukturen der Zellen (z.B. Zellkern, endoplasmatisches Retikulum) blau, während Eosin sauer ist und eosinophile Strukturen wie Zellplasmaproteine rot färbt.

Vor der H. E.-Färbung mussten die Schnitte des Cerebrums entparaffiniert und rehydriert werden. Zunächst wurden die Schnitte dreimal zehn Minuten lang mit Xylol behandelt. Anschließend wurden die Schnitte mit Ethanol 100% dreimal 3 Minuten lang bearbeitet. Danach wurden die Schnitte mit Ethanol 90% und 80% für jeweils zweimal 3 Minuten behandelt. Als Nächstes wurden die Schnitte mit Ethanol 70% und 50% jeweils einmal 3 Minuten lang bearbeitet. Zum Schluss wurden die Präparate mit Aqua dest. zweimal 3 Minuten und anschließend für 5-10 Minuten mit Hämalaun behandelt, kurz in Aqua dest. gespült und anschließend in Salzsäure (HCl)-Alkohol differenziert. Der HCl-Alkohol bestand aus 175 ml Isopropanol, 75 ml Aqua dest. und 2,5 ml Salzsäure 25%. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Eosin unter Zugabe von Eisessig gegengefärbt. Die Schnitte wurden in eine aufsteigende Alkoholreihe getaucht. Jedoch sollten die Schnitte nur ein paar Mal in die niedrig konzentrierten Alkohole getaucht werden, da Eosin mit Wasser herausgewaschen wurde. Zum Schluss wurden die Gehirnschnitte 5 Minuten lang in Ethanol 100% getaucht. Im Anschluss wurden sie dreimal 3 Minuten lang mit Xylol behandelt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckelt.

2.4 Statistik

Die statistischen Analysen sowie grafischen Darstellungen der *in-vivo-* und *in-vitro-*Versuche wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 4.0 Software erstellt.

Normalverteilte Daten wurden als Mittelwerte plus Standardabweichung dargestellt. Zwei Gruppen normalverteilter Daten wurden mit dem *Student's* t-Test verglichen. Mehrere Gruppen normalverteilter Daten wurden mittels ANOVA, gefolgt von der Bonferroni-Methode als Korrektur für multiples Testen, auf statistisch signifikante Differenzen getestet. Nicht normalverteilte Daten wurden als Mediane plus 25.-/75.-Perzentile dargestellt und mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft. Nicht normalverteilte Daten mit mehr als zwei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen. Darauf folgte der Dunn's Test als Korrektur für multiples Testen. Die Differenz zwischen zwei Kaplan-Meier-Kurven wurde mittels Logrank-Test auf statistische Signifikanz geprüft. P-Werte < 0,05 galten als signifikant. P < 0,05 ist dargestellt als *, p < 0,01 entspricht ** und p < 0,001 entspricht ***.

3. ERGEBNISSE

3.1 In-vitro-Versuche

3.1.1 Der Einfluss von Activin A auf die Phagozytose von E. coli K1 durch Mikroglia

Die mit Activin A 13 µg/ml stimulierten Mikroglia (n > 8) phagozytierten im Vergleich zu den unstimulierten Zellen nur 56,25 (27,33/ 96,00) % der Bakterien (s. Abb. 7 [A]). Diese Verminderung der Phagozytoserate war jedoch statistisch nicht signifikant (p > 0,05). Activin A 13 ng/ml (218,2 [100,8/ 272,7] %) steigerte im Vergleich zu den unstimulierten Mikroglia (99,83 [75,06/ 124,9] %) die Phagozytose von *E. coli* K1(s. Abb. 7 [B]). Die Stimulation durch Activin A 13 ng/ml war statistisch nicht signifikant (p > 0,05). Activin A 1,3 ng/ml (99,83 [55,49/ 109,1] %) sowie Activin A 0,13 ng/ml (99,83 [72,73/ 302,5] %) ohne Kostimulation von TLR-Agonisten haben die Phagozytose im Vergleich zu unstimulierten Zellen kaum beeinflusst. n war bei unstimulierten Mikroglia und bei mit Activin A 13 ng/ml 1,3 ng/ml und 0,13 ng/ml stimulierten Zellen größer als 11 pro Gruppe.



Abb. 7: Der Einfluss von Activin A auf die Phagozytose von Mikroglia. (A) Act A 13 µg/ml ohne Kostimulation durch TLR-Agonisten hatte einen inhibitorischen, aber statistisch nicht signifikanten Einfluss auf die Phagozytose im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. (B) Act A 13 ng/ml stimulierte die Phagozytose von *E. coli* K1 statistisch nicht signifikant (p > 0,05) im Vergleich zu unstimulierten Mikroglia. Act A 1,3 ng/ml und 0,13 ng/ml hatten kaum einen Effekt auf die Phagozytose im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Ergebnisse sind in Relation zu den unstimulierten Zellen (der Kontrolle) in % angegeben. Die Daten sind als Mediane und 25.-/75.-Perzentile dargestellt. Die n-Zahl bei Act A 13 µg/ml war n > 8. Bei den niedrigeren Activin A-Konzentrationen war n > 11.

Eine Prästimulation mit Activin A 13 ng/ml (s. Abb. 8), 1,3 ng/ml (s. Abb. 9) und 0,13 ng/ml (s. Abb. 10) und Kombination mit den TLR-Agonisten P₃C, LPS oder CpG erhöhte die Phagozytose von *E. coli* K1 durch Mikroglia.

Die Kostimulation von Activin A 13 ng/ml mit P₃C 0,1 µg/ml (1 480 [490,9/ 1 815] %) erhöhte die Phagozytose von *E. coli* K 1 im Vergleich zur alleinigen Stimulation von P₃C (209,9 [109,3/ 383,3] %) um das 7-fache. Die Differenz war statistisch signifikant (p < 0,001). In Kombination mit LPS 0,01 µg/ml erhöhte Activin A 13 ng/ml (693,6 [363,6/ 1 734] %) die Phagozytose im Vergleich zu LPS 0,01 µg/ml (219 [99,83/ 466,7] %) um das 3-fache (p < 0,01). Die Kombination von Activin A 13 ng/ml mit CpG 1 µg/ml (548,5 [300,7/ 1 075] %) hatte ebenfalls einen stimulierenden Effekt auf die Phagozytose von *E. coli* K1 im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit CpG 1 µg/ml (170,2 [100,3/ 407,3] %) (p < 0,05) (s. Abb. 8). n war pro Gruppe jeweils größer als 11.



Abb. 8: Die Grafik zeigt die Stimulation der Phagozytose durch Act A 13 ng/ml in Kombination mit TLR-Agonisten. Act A 13 ng/ml + P₃C 0,1 µg/ml stimulierte im Vergleich zu P₃C 0,1 µg/ml die Phagozytose signifikant (p < 0,001). Gleiches galt für Act A 13 ng/ml + LPS 0,01 µg/ml im Vergleich zu LPS 0,01 µg/ml (p < 0,01) und Act A 13 ng/ml + CpG 1µg/ml im Vergleich zu CpG 1 µg/ml (p < 0,05). Die Ergebnisse sind in Relation zu den unstimulierten Zellen (nicht abgebildet) in % abgebildet. Die Daten sind als Median plus 25.-/75.-Perzentile dargestellt. n war jeweils größer als 11. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

Activin A 1,3 ng/ml kombiniert mit P₃C 0,1 µg/ml stimulierte die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen im Vergleich zu P₃C alleine statistisch signifikant (p < 0,05). Activin A 1,3 ng/ml plus P₃C 0,1 µg/ml (927,3 [403,3/ 1503] %) erhöhte die Phagozytose im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch P₃C um das 4-fache. Die Kostimualtion von Activin A 1,3 ng/ml mit LPS 0,01 µg/ml (693,6 [302,5/ 1734] %) erhöhte die Phagozytose im Vergleich zu LPS 0,01 µg/ml um das 3-fache. Der Unterschied war statistisch signifikant (p < 0,05). Die Kombination von CpG 1 µg/ml mit Activin A 1,3 ng/ml (436 [252,1/ 655,6] %) hatte im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch CpG 1 µg/ml einen stimulierenden, aber statistisch nicht signifikanten (p > 0,05) Effekt auf die Phagozytose der Mikrogliazellen. n war pro Gruppe jeweils größer als 11.



Abb. 9: Abgebildet ist der Einfluss von Act A 1,3 ng/ml in Kombination mit den TLR-Agonisten P₃C, LPS oder CpG auf die Phagozytoseaktivität der Mikroglia. Act A 1,3 ng/ml + P₃C 0,1 µg/ml erhöhte die Phagozytose im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch P₃C statistisch signifikant (p < 0,05). Die Kombination von Act A 1,3 ng/ml und LPS 0,01 µg/ml stimulierte die Phagozytose im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch LPS statistisch signifikant (p < 0,05). Die Erhöhung der Phagozytoseaktivität von Act A 1,3 ng/ml + CpG 1µg/ml war statistisch nicht signifikant. Die Daten sind im Vergleich zu den unstimulierten Zellen in % dargestellt. Es sind Mediane und 25.-/75.-Perzentile dargestellt. n war jeweils größer als 11. * = p < 0,05.

Activin A in einer Konzentration von 0,13 ng/ml wurde im Durchschnitt bei Patienten mit Meningitis im Liquor gefunden (Ebert et al. 2006) und erhöhte in Kombination mit P₃C 0,1 µg/ml (403,4 [345,5/ 705,9] %) die Phagozytose im Vergleich zu P₃C 0,1 µg/ml um das 2fache. Dieser Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant (p > 0,05). Activin A 0,13 ng/ml in Kombination mit LPS 0,01 µg/ml wirkte im Vergleich zu LPS 0,01 µg/ml Phagozytose induzierend. Die Phagozytose wurde durch die Stimulation mit Activin A 0,13 ng/ml und LPS 0,01 (705,9 [363,9/ 1 387] %) um das 3-fache im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch LPS 0,01 µg/ml erhöht. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (p < 0,01). Activin A 0,13 ng/ml plus CpG 1µg/ml (453,1 [252,1/ 684,4] %) erhöhte die Phagozytose von *E. coli* K1 durch Mikroglia um das 2,6-fache im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch CpG. Der Effekt war statistisch nicht signifikant (p > 0,05). n war pro Gruppe jeweils größer als 11.



Abb. 10: Dargestellt ist der Einfluss von Act A 0,13 ng/ml in Kombination mit verschiedenen TLR-Agonisten auf die Phagozytose von Mikroglia. Act A 0,13 ng/ml + P₃C 0,1 µg/ml hatte einen stimulatorischen, statistisch nicht signifikanten Einfluss auf die Phagozytose im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch P₃C (p > 0,05). Act A 0,13 ng/ml + LPS 0,01 µg/ml erhöhte im Vergleich zu LPS 0,01 µg/ml (p < 0,01) die Phagozytose von Mikroglia statistisch signifikant. Act 0,13 ng/ml + CpG 1 µg/ml erhöhte die Phagozytose durch Mikroglia im Vergleich zur Stimulation durch CpG 1µg/ml statistisch nicht signifikant. n war größer als 11. Die Daten sind in Prozent zu den unstimulierten Zellen angegeben. Die Darstellung zeigt Mediane plus 25.-/75.-Perzentile. ** = p < 0,01.

Die Kostimulation von Activin A 13 µg/ml mit den TLR-Agonisten P₃C 0,1 µg/ml (374 [218,9/ 583,4] %) beeinflusste die Phagozytose im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch P₃C (412,6 [243,8/ 672,7] %) kaum (s. Abb. 11). Kombinierte man Activin A 13 µg/ml mit LPS 0,01 µg/ml (275,7 [203,1/ 924] %), wurde die Phagozytose durch Mikroglia im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch LPS (493,2 [287,8/ 1 307] %) inhibiert. Die Verminderung der Phagozytoserate war jedoch statistisch nicht signifikant (p > 0,05). Die Kombination von Activin A 13 µg/ml und CpG 1 µg/ml (750 [182,4/ 914,2] %) hingegen stimulierte die Phagozytose im Vergleich zur alleinigen Phagozytoseaktivierung durch CpG (493,2 [182,4/ 914,2] %) nur geringfügig. Dieser stimulatorische Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant (p > 0,05). Die Kombinationen von Activin A 13 µg/ml mit den TLR-Agonisten P₃C, LPS oder CpG hatten also keinen eindeutigen Effekt im Vergleich zur alleinigen Stimulation der Phagozytose von Mikroglia durch die verschiedenen TLR-Agonisten. n war pro Gruppe 6.



Abb. 11: Dargestellt ist der Einfluss von Act A 13 µg/ml in Kombination mit verschiedenen TLR-Agonisten auf die Phagozytose von Mikroglia. Act A 13 µg/ml hatte in Kombination mit den TLR-Agonisten P₃C 0,1 µg/ml, LPS 0,01 µg/ml oder CpG 1µg/ml im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch die TLR-Agonisten keinen eindeutigen Effekt auf die Phagozytose von Mikroglia. Die Ergebnisse sind im Vergleich zu den unstimulierten Zellen in % dargestellt und als Mediane plus 25.-/75.-Perzentile abgebildet. n war 6.

Zusammenfassend erhöhte die Kostimulation von Activin A mit verschiedenen TLR-Agonisten die Phagozytose von *E. coli* K1 durch Mikrogliazellen in verschiedenen Konzentrationen (0,13 ng/ml bis 13 ng/ml). Auch die bei Meningitis-Patienten gefundene mittlere Konzentration im Liquor (0,13 ng/ml) erhöhte die Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen. Nur die sehr hohe Konzentration von Activin A 13 µg/ml in Kombination mit den TLR-Agonisten hatte keinen eindeutigen Effekt auf die Phagozytose von Mikroglia im Vergleich zu der alleinigen Wirkung der TLR-Agonisten.

3.1.2 Untersuchung der Beteiligung von MyD88 am Activin-A-Signalweg

Activin A 13 ng/ml hatte von allen verwendeten Activin-A-Konzentrationen den größten Einfluss auf die Phagozytose von E. coli K 1 durch Mikroglia (s. S. 39). In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Activin A die Phagozytose während einer Inflammation über MyD88 erhöht. Stimulierte man MyD88-defiziente (-/-) Mikroglia mit Activin A 13 ng/ml, so änderte sich die Phagozytoserate im Vergleich zu mit Activin A 13 ng/ml stimulierten Wildtypmikroglia kaum. Im Vergleich zu unstimulierten Wildtypzellen (101 [59,09/145,5] %) phagozytierten die mit Activin A 13 ng/ml stimulierten Wildtypzellen 181 (105,1/235,4) % der Bakterien. Verglichen mit unstimulierten MyD88-/- -Zellen (101 [36,36/ 218,2] %) haben mit Activin A 13 ng/ml stimulierte MyD88-/- -Zellen 151,5 (109,1/218,2) % der Bakterien phagozytiert. Sowohl die Phagozytose von unstimulierten Wildtypmikroglia verglichen mit unstimulierten MyD88-/- - Mikroglia (p > 0.05) als auch die Phagozytose von mit Activin A 13 ng/ml stimulierten Wildtypzellen verglichen mit Activin A stimulierten MyD88-/- - Zellen (p > 0.05) unterschieden sich nicht. Die Phagozytoserate von mit Activin A 1,3 ng/ml stimulierten Wildtypzellen (101 [54,55/ 155,6] %) unterschied sich ebenfalls nicht von der Phagozytoserate von mit Activin A 1,3 ng/ml stimulierten MyD88-/- - Mikroglia (101 [36,36/ 252,5] %) (p > 0,05).

Als Kontrolle diente bei diesen Experimenten P₃C 0,1 µg/ml. P₃C ist ein TLR 2-Agonist und vermittelt seine Wirkung MyD88-abhängig. Die Phagozytose von P₃C stimulierten Wildtypzellen betrug im Schnitt 505,1 (272,7/ 2 273) % im Vergleich zu unstimulierten Zellen vom Wildtyp. Die mit P₃C 0,1 µg/ml stimulierten MyD88-/- -Zellen phagozytierten 106,1 (50,51/181,8) % der Bakterien im Vergleich zu unstimulierten Wildtypmikroglia. Es war ein deutlicher und statistisch signifikanter Unterschied (p < 0,01) zwischen den verschiedenen Zelltypen zu sehen. Dies zeigte, dass P₃C MyD88-abhängig arbeitet. Eine weitere Kontrolle neben P₃C war Poly (I:C), welches nicht den MyD88-Signalweg benutzt. Die Phagozytose von Bakterien nach Stimulation mit Poly (I:C) unterschied sich zwischen Wildtypzellen (252,1 [119,2/ 505,1] %) und MyD88-/- - Mikroglia (202 [109,1/ 505,1] %) nicht (p > 0,05). Die beiden Kontrollen wurden durchgeführt, um zu bestätigen, dass es sich bei den benutzen Zellen um MyD88 -/- -Zellen handelt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Activin A die Erhöhung der Phagozytoserate nicht über den MyD88-Signalweg erzielte (s. Abb. 12). n war in den Gruppen der Wildtypmikroglia jeweils größer als 9 und in den Gruppen der defizienten Mikroglia jeweils gleich 11.



Abb. 12: Dargestellt ist die Phagozytose von *E. coli* K1 durch Wildtyp- bzw. MyD88-/- -Mikroglia, welche mit Act A 13 ng/ml oder Act A 1,3 ng/ml stimuliert wurden. Die Phagozytoseaktivität von mit Act A bzw. Poly (I:C) stimulierter Mikroglia unterschied sich zwischen Wildtyp- und Knockoutzellen nicht signifikant (p > 0,05). Als Kontrollen dienten Poly (I:C) 1 µg/ml und P₃C 0,1 µg/ml. Der Unterschied in der Phagozytoseaktivität zwischen mit P₃C stimulierten Wildtyp- und Knockoutmikroglia war statistisch signifikant (p < 0,01). Die Ergebnisse sind im Vergleich zu den unstimulierten Wildtypzellen in % dargestellt. Die Daten sind als Mediane und 25./.75. Perzentile abgebildet. Die n-Zahl betrug bei den Wildtypzellen in den Kontrollen 9, bei den Activin A-stimulierten Zellen 10. Die n-Zahl bei den Knockoutzellen war jeweils 11. *** = p < 0,01.

3.1.3 Einfluss von Activin A auf die TNF-α- und NO-Ausschüttung

Activin A beeinflusste die TNF-α-Ausschüttung der Mikrogliazellen kaum (s. Abb. 13). Im Vergleich zur Stimulation der TNF-α-Sekretion durch die jeweiligen TLR-Agonisten, hemmte die Kombination von Activin A 13 µg/ml mit den TLR-Agonisten (n > 6 pro Gruppe) die Ausschüttung. Die Verminderung der TNF-α-Ausschüttung war am stärksten ausgeprägt bei LPS 0,01 µg/ml plus Activin A 13 µg/ml (3 947 +/- 3 443 %) im Vergleich zur LPS-stimulierten Freisetzung von TNF-α (7 505 +/- 3 315 %), aber statistisch nicht signifikant (p > 0,05). Die Kombinationen Activin A 13 µg/ml plus P₃C 0,1 µg/ml (4 770 +/- 5 134 %) und Activin A 13 µg/ml plus CpG 1 µg/ml (4 623 +/- 3 329 %) hemmten die TNF-α-Sekretion im Vergleich zur Stimulation durch P₃C 0,1 µg/ml (4 798 +/- 4 386 %) bzw. CpG 1 µg/ml (5 246 +/- 4 207 %) kaum, und der Unterschied war statistisch nicht signifikant (p > 0,05). Dagegen hatte Activin A 13 ng/ml kombiniert mit den TLR-Agonisten (n > 11 pro Gruppe), im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch TLR-Agonisten kaum Einfluss (p > 0,05) auf die TNF-α-Ausschüttung (Activin A 13 ng/ml + P₃C 0,1µg/ml: 5 443 +/- 4 606 %; Activin A 13 ng/ml + LPS 0,01 µg/ml: 8 298 +/- 2 426 %; Activin A 13 ng/ml + CpG 1 µg/ml: 5 821 +/- 3 948 %).



Abb. 13: Die Abbildung zeigt die TNF- α -Freisetzung durch stimulierte Mikrogliazellen. Act A 0,13 µg/ml bzw. 13 ng/ml hatten keinen signifikanten Effekt auf die Zytokin-Ausschüttung im Vergleich zur Stimulation der TNF- α -Sekretion durch die TLR-Agonisten. LPS 1 µg/ml diente als positive Kontrolle. Die Ergebnisse sind im Vergleich zu der TNF- α -Freisetzung von unstimulierten Zellen in % angegeben. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte plus Standardabweichung. n war bei den Kombinationen mit Act A 13 µg/ml > 6 und mit Act A 13 ng/ml > 11.

Mikroglia setzen durch inflammatorische Stimuli NO frei. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen mit Activin A 13 µg/ml vorstimuliert und anschließend die TLR-Agonisten P₃C 0,01 µg/ml, LPS 0,0003 µg/ml und CpG 0,1 µg/ml in Anwesenheit von IFN- γ hinzugefügt (s. Abb. 14). Als positive Kontrolle diente LPS 1µg/ml ohne Kostimulation mit Activin A. In dieser Konzentration stimulierte LPS die NO-Ausschüttung durch Mikroglia maximal. Als negative Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, welche nur mit IFN- γ behandelt wurden. Activin A 13 µg/ml (n = 9) veränderte die NO-Auschüttung im Vergleich zu der negativen Kontrolle nicht. In Kombinationen mit den TLR-Agonisten (n = 9 pro Gruppe) erhöhte Activin A jedoch die NO-Freisetzung im Vergleich zur alleinigen NO-Ausschüttung signifkant. So erhöhte Activin A 13 µg/ml plus P₃C 0,01 µg/ml (76,48 +/- 5,58 %) die NO-Freisetzung im Vergleich zu P₃C alleine (60,16 +/- 4,542 %) signifikant (p < 0,001). Activin A 13 µg/ml in Kombination mit LPS 0,0003 µg/ml (64,15 +/- 11,07 %) erhöhte auch die NO-Ausschüttung im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch LPS 0,0003 µg/ml (50,6 +/- 4,542 %) statistisch signifikant (p < 0,001). Eine signifikante Erhöhung der NO-Freisetzung durch Mikroglia wurde auch durch die Kombination von Activin A 13 µg/ml und CpG 0,1 µg/ml (57,17 +/- 8,901 %) im Vergleich zu CpG 0,1 µg/ml (44,48 +/- 4,144 %) erreicht (p < 0,001). Activin A 13 µg/ml erhöhte also in Kombination mit verschiedenen TLR-Agonisten die NO-Freisetzung durch Mikroglia.



Abb. 14: Dargestellt ist der Einfluss von Activin A 13 µg/ml auf die NO-Freisetzung von Mikroglia in Kombination mit den TLR-Agonisten CpG 0,1 µg/ml, P₃C 0,01 µg/ml und LPS 0,0003 µg/ml im Vergleich zu der alleinigen Stimulation der NO-Ausschüttungen durch die TLR-Agonisten. LPS 1 µg/ml diente als positive Kontrolle der Versuche und erreicht eine maximale Ausschüttung von NO. Die Daten sind in % zur maximalen NO-Freisetzung von LPS 1 µg/ml dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung. n = 9. *** = p < 0,001).

3.1.4 Einfluss von Activin A auf Morphologie, Dichte und Vitalität von Mikroglia

Um den Einfluss von Activin A auf die Morphologie, Dichte und Vitalität der Mikrogliazellen zu untersuchen, wurde nach Behandlung mit Activin die Zellkulturdoppelfärbung mit Isolektin und Hämalaun durchgeführt (s. Abb. 15 und 16).



Abb. 15: Die Abbildung zeigt die Isolektin-Hämalaun-Färbung von Mikroglia. (A) zeigt unstimulierte Mikrogliazellen. Sie sind zu erkennen an ihren schmalen Zellkörpern mit langen Fortsätzen. In (B) sind mit Activin A 13 ng/ml stimulierte Mikrogliazellen abgebildet. Die aktivierten Mikroglia haben eher rundere Zellkörper und plumpe Fortsätze. Die Bilder sind bei einer 60-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Unstimulierte Mikrogliazellen haben schmale Zellkörper und lange, verzweigte Fortsätze (s. Abb. 15 [A]). Stimulierte und damit aktive Mikrogliazellen haben runde Zellkörper und plumpe, kürzere Fortsätze (Suzumura et al. 1991). Die Zugabe von Activin A 13 ng/ml führte bei Mikrogliazellen zur morphologischen Aktivierung (s. Abb. 15 [B]). Es gab keine Hinweise auf Schädigung der Zellen durch Activin A 13 ng/ml. Activin A 13 ng/ml schien somit nicht zelltoxisch zu sein. Ein weiterer Hinweis für Zelltoxizität ist die Dichte der Zellen. Diese wurde weder durch Activin A 1,3 ng/ml (nicht abgebildet) noch durch hohe Konzentrationen (13 μ g/ml) beeinflusst (s. Abb. 16).



Abb. 16: Dargestellt sind Mikrogliazellen, welche mit Isolektin und Hämalaun angefärbt sind. (A) zeigt unstimulierte Zellen in einer 20-fachen Vergrößerung. Im Vergleich dazu sind in (B) mit Activin A 13 μg/ml stimulierte Mikroglia abgebildet.

Ubereinstimmend mit den Ergebnissen der histologischen Färbungen veränderte Activin A 13 µg/ml die Zellvitalität von Mikroglia im Vergleich zu unbehandelten, unstimulierten Zellen im Zellvitalitätstest WST nicht (n = 9 pro Gruppe) (s. Abb. 17). Activin A 13 µg/ml (96,87 +/- 11,48 % der unstimulierten Zellen) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität von Mikroglia im Vergleich zu unstimulierten Mikrogliazellen (100 +/-11,01 %) (p > 0,05). Das bedeutet, dass die höchste verwendete Konzentration von Activin A in dieser Arbeit keinen zelltoxischen Effekt hatte.



Abb. 17: Dargestellt ist der Einfluss von Activin A 13 μ g/ml auf die Zellvitalität von Mikroglia. Act A 13 μ g/ml hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität von Mikroglia im Vergleich zu unstimulierten Zellen, der Kontolle (p > 0,05). Die Ergebnisse sind in % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. n war 9.

3.2 In-vivo-Versuche

3.2.1 Der Einfluss von Follistatin auf die Letalität einer *E. coli*-K1-Sepsis im Mausmodell

Die Mäuse, welche vor der Infektion Follistatin injiziert bekommen hatten (n = 24), zeigten keine Veränderung in der Überlebensrate der systemischen Infektion mit *E. coli* K1 im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 26) (s. Abb. 18). In beiden Gruppen starben jeweils 11 Mäuse. Die intraperitoneale Gabe von Follistatin beeinflusste den Verlauf und Ausgang der Infektion nicht. Die mit Follistatin behandelten Mäuse zeigten weder einen signifikanten Überlebensvorteil noch eine erhöhte Letalität (p = 0,7065 [Logrank-Test]).

Die Sterblichkeit war zwischen 36 und 48 Stunden nach der Infektion am höchsten. 77 Stunden nach Infektion starb keine Maus mehr. Die mit Follistatin behandelten Mäuse und die Kontrollmäuse unterschieden sich auch hinsichtlich des Todeszeitpunktes nicht. Die Kaplan-Meier-Kurven waren nahezu deckungsgleich (s. Abb. 18).



Abb. 18: Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen das Überleben der Mäuse in der Kontroll- und Follistatingruppe nach einer intraperitonealen Infektion mit *E. coli* K 1 2 x 10 ⁵ CFU/ml in **Prozent (%).** Das Überleben bzw. die Letalität unterschieden sich zwischen beiden Gruppen nicht (Logrank-Test p = 0,7065). In der Follistatingruppe war n = 24, in der Kontrollgruppe war n = 26. p.i. = *post infectionem*.

3.2.2 Gewichte und Seiltest

Das Ausgangsgewicht in der Kontrollgruppe betrug 26,34 +/- 2,163 g und in der Interventionsgruppe 26,11 +/- 2,5 g. Der Gewichtsunterschied war statistisch nicht signifikant (p = 0,7305). 24 Stunden nach der Infektion war bereits eine Gewichtsabnahme zu erkennen (s. Abb. 19 [A]; s. Tab. 1). Zu diesem Zeitpunkt unterschieden sich die Gewichte zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nicht (p = 0,5456). Die Mäuse in der Kontrollgruppe wogen nach 24 Stunden 24,6 +/- 2,647 g und die mit Follistatin behandelten Mäuse 24,18 +/- 2,195 g. Die Gewichtsabnahme zeigte, dass die Infektion erfolgreich war. Zum Zeitpunkt der maximalen Gewichtsabnahme nach 48 Stunden nach Infektion wogen die Kontroll-mäuse 24,71 +/- 2,846 g und die mit Follistatin behandelten Mäuse 24,28 +/- 2,422 g. 150 Stunden nach der Infektion hatte sich das Gewicht der überlebenden Mäuse fast wieder normalisiert. Die Gewichtszunahme zeigte, dass diese Mäuse die systemische Infektion überstanden hatten. Nach 168 Stunden wogen die Mäuse aus der Kontrollgruppe 25,86 +/- 2,537 g und die mit Follistatin behandelten Mäuse 25,87 +/- 2,239 g. Das Gewicht war in den beiden Gruppen gleich (p = 0,9938).

Mit dem Seiltest wurde die Motorik der Versuchstiere getestet (s. Abb. 19 [B]; s. Tab.1). Vor Beginn des Versuches erreichten die Mäuse der Kontrollgruppe einen Score von 2,0 (1,5/3,5) und die mit Follistatin behandelten Mäuse einen Score von 2,0 (1,5/3,0) (p = 0,8646). Die motorische Leistung der Mäuse nahm nach der Infektion rapide ab, mit der maximalen Abnahme 24 Stunden nach Infektion. Nach 24 Stunden unterschied sich die Leistungsfähigkeit der beiden Gruppen im Seiltest nicht signifikant (p = 0,1924). Die mit Follistatin therapierten Mäuse erreichten einen Score von 3.0(1.0/8.5) und zeigten damit eine etwas bessere motorische Leistungsfähigkeit als die Mäuse der Kontrollgruppe mit einen Score von 4,5 (2,0/9,5) (p = 0,1924). Die Abnahme der Leistungsfähigkeit war ebenfalls ein Zeichen für die erfolgreiche Infektion der Mäuse. Nach Überwinden der Infektion begann sich die motorische Leistungsfähigkeit wieder zu verbessern, bis sie sich 168 Stunden nach Infektion annähernd wieder normalisiert hatten. 168 Stunden nach der Infektion erreichten die Mäuse der Kontrollgruppe einen Score von 3,0 (1,5/5,0) und die mit Follistatin behandelten Mäusen einen Score von 2,0 (1,0/4,0). Die Interventionsgruppe hatte damit ihren Ausgangsscore 168 Stunden nach Infektion wieder erreicht. Der Unterschied der motorischen Fähigkeit nach 168 Stunden war allerdings mininmal und statistisch nicht signifikant (p = 0.3323). Die Normalisierung der motorischen Fähigkeiten war ebenfalls ein Hinweis darauf, dass die Infektion überwunden war.

Messparameter	Zeitpunkt	Mäuse der	Mäuse der	p-Werte
		Kontrollgruppe	Follistatingruppe	
Gewicht	vor Infektion	26,34 +/- 2,163	26,11 +/- 2,5 g	0,7305
		g		
	24 h nach Infektion	24,60 +/- 2,647	24,18 +/- 2,195 g	0,5456
		g		
	168 h nach Infekti-	25,86 +/- 2,537	25,87 +/- 2,239 g	0,9938
	on	g		
Seiltest	vor Infektion	Score 2,0 (1,5/	Score 2,0 (1,5/ 3,0)	0,8646
		3,5)		
	24 h nach Infektion	Score 4,5 (2,0/	Score 3,0 (1,0/ 8,5)	0,1924
		9,5)		
	168 h nach Infekti-	Score 3,0 (1,5/	Score 2,0 (1,0/ 4,0)	0,3323
	on	5,0)		

Tab. 1: Dargestellt sind die Gewichte der beiden Versuchsgruppen sowie die motorische Leistungsfähigkeit im Seiltest zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuches im Überblick. Die Gewichte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt, der Score vom Seiltest als Mediane und 25.-/75.-Perzentile. h = Stunden; g = Gramm.



Abb. 19: Dargestellt sind die Gewichte und die Ergebnisse im Seiltest. In (A) sind die Gewichte (g) der überlebenden und der gestorbenen Mäuse bis zum Todeszeitpunkt nach der Infektion als Mittelwerte +/- Standardabweichung abgebildet. Die Gewichte in der Kontroll- und Follistatingruppe unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant (p > 0,05). In (B) sind die Leistungen im Seiltest als Score der überlebenden und der gestorbenen Mäuse bis zum Todeszeitpunkt nach der Infektion als Mediane und 25./75.-Perzentile abgebildet. Die motorischen Fähigkeiten unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant (p > 0,05). p.i. = *post infectionem*.

3.2.3 Bakterienkonzentrationen in Milz- und Kleinhirn-Homogenat

Die nach der Infektion verstorbenen Mäuse wiesen einen hohen Bakterientiter in der Milz und im Kleinhirn auf (s. Abb. 20). In der Milz zeigten sowohl die mit Follistatin behandelten Mäuse ($4 \times 10^8 [3 \times 10^8/2 \times 10^9]$ CFU/ml) als auch die Kontrollmäuse ($4 \times 10^8 [2 \times 10^8/2 \times 10^8]$ 2 x 10⁹] CFU/ml) einen sehr hohen E. coli-K1-Titer. Der minimale Unterschied zwischen den Bakterienkonzentration in den Milzen der mit Follistatin behandelten Mäuse und der Kontrollmäuse liegt im Bereich der Messungenauigkeit der Methode zur Bestimmung der Bakterienkonzentration und war nicht signifikant (p = 0.87). Die mit Follistatin behandelten Mäuse (2 x 10⁶ [900 000/ 2 x 10⁷] CFU/ml) zeigten auch im Kleinhirn einen etwas niedrigeren Titer als die Kontrollmäuse (2 x 10⁶ [1 000 000/ 4 x10⁷] CFU/ml). Dieser sehr kleine Unterschied war ebenfalls nicht signifikant (p = 0.95). Bei den überlebenden Mäusen, die nach sieben Tagen getötet wurden, waren die Milz und das Kleinhirn überwiegend steril. Mäuse, in deren Gewebehomogenaten keine Bakterien mehr nachweisbar waren (Nachweisgrenze 1000 CFU/ml) wurden als steril angesehen. In der Kontrollgruppe waren 7 Mäuse steril und in der Follistatingruppe 9 Mäuse. Bei 2 Mäusen der Kontrollgruppe waren die Milzen steril, während sich im Kleinhirn ein Bakterientiter von 1 x 10⁴ CFU/ml fand. Geringe Bakterienkonzentrationen fanden sich sowohl im Kleinhirn als auch in der Milz von 3 mit Follistatin behandelten Mäusen und 2 Mäusen aus der Kontrollgruppe. Die Bakterientiter der überlebenden Mäuse in der Milz (Kontrollgruppe: 999 [999/ 999] CFU/ml; Follistatingruppe: 999 [999/ 999,5] CFU/ml) (p = 0.90) und im Kleinhirn (Kontrollgruppe: 999 [999/ 10 000]; Follistatingruppe: 999 [999/ 5 000] CFU/ml) (p = 0,75) unterschieden sich nicht signifikant. Die Agarplatten von 2 Follistatin- und 3 Kontrollmäusen waren mit Staphylococcus epidermidis kontaminiert und konnten daher nicht ausgewertet werden.



Abb. 20: Die Bakterienkonzentrationen in Kleinhirn und Milz sind als CFU/ml (logarithmische Achse) aufgetragen. In (A) sind die Bakterientiter der nach der Infektion verstorbenen Mäuse dargestellt. In (B) sind die Konzentrationen von *E. coli* K1 der überlebenden Mäuse nach 7 Tagen zu sehen. Die Konzentrationen unterscheiden sich in keinem Fall signifikant (p > 0,05) und sind als Mediane und 25./75. Perzentile dargestellt.

Die Mäuse, die einen erhöhten Bakterientiter im cerebellären Homogenat aufwiesen, hatten in der H. E.-Färbung intakte Meningen (s. Abb. 21), sodass eine Meningitis ausgeschlossen wurde. Die Bakterientiter im Kleinhirn konnten somit durch Bakterien in den cerebellären Blutgefäßen erklärt werden.



Abb. 21: Abgebildet sind H. E.-Färbungen des Großhirns von zwei verschiedenen Mäusen. (A) zeigt die Meningen (\rightarrow) einer mit Follistatin behandelten Maus, die im Kleinhirn keine Bakterien aufwies. In (B) sind die Meningen (\rightarrow) einer Kontrollmaus mit Bakterien im Kleinhirn dargestellt. In beiden Abbildungen sind die Meningen intakt und es gibt keine Hinweise für eine Meningitis. Die Bilder sind in einer 40-fachen Vergrößerung abgebildet.

4. DISKUSSION

4.1 Der Einfluss von Activin A auf Mikroglia

4.1.1 Der Einfluss von Activin A auf die Phagozytose von Mikroglia

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit (Diesselberg et al. 2010) zeigen, dass eine Prästimulation mit Activin A die Phagozytose von E.coli K1 durch mit TLR-Agonisten behandelte Mikrogliazellen signifikant erhöht. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. Der beste Effekt wurde mit Activin A 13 ng/ml erreicht. Eine hohe Konzentration von Activin A 13 µg/ml in Kombination mit den TLR-Agonisten hat hingegen die Phagozytosefähigkeit von Mikroglia im Vergleich zur Stimulaton durch die TLR-Agonisten tendentiell, aber statistisch nicht signifkant, inhibiert. Das bedeutet, dass die Wirkung auf die Phagozytose konzentrationsabhängig war, wobei auch die durchschnittliche Konzentration aus dem menschlichen Liquor bei Meningitis (0,13 ng/ml) (Ebert et al. 2006) in Kombination mit den TLR-Agonisten die Phagozytose signifikant erhöhte. In den Konzentrationen 13 ng/ml, 1,3 ng/ml und 0,13 ng/ml erhöhte Activin A in Kombination mit den verschiedenen TLR-Agonisten also die Phagozytose von E. coli K1 durch Mikroglia. Damit wurden die Bakterien aus dem extrazellulären Raum abgefangen. Die alleinige Stimulation von Mikroglia durch Activin A hatte keinen signifikanten Effekt auf die Phagozytosefähigkeit, lediglich die Konzentration von Activin A 13 ng/ml erhöhte tendentiell die Phagozytoserate. Der Effekt von Activin A auf die Phagozytose durch Monozyten und Makrophagen wurde in der Vergangenheit bereits mit cRBC und 0,7% Natural red untersucht. Wang et al. zeigten an ruhenden Maus-Peritonealmakrophagen, dass Activin A (2 ng/ml bis 5 ng/ml) die Phagozytose von dem Antigen cRBC sowohl in vitro als auch in vivo erhöhte (Wang Y et al. 2009). Im Jahr zuvor wurde gezeigt, dass Activin A die Pinozytose von 0,7% Natural red durch LPS-aktivierte RAW264.7-Mausmakrophagen reduziert (Wang S et al. 2008). Dieses Ergebnis wurde 2009 auch an primären Mausmakrophagen reproduziert: Zhou et al. zeigten, dass Activin A die Pinozytose von 0,7% Natural red durch LPS-aktivierte Mausmakrophagen in vitro vermindert. Sie untersuchten ebenfalls die Phagozytose von cRBC in vitro und in vivo mit dem Ergebnis, dass die Phagozytose von LPS-aktivierten Makrophagen durch Activin A reduziert wurde (Zhou et al. 2009). Activin A hemmt auch die Phagozytose von Latexpartikeln durch eine Monozytenzelllinie, welche mittels IL-6 aktiviert wurden (Yu et al. 1998).

In dieser Arbeit wurde erstmals die Wirkung von Activin A auf die Phagozytose von akti-

vierten und ruhenden Mikrogliazellen untersucht. Im Gegensatz zu den anderen Ergebnissen mit aktivierten Zellen erhöhte Activin A bei den Versuchen mit Mikroglia die Phagozytoseaktivität von kostimulierten Zellen. Dies wurde zuvor nur an ruhenden Zellen festgestellt. Es scheint daher Unterschiede in den Phagozytosefähigkeiten der verschiedenen immunkompetenten Zellen zu geben. Die vorher durchgeführten Versuche wurden mit Mausmakrophagen oder Monozyten durchgeführt. Auch das Phagozytosematerial in den unterschiedlichen Versuchen war sehr unterschiedlich. cRBC sind rote Blutkörperchen von Hühnern, welche eine Immunantwort auslösen können. Natural red und Latexpartikel lösen ebenfalls eine Immunantwort aus und induzieren die Phagozytose. In dieser Arbeit wurden erstmals Phagozytoseversuche mit E. coli K1, einem Bakterium, durchgeführt. Der Bakterienstamm wurde von G. Zysk aus dem Liquor eines Kindes mit E. coli-K1-Meningitis isoliert und anschließend nicht hitzeinaktiviert. Das bedeutet, dass dieser Bakterienstamm virulent und in der Lage ist, eine starke Immunantwort auszulösen. Ein Bakterium besitzt nicht nur ein einziges Antigen, sondern besteht aus mehreren, komplexen Antigenstrukturen. Es macht also wahrscheinlich einen Unterschied, ob man die Phagozytosefähigkeit mit cRBC, Latexpartikeln und Natural red oder einem ganzen Bakterium testet. Zusammenfassend scheinen die Unterschiede in den Ergebnissen also von dem experimentellen Ablauf (Art der Zellen, Phagozytosematerial, Activin-A-Konzentration) abzuhängen (s. Tab. 2).

Activin A wird von Mikrogliazellen nach Aktivierung des TLR 4 ausgeschüttet. Dieser Prozess läuft über das Signalprotein MyD88 (Jones et al. 2007). Die Mikrogliazellen sind zum einen eine Quelle von Activin A (Ebert et al. 2007) und zum anderen auch eine Zielzelle von Activin A. Mikroglia exprimieren Act-RI und Act-RII (Wilms et al. 2010), welche als Signalproteine Smad 2, 3 und 4 nutzen (Shimizu et al. 1998; You und Kruse 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Activin A für die Stimulation der Phagozytose auch das Signalprotein MyD88 nutzt, welches eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von TLR spielt. In den Ergebnissen dieser Arbeit gab es hinsichtlich der Stimulation durch Activin A keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und MyD88-/- -Mikroglia, sodass eine Transduktion von Activin A über MyD88 ausgeschlossen werden konnte. Ob Activin A einen MyD88-unabhängigen-Signalweg über das Protein TRIF nutzt (s.o.), wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Zellen	Stimu-	Activin-A-	Phagozytose	Effekt	Autor
	lation	Konzentration	mit	auf	
	mit			Phago-	
				zytose	
Monozyten-	IL-6	25-100 ng/ml	Latexpartikel	Ţ	Yu et al.
zelllinie				•	1998
RAW264.7-	LPS	0,4–10 ng/ml	Pinozytose	1	Wang S et
Mausmakrophagen			mit 0,7%	•	al. 2008
			Neutral red		
Makrophagen	LPS	2–5 ng/ml	cRBC in vit-	Ţ	Zhou et al.
			ro und in vivo	•	2009
Makrophagen	-	2–5 ng/ml	cRBC in vivo	↑	Wang Y et
			und <i>in vitro</i>	1	al. 2009
Mikroglia	CpG,	0,13–13 ng/ml	E. coli K1	↑	Diesselberg
	LPS,				et al. 2010
	РзС				
1	1	1		1	1

Tab. 2: Darstallung der unterschiedlichen Effekte auf die Phagozytose aus verschiedenen Publikationen in einer Übersicht (vgl. Ebert et al. 2010b). - = keine Stimulation, \oint = Erhöhung, = Inhibition.

4.1.2 Pro- und antiinflammatorische Wirkung von Activin A auf Mikroglia

Activin A wird unter anderem von immunkompetenten Zellen gebildet und freigesetzt, wirkt aber über parakrine und endokrine Wege auch auf die Abwehrzellen. Die genaue Wirkung von Activin A bei inflammatorischen Ereignissen ist noch Gegenstand der Forschung. Die bislang veröffentlichen Ergebnisse wurden überwiegend durch *in-vitro*-Versuche erzielt.

An ruhenden Monozyten und Makrophagenzelllinien stimuliert Activin A die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Nüsing und Barsig 1999; Yamashita et al. 1993). Activin A hat in LPS-stimulierten RAW264.7-Makrophagen jedoch einen hemmenden Einfluss auf die Ausschüttung von IL-1 β sowie die Expression von CD 14 und TLR 4. In nicht-aktivierten, ruhenden Makrophagen erhöht Activin A die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) sowie die Freisetzung von NO (Wang S et al. 2008). In aktivierten Makrophagen ist dieser Effekt genau umgekehrt: Activin A hemmt die Expression der iNOS und reduziert die NO-Ausschüttung (Nüsing und Barsig 1999; Sugama et al. 2007; Wang S et al. 2008; Zhang XJ et al. 2005). Dieser Effekt wurde auch bei Mikrogliazellen gezeigt: Activin A reduziert bei LPS-stimulierten Mikroglia die mRNA der iNOS (Sugama et al. 2007). Wilms *et al.* zeigten kürzlich außerdem, dass Activin A die NO-Synthese, das mRNA-Level der iNOS und die Menge des iNOS-Proteins von LPS- oder IFN- γ -aktivierten Mikrogliazellen reduziert. Sie fanden ebenfalls heraus, dass Activin A die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α reduziert (Wilms et al. 2010). Activin A hemmt die Ausschüttung von IL-18 und IL-6 in LPS-aktivierten primären Mikrogliazellen (Sugama et al. 2007).

Insgesamt betrachtet hat Activin A an ruhenden, immunkompetenten Zellen in Abwesenheit von inflammatorischen Stimuli einen proinflammatorischen Einfluss und erhöht die Ausschüttung von NO, IL-1β, IL-6 und TNF-α. An aktivierten Makrophagen und Mikroglia hat Activin A eine antiinflammatorische Wirkung, indem es die Produktion der proinflammtorischen Zytokine reduziert. Activin A wirkt also in den frühen Stadien einer Inflammation proinflammatorisch, in den späten Stadien verhindert es eine überschießende Immunantwort, indem es die proinflammatorischen Zytokine hemmt. In diesen Kontext passen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der TNF-a- und NO-Ausschüttung nach Kostimulation von Activin A und TLR-Agonisten nicht vollständig: Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Einfluss von Activin A auf die TNF- α -Ausschüttung durch ruhende Mikrogliazellen. Activin A 13 ng/ml hat die TNF-a-Ausschüttung durch aktivierte Mikroglia stimuliert, allerdings statistisch nicht signifikant im Vergleich zur Stimulation durch TLR-Agonisten. Dies steht im Gegensatz zu den bisher gezeigten Einflüssen von Activin A auf stimulierte Zellen. Dort wurde immer eine Inhibition der proinflammatorischen Zytokine durch Activin A gezeigt. Activin A 13 µg/ml hatte einen inhibitorischen, aber statistisch nicht signifikanten Effekt auf die TNF- α -Ausschüttung von aktivierten Mikrogliazellen und war damit antiinflammatorisch. Diese Wirkung von Activin A auf die Zytokinfreisetzung stimmt mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen überein. Ob Activin A nun pro- oder antiinflammatorisch wirkt, scheint also nicht nur von dem Aktivierungszustand der Zellen, sondern auch von der verwendeten Activin-A-Konzentration abzuhängen.

Im Gegensatz zu Wilms *et al.* (s.o.) erhöhte Activin A in Kombination mit TLR-Agonisten die NO-Freisetzung durch Mikroglia im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch TLR-

Agonisten. Activin A ohne Kostimulation hatte in den Versuchen dieser Arbeit keinen Einfluss auf die NO-Freisetzung im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen bezüglich der NO-Freisetzung durch Mikroglia nach inflammatorischen Stimuli also im Gegensatz zu den bisher veröffentlichen Ergebnissen. Dies könnte an dem unterschiedlichen Versuchsaufbauten liegen. Wilms et al. verwendeten entweder LPS oder IFN-y als Stimulus und 200 000 Mikrogliazellen/Well. Des Weiteren verwendeten sie mit Activin A 20 ng/ml eine wesentlich niedrigere Konzentration als 13 µg/ml. Die Inkubation mit LPS oder IFN-y mit oder ohne Activin A betrug 24 Stunden (Wilms et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination aus TLR-Agonisten und IFN-y als inflammatorischer Reiz verwendet, um die NO-Freisetzung zu messen. Außerdem wurde eine höhere Activin-A-Konzentration verwendet. Die Dauer der Stimulation war mit insgesamt 48 Stunden doppelt so lang wie bei Wilms et al. und die Zellzahl mit ungefähr 50 000 Zellen/Well wesentlich niedriger. Die Versuchsaufbauten unterschieden sich also in mehreren Punkten. Das jeweils erzielte Ergebnis scheint somit sehr von dem jeweiligen Versuchsaufbau abzuhängen. Daher kann noch nicht abschließend gesagt werden, welchen Einfluss Activin A tatsächlich auf die Ausschüttung von TNF- α und NO hat.

4.1.3 Effekte von Activin A auf die Morphologie und Vitalität von Mikroglia

Um den Effekt von Activin A auf die Morphologie der Mikroglia zu untersuchen, wurde die Isolektin- und Hämalaun-Doppelfärbung durchgeführt. Die Färbung zeigte, dass ruhende Mikroglia einen schmalen Zellkörper und lange, verzweigte Fortsätze haben. Mit Activin A behandelte Mikroglia wiesen einen eher runden Zellleib mit plumpen Fortsätzen auf. Ein runder Zellleib und abgeflachte Fortsätze sprechen bei Mikroglia für eine Aktivierung (Suzumura et al. 1991). Activin A veränderte also die Morphologie der Mikroglia von ruhenden zu aktivierten Zellen. In einem Kaninchenmodell einer *S. pneumoniae*-Meningitis war die erhöhte Activin-A-Konzentration im Liquor mit einer Aktivierung von Mikroglia assoziiert (Michel et al. 2003b). *In vitro* zeigten Sugama *et al.*, dass Activin A die Anzahl der Mikroglia dosisabhängig reduziert. Während Activin A 0,13 ng/ml (0,01 nM) keinen Einfluss auf die Zellzahl hatte, verminderten Konzentrationen von 13 ng/ml (1 nM) und 52 ng/ml (4 nM) die Anzahl der Mikroglia. Die Reduktion der Zellen war allerdings nicht auf einen Zelltod zurückzuführen, denn die LDH-Aktivität war unverändert, sondern auf eine verminderte Proliferation der Zellen (Sugama et al. 2007). Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden zum größten Teil mit Activin A 13 ng/ml, welches Activi
A 1 nM entspricht, durchgeführt. Laut den Ergebnissen von Sugama *et al.* müsste die Anzahl der Mikroglia bei dieser Konzentration reduziert worden sein. Dies war in der Zellkulturfärbung jedoch nicht zu sehen. Eine quantiative Auswertung mittels WST-Test ergab aber ebenfalls, dass die Anzahl der Mikroglia durch Activin A nicht reduziert wurde. Sugama *et al.* inkubierten die Zellen 96 Stunden, während die Mikroglia für die Morphologiebeurteilung und die Phagozytoseversuche in dieser Arbeit für 48 Stunden mit Activin A inkubiert wurden. Womöglich hat auch die Dauer der Einwirkung von Activin A einen Einfluss auf die Morphologie der Mikroglia. Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen von Wilms *et al.*: sie inkubierten Mikrogliazellen mit Activin A 20 ng/ml für 6 Stunden. Ihre Ergebnisse zeigen, dass Activin A die Proliferation von Mikroglia verstärkt. Activin A antagonisierte sogar die hemmende Wirkung von IFN- γ auf die Mikroglia-Proliferation (Wilms et al. 2010). In dem Zellstabilitätstest WST im Rahmen der vorliegenden Arbeit veränderte Activin A 13 µg/ml, also 1 µM, die Vitalität von Mikroglia nicht. Das bedeutet, dass Activin A auch in der höchsten Konzentration, in der es verwendet wurde, nicht zelltoxisch war.

Zusammenfassend betrachtet aktivierte Activin A in der vorliegenden Arbeit Mikrogliazellen morphologisch. Es gibt keine Anhaltspunkte dafür, dass Activin A zelltoxisch war und den Zelltod induzierte.

4.2 Der Einfluss von Follistatin auf die Mortalität bei *E. coli-*K1-Infektionen *in vivo*

Die Konzentration von Follistatin ist bei einer bakteriellen Sepsis im Blut erhöht (Michel et al. 1998; Michel et al. 2003a). Eine intraperitoneale Gabe von Follistatin reduzierte die Letalität in einer LPS-induzierten Immunreaktion im Mausmodell (Jones et al. 2007). Im hier verwendeten Mausmodell der *E. coli*-K1-Sepsis, in dem die Mäuse nicht antibiotisch behandelt worden sind, veränderte die Gabe von Follistatin das Überleben allerdings nicht. Die Versuche zeigten weder eine erhöhte noch eine reduzierte Letalität. Daher hat die intraperitoneale Injektion von Follistatin die Infektionsresistenz der Mäuse nicht verändert. Die intraperitoneale Infektion war erfolgreich, denn die Mäuse verloren nach der Infektion an Gewicht, was ein Zeichen für Infektionen ist. Gleiches gilt für die motorische Leistung im Seiltest, welche nach der *E. coli*-K1-Infektion ebenfalls abnahm. Doch auch der Gewichtsverlust und die motorischen Fähigkeiten unterschieden sich nicht signifikant zwi-

schen Kontroll- und Interventionsgruppe. Das Behandlungsergebnis unterschied sich also nicht. Die verstorbenen Mäuse wiesen sowohl im Blut und Milz als auch im Kleinhirn *E. coli* K1 auf. Das bedeutet, dass die intraperitoneale Infektion erfolgreich war und die Todesursache eine *E. coli*-K1-Sepsis war.

Im Gegensatz dazu zeigten Jones et al., dass die intaperitoneale Gabe von Follistatin die Letalität von LPS-behandelten Mäusen reduzierte (Jones et al. 2007). LPS ist ein Antigen in der äußeren Membran der Zellwand von gram-negativen Bakterien und damit auch von E. coli K1. Die Zellwand von gram-negativen Bakterien besteht jedoch nicht nur aus LPS, sondern zum Beispiel auch aus Peptidoglykanen. Peptidoglykane machen bei gramnegativen Bakterien einen wesentlich geringen Anteil aus als bei gram-positiven Bakterien, aber sie sind Bestandteil der Zellwand (Ghuysen 1968; Schleifer und Kandler 1972). Kürzlich wurde beschrieben, dass verschiedene Serotypen von E. coli (O111:B4 und K 12) unterschiedliche Peptidoglykanstrukturen aufweisen und unterschiedliche Effekte auf Forellenmakrophagen haben (Boltaña et al. 2011). Die Immunantwort hängt also nicht nur von einem Antigen ab und Unterschiede im gleichen Protein in einem Bakterium der gleichen Klasse machen sich in einer unterschiedlichen immunologischen Antwort bemerkbar. Diese These wird gestützt von Sivagnanam et al., die sich die Frage stellten, ob LPS und E. coli K12 die gleiche Immunantwort durch Rattenmikroglia hervorrufen. Ihre Ergebnisse zeigen, dass isoliertes LPS und das ganze Bakterium E. coli unterschiedliche Zytokin-Profile stimulieren. Während die TNF-α-Ausschüttung durch LPS bzw. E. coli gleich war, rief LPS eine wesentliche höhere IL-10- und NO-Ausschüttung hervor als E. coli. Sivagnanam et al. zeigten ebenfalls, dass die Dichte von Rezeptoren, welche für die Antigenerkennung und Phagozytose zuständig sind, von LPS und E. coli K 12 unterschiedlich reguliert wird (Sivagnanam et al. 2010). In ihrer Studie verwendeten sie zwei Serotypen von LPS (0055:B5 und K-235) und fanden sogar kleine Unterschiede in der inflammatorischen Antwort von Mikroglia auf die jeweiligen LPS-Serotypen. An menschlichen Makrophagen wurde in einer Microarrey-Studie gezeigt, dass LPS und E. coli die gleichen Gene beeinflussen, sich die Expressionen aber in Zeit und Stärke unterscheiden (Nau et al. 2003). Insgesamt gesehen ist die Immunantwort eines Organismus sehr komplex und hängt von verschiedenen PPRs und PAMPs ab. Daher ist es fraglich, wie gut ein isoliertes Antigen die Immunantwort eines ganzen Bakteriums imitieren kann. Dies wird auch dadurch deutlich, dass sich der Verlauf einer Entzündung durch eine LPS-Injektion vom Verlauf einer Infektion durch Bakterien unterscheidet. LPS ist ein inflammatorischer Stimulus und in der Lage, eine Signalkaskade von immunkompetenten Zellen zu starten. Möchte man die inflammatorische Reaktion stoppen, muss nur die Signalkaskade gestoppt werden. Bakterien setzen die Signalkaskade von Immunzellen ebenfalls in Gang. Im Gegensatz zu LPS müssen die Bakterien zusätzlich noch abgetötet werden, um unschädlich gemacht zu werden. Jones et al. zeigten die reduzierte Letalität von erhöhten Follistatinkonzentration bei einer LPS-induzierten Immunreaktion bei Mäusen (Jones et al. 2007). Im Gegensatz zu Jones et al. wurde in dieser Arbeit nicht nur eine Entzündungsreaktion, sondern eine "echte" Infektion mit E. coli K1, welches von einem Kleinkind mit Meningitis aus dem Liquor isoliert wurde und in der Lage ist eine starke Immunreaktion hervorzurufen, induziert. Ansonsten wichen die beiden Versuchsabläufe nicht voneinander ab. In beiden Versuchen wurde die gleiche Follistatinkonzentration (10 µg) eine halbe Stunde vor Injektion von LPS bzw. Bakterium intraperitoneal verabreicht. Die Injektion von LPS und E. coli erfolgte ebenfalls intraperitoneal. Die Versuchstiere waren jeweils männliche Mäuse. In beiden Versuchen wurden die Mäuse nicht antibiotisch behandelt. Jones et al. untersuchten auch die Wirkung von Follistatin auf die Zytokinfreisetzung. Sie zeigten, dass Follistatin die Ausschüttung von seinem Bindungsprotein Activin A moduliert und damit das Zytokinprofil verändert (Jones et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zytokinausschüttung nicht untersucht.

Bei Patienten mit bakterieller Sepsis wurde im Serum sowohl eine erhöhte Follistatin- als auch eine erhöhte Activin-A-Konzentration gefunden. In der Studie gab es jedoch keine enge Korrelation zwischen der Höhe der Follistatin-Konzentration und dem Behandlungsergebnis der Patienten. Gleiches gilt für die Höhe der Activin-A-Konzentration und das Behandlungsergebnis (Michel et al. 2003a). Jones *et al.* zeigten in ihren Versuchen 2007, dass eine erhöhte Activin-A-Konzentration mit einer erhöhten Letalität von Mäusen bei einer LPS-induzierten Sepsis einhergeht (Jones et al. 2007). Dafür gab es in der klinischen Studie von 2003 jedoch keinen Anhaltspunkt.

Zusammenfassend beeinflusste eine intraperitoneale Follistatin-Injektion von 10 µg die Infektionsresistenz und den Erkrankungsverlauf bei einer "echten" bakteriellen Sepsis im Mausmodell nicht. Dies zeigt, dass eine Sepsis nicht durch die Injektion von LPS nachgeahmt werden kann. Im Rahmen einer Sepsis hat die Entzündungsreaktion nicht nur negative Folgen für den Wirt, sondern ist zur Bekämpfung bakterieller Erreger dringend erforderlich.

4.3 Activin A und Follistatin als Therapie bei Sepsis oder Meningitis?

Therapeutisch könnte man die Konzentration von Activin A erhöhen oder erniedrigen. Eine Blockierung von Activin A kann zum Beispiel durch das Bindungsprotein Follistatin erreicht werden. Follistatin bindet an Activin A und vermindert dadurch die physiologische Wirkung von Activin A. Bei inflammatorischen, chronischen gastroenterologischen Erkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) wurde im Mausmodell die intraperitoneale Verabreichung von Follistatin getestet. Durch die Blockierung von Activin A wurden lokale Ulzerationen, Ödeme, Zellinfiltrationen und die Ansammlung von neutrophilen Granulozyten vermindert. Durch die Gabe von Follistatin wurde die entzündliche Reaktion also vermindert (Dohi et al. 2005). Bei einer allergischen Lungenentzündung reduzierte im Mausmodell intranasal verabreichtes Follistatin die Activin-A-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage und verminderte die Anzahl der Lymphozyten. Durch die Dysbalance zwischen der Activin-A- und Follistatin-Konzentration, bedingt durch die Follistatingabe, konnte im Modell die Schwere der Entzündung und die Entwicklung von Asthma reduziert werden (Hardy et al. 2006). Die Ergebnisse der Arbeit einer australischen Forschungsgruppe (Jones et al. 2007) lassen vermuten, dass durch die Verabreichung von Follistatin und damit einer Blockierung von Activin A das Behandlungsergebnis einer systemischen Infektion verbessert werden könnte. Die intraperitoneale Gabe von Follistatin bei einer E. coli-K1-Infektion im Rahmen dieser Arbeit war jedoch weniger erfolgsversprechend, denn Follistatin hat die Überlebensrate nicht verbessert und die Infektionsresistenz der Mäuse nicht gesteigert. Ob die Gabe von Follistatin im Rahmen einer Sepsis protektiv ist, könnte man in einem weiteren in-vivo-Versuch mit höheren Bakterienkonzentrationen und antibiotischer Behandlung untersuchen.

Die Verabreichung von rekombinanten humanen Activin A, wodurch eine Erhöhung der Activin-A-Konzentration erreicht wird, hat bei pulmonalen, allergischen Ereignissen einen positiven Effekt. Durch die Gabe von Activin A wurde die Antwort der Th-2-Zellen abgeschwächt und die Erkrankung der Luftwege durch Allergien reduziert (Semitekolou et al. 2009). Rekombinantes humanes Activin A wurde auch im Rattenmodell nach einem cerebral hypoxisch-ischämischen Ereignis intracerebroventricular verabreicht. Durch die Activin-A-Gabe wurde das Überleben von hippocampalen und striatalen Neuronen verbessert (Hughes PE et al. 1999). Dies zeigt den neuroprotektiven Effekt von Activin A.

Die Versuche dieser Arbeit zeigen, dass Activin A die Phagozytose von *E. coli* K1 durch stimulierte Mikrogliazellen *in vitro* erhöht hat. Activin A sorgt also dafür, dass die Bakte-

rien aus der Umgebung abgefangen und unschädlich gemacht werden. Bislang gibt es jedoch lediglich *in-vitro*-Ergebnisse. Als nächsten Schritt müsste man *in vivo* untersuchen, ob die Gabe von Activin A einen Überlebensvorteil bei bakterieller Meningitis bewirkt, und so das pharmakotherapeutische Potential von Activin A evaluieren. In dem entsprechenden *in-vivo*-Versuch könnte man den Mäusen eine hohe Bakterienkonzentration injizieren und sie zusätzlich antibiotisch behandeln, um zu prüfen, ob eine adjuvante Therapie mit Activin A protektiv ist.

Die therapeutische Gabe von Activin A oder Follistatin müsste bei einer Sepsis oder Meningitis systemisch erfolgen. Activin A ist jedoch ein multifaktorielles Zytokin und hat Wechselwirkungen mit Follistatin und anderen Mitgliedern der TGF-β-Superfamilie, sodass bei der systemischen Verabreichung viele Nebenwirkungen zu erwarten sind. Grundsätzlich muss erwähnt werden, dass bei bakteriellen Infektionen ein effizientes Immunsystem Voraussetzung ist, um die Pathogene zu bekämpfen. Greift man nun in das Immunsystem ein und blockiert die Abwehrreaktion des Körpers mit Follistatin oder Activin A, könnte das Immunsystem zu sehr geschwächt werden, um die Bakterien noch effektiv zu bekämpfen. Daher müsste die Immuntherapie mit einem Antibiotikum kombiniert werden. Des Weiteren müsste bei der Activin-A-Gabe auf den exakten Zeitpunkt geachtet werden. Activin A hat abhängig vom Zeitpunkt pro- oder antiinflammatorische Eigenschaften (s. S. 14). Daher wäre der richtige Zeitpunkt wichtig für die effektive Therapie (Ebert et al. 2010b).

Zusammenfassend betrachtet ist die therapeutische Nutzung von Follistatin und Activin A derzeit Gegenstand der Forschung und es bleibt abzuwarten, ob sie bei systemischen und ZNS-Infektionen als Immuntherapie effektiv einsetzbar sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Patienten mit bakterieller Meningitis finden sich erhöhte Activin-A- und Follistatin-Konzentrationen im Liquor. Erhöhte Activin-A- und Follistatin-Konzentrationen im Serum finden sich bei Patienten mit Sepsis. Mikroglia sind zum einen in der Lage, Activin A durch einen inflammatorischen Reiz freizusetzen, zum anderen besitzen sie aber auch Rezeptoren für Activin A. Activin A verändert während einer Entzündung das Zytokinfreisetzungsmuster von Mikroglia.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Activin A die Phagozytose von E. coli K1 durch Mikroglia beeinflusst (Diesselberg et al. 2010). Primäre Mikrogliazellen wurden mit Activin A 13 µg/ml, 13 ng/ml, 1,3 ng/ml oder 0,13 ng/ml prästimuliert und mit den TLR-Agonisten P₃C 0,1 µg/ml, CpG 1 µg/ml oder LPS 0,01 µg/ml kostimuliert. Nach der Stimulation wurde für 90 Minuten E. coli K1, ein Meningitis-Erreger, in einer Konzentration von 1x10⁷ CFU/ml zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden extrazellulär verbliebene Bakterien mit Hilfe von Gentamicin abgetötet, die Zellen lysiert und die intrazelluläre Bakterienanzahl mit quantitativem Ausplattieren auf Blutagar-Platten bestimmt. Activin A 13 ng/ml erhöhte in Kombination mit den TLR-Agonisten LPS, P₃C und CpG die Phagozytose durch Mikroglia im Vergleich zur alleinigen Stimulation durch die TLR-Agonisten signifikant. Activin A 1,3 ng/ml stimulierte in Kombination mit LPS sowie P₃C die Phagozytose signifikant, Activin A 0,13 ng/ml in Kombination mit den TLR-Agonisten LPS. Activin A 13 µg/ml hatte einen inhibitorischen, aber im Vergleich zur Stimulation durch die TLR-Agonisten nicht signifikanten Einfluss auf die Phagozytose. Activin A erhöhte also in gewissen Konzentrationen in vitro die Elimination von E. coli K1. Damit könnte eine Gabe von Activin A oder eines Analogons ein möglicher neuer Therapieansatz in der Zukunft sein. Die Messung der TNF- α -Freisetzung durch Mikroglia nach Stimulation mit Activin A 13 ng/ml und 13 µg/ml mittels ELISA im Rahmen dieser Arbeit war wenig aussagekräftig. Die NO-Freisetzung durch Mikroglia wurde durch Activin A 13 µg/ml in Kombination mit den TLR-Agonisten P₃C 0,01 µg/ml, LPS 0,0003 µg/ml und CpG 0,1 µg/ml in Gegenwart von IFN- γ 100 U/ml im Vergleich zur Stimulation mit den TLR-Agonisten und IFN- γ signifikant stimuliert. Die Zellkulturdoppelfärbung mit Isolektin und Hämalaun zeigte, dass Activin A die Morphologie von ruhenden Mikroglia zu aktivierten veränderte. Sowohl in der Zellkulturfärbung als auch im Zellstabilitätstest WST gab es keine Anhaltspunkte dafür, dass Activin A zelltoxisch war und die Vitalität oder Dichte von Mikroglia veränderte.

In einer Studie von Jones et al. wurde gezeigt, dass die intraperitoneale Gabe von Follistatin im Mausmodell nach intraperitonealer LPS-Injektion die Letalität senken kann. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die intraperitoneale Injektion von Follistatin den gleichen Effekt auf den Verlauf einer E. coli-K1-Sepsis hat. Die Versuchstiere waren 50 männliche, 3 Monate alte C57BL6-N-Mäuse. 26 Mäuse waren in der Kontrollgruppe und bekamen eine halbe Stunde vor Infektion 100 µl NaCl 0,9% intraperitoneal gespritzt. Den Mäusen der Interventionsgruppe (24 Mäuse) wurde zum gleichen Zeitpunkt 10 µg Follistatin, gelöst in 100 µl NaCl 0,9 %, injiziert. Die Infektion erfolgte intraperitoneal mit E. coli K1 2x10⁵ CFU/ml. Die Mäuse wurden bis zum 3. Tag alle 12 Stunden beobachtet, gewogen und die motorische Leistungsfähigkeit im Seiltest beurteilt, anschließend alle 24 Stunden. Versuchstiere, die nicht mehr gehfähig waren, wurden aus ethischen Gründen getötet. 168 Stunden nach Infektion wurde der Versuch beendet. Post mortem wurde der Bakterientiter in der Milz und im Kleinhirn mittels quantitativen Ausplattierens bestimmt sowie eine H.E.-Färbung des Gehirns angefertigt. Eine intraperitoneale Injektion von Follistatin hatte keinen Einfluss auf die Infektionsresistenz der Mäuse und das Überleben der systemischen E. coli-K1-Infektion. Auch die Gewichtsveränderung und die motorische Leistungsfähigkeit unterschieden sich während der Infektion zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nicht. Es ist also fraglich, ob die Gabe von Follistatin tatsächlich einen positiven Einfluss auf den Verlauf von bakteriellen Infektionen hat und damit in Zukunft als Therapieoption bei Sepsis in Frage kommt.

6. VERÖFFENTLICHUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT DER DIS-SERTATION

Abstrakt und Poster:

Diesselberg C, Ribes S, Redlich S, Michel U, Nau R, Ebert S. Activin A increases phagocytosis of *E. coli* K1 by microglial cells activated by TLR-agonists. Abstract 10th International Congress of Neuroimmunology in Sitges – Barcelona, Spain, 26. – 30. Oktober 2010. J Neuroimmunol 2010, <u>228</u>, 17 (Nr. 291)

Paper:

Dießelberg C, Ribes S, Michel U, Nau R, Schütze S. Follistatin does not reduce the mortality of *E.coli* K1 - sepsis in a mouse model. (in Vorbereitung)

Dießelberg C, Ribes S, Michel U, Nau R, Schütze S. Activin A increases phagocytosis of *E. coli* K1 by murine microglial cells activated by TLR-agonists. (in Vorbereitung)

7. LITERATURVERZEICHNIS

Zeitschriften:

- Abe M, Shintani Y, Eto Y, Harada K, Kosaka M, Matsumoto T (2002): Potent induction of activin A secretion from monocytes and bone marrow stromal fibroblasts by cognate interaction with activated T cells. J Leukoc Biol <u>72</u>, 347–352
- Abe S, Soejima M, Iwanuma O, Saka H, Matsunaga S, Sakiyama K, Ide Y (2009): Expression of myostatin and follistatin in Mdx mice, an animal model for muscular dystrophy. Zoolog Sci <u>26</u>, 315–320
- Abbildung Eppendorf-Cup: <u>http://www.clker.com/clipart-1ml-eppendorf-tube-3.html</u> (30.11.2011)
- Akira S, Hoshino K (2003): Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. J Infect Dis <u>187</u> Suppl. 2, 356–363
- Albano RM, Arkell R, Beddington RS, Smith JC (1994): Expression of inhibin subunits and follistatin during postimplantation mouse development: decidual expression of activin and expression of follistatin in primitive streak, somites and hindbrain. Development <u>120</u>, 803–813
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001): Recognition of doublestranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature <u>413</u>, 732–738
- Aloisi F (2001): Immune Function of Microglia. Glia 36, 165-179
- Aoki F, Kurabayashi M, Hasegawa Y, Kojima I (2005): Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by follistatin. Am J Respir Crit Care Med <u>172</u>, 713–720
- Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massagué J (1992): Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. Cell <u>68</u>, 97–108
- Azeh I, M\u00e4der M, Smirnov A, Beuche W, Nau R, Weber F (1998): Experimental pneumococcal meningitis in rabbits: the increase of matrix metalloproteinase-9 in cerebrospinal fluid correlates with leucocyte invasion. Neurosci Lett <u>256</u>, 127–130
- Billestrup N, González-Manchón C, Potter E, Vale W (1990): Inhibition of somatotroph growth and growth hormone biosynthesis by activin in vitro. Mol Endocrinol <u>4</u>, 356–362
- Bogdan I, Leib SL, Bergeron M, Chow L, Täuber MG (1997): Tumor necrosis factor-alpha contributes to apoptosis in hippocampal neurons during experimental group B streptococcal meningitis. J Infect Dis <u>176</u>, 693-697
- Boltaña S, Reyes-Lopez F, Morera D, Goetz F, Mackenzie SA (2011): Divergent responses to peptidoglycans derived from different *E. coli* serotypes influence inflammatory outcome in trout, *Oncorhynchus mykiss*, macrophages. BMC Genomics <u>12</u>, 34

- Böttcher T, von Mering M, Ebert S, Meyding-Lamadé U, Kuhnt U, Gerber J, Nau R (2003): Differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in experimental murine central nervous system infections. Neurosci Lett <u>344</u>, 17–20
- Brosh N, Sternberg D, Honigwachs-Sha'anani J, Lee BC, Shav-Tal Y, Tzehoval E, Shulmann LM, Toledo J, Hacham Y, Carmi P, et al. (1995): The plasmacytoma growth inhibitor restrictin-P is an antagonist of interleukin 6 and interleukin 11. Identification as a stroma-derived activin A. J Biol Chem <u>270</u>, 29594–29600
- Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Schwall RH, Mason AJ, Nikolics K (1988): Selective and indirect modulation of human multipotential and erythroid hematopoietic progenitor cell proliferation by recombinant human activin and inhibin. Proc Natl Acad Sci U S A <u>85</u>, 9052–9056
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002): Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol <u>61</u>, 1013–1021
- Chao CC, Hu S, Close K, Choi CS, Molitor TW, Novick WJ, Peterson PK (1992): Cytokine release from microglia: differential inhibition by pentoxifylline and dexamethasone. J Infect Dis <u>166</u>, 847–853
- Chen W, Woodruff TK, Mayo KE (2000): Activin A-induced HepG2 liver cell apoptosis: involvement of activin receptors and smad proteins. Endocrinology <u>141</u>, 1263–1272
- Chen Y, Wu H, Winnall WR, Loveland KL, Makanji Y, Phillips DJ, Smith JA, Hedger MP (2011): Tumour necrosis factor-α stimulates human neutrophils to release preformed activin A. Immunol Cell Biol <u>doi:10.1038/icb.2011.12</u>, 1–8
- Chinnery HR, Ruitenberg MJ, McMenamin PG (2010): Novel Characterization of Monocyte-Derived Cell Populations in the Meninges and Choroid Plexus and Their Rates of Replenishment in Bone Marrow Chimeric Mice. J Neuropathol Exp Neurol <u>69(9)</u>, 896–909
- Cho SH, Yao Z, Wang S, Alban RF, Barbers RG, French SW, Oh CK (2003): Regulation of activin A expression in mast cells and asthma: its effect on the proliferation of human airway smooth muscle cells. J Immunol <u>170</u>, 4045-4052
- Cocolakis E, Lemay S, Ali S, Lebrun JJ (2001): The p38 MAPK pathway is required for cell growth inhibition of human breast cancer cells in response to activin. J Biol Chem <u>276</u>, 18430–18436
- De Bleser PJ, Niki T, Xu G, Rogiers V, Geerts A (1997): Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver. Hepatology <u>26</u>, 905–912
- Demura R, Suzuki T, Tajima S, Mitsuhashi S, Odagiri E, Eto Y, Sugino H, Demura H (1992): Competitive protein binding assay for activin A/EDF using follistatin determination of activin levels in human plasma. Biochem Biophys Res Commun <u>185</u>, 1148–1154
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (30.11.2011), <u>http://www.dgn.org/inhalte-a-z/440-leitlinien-der-dgn-bakterielle-eitrige-meningoenzephalitis.html</u>

Deutsche	Gesellschaft		für	Innere	Medizin	(21.06.2011),
www.dgim.de/Publikationen/Newsletter/tabid/129/Default.aspx						
Deutsche gesell-	Sepsis	_	Gesellsc	haft e.V	7.(30.11.2011),	www.sepsis-
schaft.de/	DSG/Deutscl	h/Krank	heitsbild+S	epsis/Informa	tionen+fuer+Me	diziner/Leitlinie
n/Sensis-I	eitlinie-2010	0?sid=o	wwiiOvEW	OHVnkxzer	nbcw&iid=1	

- De Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, Huylebroeck K, Verschueren K, van den Eijnden-van Raaij AJ (1996): Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. Mol Cell Endocrinol <u>116</u>, 105–114
- Dinarello CA (1996): Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. Curr Top Microbiol Immunol <u>216</u>, 133–165
- Diesselberg C, Ribes S, Redlich S, Michel U, Nau R, Ebert S (2010): Activin A increases phagocytosis of *E. coli* K1 by microglial cells activated by TLR-Agonists. Abstract 10th International Congress of Neuroimmunology in Sitges – Barcelona, Spain, 26. bis 30. Oktober 2010. J Neuroimmunol, <u>228</u>, 17 (Nr. 291)
- Dohi T, Ejima C, Kato R, Kawamura YI, Kawashima R, Mizutani N, Tabuchi Y, Kojima I (2005): Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. Gastroenterology <u>128</u>, 411–423
- Ebert S, Gerber J, Bader S, Mühlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dosedependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. J Neuroimmunol <u>159</u>, 87–96
- Ebert S, Phillips DJ, Jenzewski P, Nau R, O'Connor AE, Michel U (2006): Activin A concentrations in human cerebrospinal fluid are age-dependent and elevated in meningitis. J Neurol Sci <u>250</u>, 50–57
- Ebert S, Zeretzke M, Nau R, Michel U (2007): Microglial cells and peritoneal macrophages release activin A upon stimulation with Toll-like receptor agonists. Neurosci Lett <u>413</u>, 241–244
- Ebert S, Goos M, Rollwagen L, Baake D, Zech WD, Esselmann H, Wiltfang J, Mollenhauer B, Schliebs R, Gerber J, Nau R (2010a): Recurrent systemic infections with *Streptococcus pneumoniae* do not aggravate the course of experimental neurodegenerative diseases. J Neurosci Res <u>88</u>, 1124–1136
- Ebert S, Nau R, Michel U (2010b): Role of activin in bacterial infections: a potential target for immunointervention? Immunotherapy <u>2</u>, 673–684
- Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry <u>8</u>, 871–874
- Erämaa M, Hurme M, Stenman UH, Ritvos O (1992): Activin A/erythroid differentiation factor is induced during human monocyte activation. J Exp Med <u>176</u>, 1449–1452

- Eto Y, Tsuji T, Takezawa M, Takano S, Yokogawa Y, Shibai H (1987): Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1. Biochem Biophys Res Commun <u>142</u>, 1095–1103
- Fann MJ, Patterson PH (1994): Neuropoietic cytokines and activin A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons. Proc Natl Acad Sci U S A <u>91</u>, 43–47
- Feijen A, Goumans MJ, van den Eijnden-van Raaij AJ (1994): Expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific developmental functions for different activins. Development <u>120</u>, 3621–3637
- Foulds LM, de Kretser DM, Farnworth P, Buttress D, Jenkin G, Groome NP, McFarlane JR (1998): Ovine allantoic fluid contains high concentrations of activin A: partial dissociation of immunoactivity and bioactivity. Biol Reprod <u>59</u>, 233–240
- Gerritsen ME, Bloor CM (1993): Endothelial cell gene expression in response to injury. FASEB J <u>7</u>, 523–532
- Ghuysen JM (1968): Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. Bacteriol Rev <u>32</u>, 425–464
- Gray AM, Mason AJ (1990): Requirement for activin A and transforming growth factorbeta 1 pro-regions in homodimer assembly. Science <u>247</u>, 1328–1330
- Grenier Y, Ruijs TC, Robitaille Y, Olivier A, Antel JP (1989): Immunohistochemical studies of adult human glial cells. J Neuroimmunol <u>21</u>, 103–115
- Hardy CL, O'Connor AE, Yao J, Sebire K, de Kretser DM, Rolland JM, Anderson GP, Phillips DJ, O'Hehir RE (2006): Follistatin is a candidate endogenous negative regulator of activin A in experimental allergic asthma. Clin Exp Allergy <u>36</u>, 941–950
- Hart DN, Fabre JW (1981): Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. J Exp Med <u>154</u>, 347–361
- Hashimoto M, Shoda A, Inoue S, Yamada R, Kondo T, Sakurai T, Ueno N, Muramatsu M (1992): Functional regulation of osteoblastic cells by the interaction of activin-A with follistatin. J Biol Chem <u>267</u>, 4999–5004
- Hashimoto O, Nakamura T, Shoji H, Shimasaki S, Hayashi Y, Sugino H (1997): A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. J Biol Chem <u>272</u>, 13835–13842
- Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002): Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. Eur J Neurosci <u>16</u>, 2113–2122
- Hedger MP, Clarke L (1993): Isolation of rat blood lymphocytes using a two-step Percoll density gradient. Effect of activin (erythroid differentiation factor) on peripheral T lym-

phocyte proliferation in vitro. J Immunol Methods 163, 133-136

- Hedger MP, Drummond AE, Robertson DM, Risbridger GP, de Kretser DM (1989): Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. Mol Cell Endocrinol <u>61</u>, 133–138
- Hedger MP, Phillips DJ, de Kretser DM (2000): Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1beta or interleukin 6 *in vitro*. Cytokine <u>12</u>, 595–602

Hedger MP, Winnall WR, Phillips DJ, de Kretser DM (2011): The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. Vitam Horm <u>85</u>, 255–297

- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature <u>408</u>, 740–745
- Herold G: Innere Medizin. Eigenverlag, Köln 2010
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol <u>162</u>, 3749–3752
- Huang H, Chiou H, Chang J (2006): Activin A induces erythroid gene expressions and inhibits mitogenic cytokine-mediated K562 colony formation by activating p38 MAPK. J Cell Biochem <u>98</u>, 789–797
- Hübner G, Brauchle M, Gregor M, Werner S (1997): Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease? Lab Invest <u>77</u>, 311–318
- Hughes AL (1998): Protein phylogenies provide evidence of a radical discontinuity between arthropod and vertebrate immune systems. Immunogenetics <u>47</u>, 283–296
- Hughes PE, Alexi T, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD (1999): Administration of recombinant human Activin-A has powerful neurotrophic effects on select striatal phenotypes in the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. Neuroscience <u>92</u>, 197–209
- Hughes RD, Evans LW (2003): Activin A and follistatin in acute liver failure. Eur J Gastroenterol Hepatol <u>15</u>, 127–131
- Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). FASEB J <u>18</u>, 412–414
- Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Matsuse T, Hashimoto M, Yamada R, Ouchi Y, Orimo H, Maramatsu M (1993): Expression of follistatin, an activin-binding protein, in vascular smooth muscle cells and arteriosclerotic lesions. Arterioscler Thromb <u>13</u>, 1859–1864
- Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Ikegami A, Kozaki K, Ouchi Y, Nomura S, Muramatsu M, Orimo H (1994): Demonstration of activin-A in arteriosclerotic lesions. Biochem Bio-

phys Res Commun 205, 441-448

- Inouye S, Guo Y, DePaolo L, Shimonaka M, Ling N, Shimasaki S (1991): Recombinant expression of human follistatin with 315 and 288 amino acids: chemical and biological comparison with native porcine follistatin. Endocrinology <u>129</u>, 815–822
- Isberg RR, Falkow S (1985): A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. Nature <u>317</u>, 262–264
- Iwahori Y, Saito H, Torii K, Nishiyama N (1997): Activin exerts a neurotrophic effect on cultured hippocampal neurons. Brain Res <u>760</u>, 52–58
- Join-Lambert O, Morand PC, Carbonnelle E, Coureuil M, Bille E, Bourdoulous S, Nassif X (2010): Mechanisms of meningeal invasion by a bacterial extracellular pathogen, the example of *Neisseria meningitidis*. Prog Neurobiol <u>91</u>, 130–139
- Jones KL, Brauman JN, Groome NP, de Kretser DM, Phillips DJ (2000): Activin A release into the circulation is an early event in systemic inflammation and precedes the release of follistatin. Endocrinology <u>141</u>, 1905–1908
- Jones KL, de Kretser DM, Clarke IJ, Scheerlinck JY, Phillips DJ (2004): Characterisation of the rapid release of activin A following acute lipopolysaccharide challenge in the ewe. J Endocrinol <u>182</u>, 69–80
- Jones KL, Mansell A, Patella S, Scott BJ, Hedger MP, de Kretser DM, Phillips DJ (2007): Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. Proc Natl Acad Sci U S A <u>104</u>, 16 239–16244
- Kanoh Y, Ohara T, Kanoh M, Akahoshi T (2008) Serum matrix metalloproteinase-2 levels indicate blood-CSF barrier damage in patients with infectious meningitis. Inflammation <u>31</u>, 99–104
- Karagiannidis C, Hense G, Martin C, Epstein M, Rückert B, Mantel P, Menz G, Uhlig S, Blaser K, Schmidt-Weber CB (2006): Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma. J Allergy Clin Immunol <u>117</u>, 111–118

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

- Kettel LM, DePaolo LV, Morales AJ, Apter D, Ling N, Yen SS (1996): Circulating levels of follistatin from puberty to menopause. Fertil Steril <u>65</u>, 472–476
- Khoury RH, Wang QF, Crowley WF, Hall JE, Schneyer AL, Toth T, Midgley AR jr, Sluss PM (1995): Serum follistatin levels in women: evidence against an endocrine function of ovarian follistatin. J Clin Endocrinol Metab <u>80</u>, 1361–1368
- Kim KS (2000): *E. coli* invasion of brain microvascular endothelial cells as a pathogenetic basis of meningitis. Subcell Biochem <u>33</u>, 47–59

- Kitaoka M, Kojima I, Ogata E (1988): Activin-A: a modulator of multiple types of anterior pituitary cells. Biochem Biophys Res Commun <u>157</u>, 48–54
- Klein R, Findlay JK, Clarke IJ, de Kretser DM, Robertson DM (1993): Radioimmunoassay of FSH-suppressing protein in the ewe: concentrations during the oestrous cycle and following ovariectomy. J Endocrinol <u>137</u>, 433–443
- Klein R, Clarke IJ, Hedger MP, Robertson DM (1996): Plasma follistatin concentrations increase following lipopolysaccharide administration in sheep. Clin Exp Pharmacol Physiol 23, 754–755
- Koedel U, Bayerlein I, Paul R, Sporer B, Pfister HW (2000): Pharmacological interference with NF-kappaB activiation attentuates pathophysiologic alterations in experimental pneumocoocal meningitis. J Immunol <u>157</u>, 5185–5191
- Koedel U, Rupprecht T, Angele B, Heesemann J, Wagner H, Pfister H, Kirschning CJ (2004): MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. Brain <u>127</u>, 1437–1445
- Kogawa K, Ogawa K, Hayashi Y, Nakamura T, Titani K, Sugino H (1991): Immunohistochemical localization of follistatin in rat tissues. Endocrinol Jpn <u>38</u>, 383–391
- Kogure K, Omata W, Kanzaki M, Zhang YQ, Yasuda H, Mine T, Kojima I (1995): A single intraportal administration of follistatin accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats. Gastroenterology <u>108</u>, 1136–1142
- Koletzko B: Kinder- und Jugendmedizin. 13. Auflage; Springer Verlag, München 2007
- Krieglstein K, Suter-Crazzolara C, Fischer WH, Unsicker K (1995): TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. EMBO J <u>14</u>, 736–742
- Lai M, Gluckman P, Dragunow M, Hughes PE (1997): Focal brain injury increases activin betaA mRNA expression in hippocampal neurons. Neuroreport <u>8</u>, 2691–2 694
- Le AV, Cho JY, Miller M, McElwain S, Golgotiu K, Broide DH (2007): Inhibition of allergen-induced airway remodeling in Smad 3-deficient mice. J Immunol <u>178</u>, 7310–7 316
- Lerch TF, Shimasaki S, Woodruff TK, Jardetzky TS (2007): Structural and biophysical coupling of heparin and activin binding to follistatin isoform functions. J Biol Chem 282, 15930–15939
- Levashina EA, Langley E, Green C, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann JA, Reichhardt JM (1999): Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient Drosophila. Science <u>285</u>, 1917–1919
- Licona P, Chimal-Monroy J, Soldevila G (2006): Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. Dev Dyn <u>235</u>, 1124–1132

Ling EA, Kaur LC, Yick TY, Wong WC (1990): Immunocytochemical localization of CR3

complement receptors with OX-42 in amoeboid microglia in postnatal rats. Anat Embryol (Berl) <u>182</u>, 481–486

- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R (1986a): Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. Nature <u>321</u>, 779–782
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R (1986b): A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. Biochem Biophys Res Commun <u>138</u>, 1129–1137
- Macconell LA, Barth S, Roberts VJ (1996): Distribution of follistatin messenger ribonucleic acid in the rat brain: implications for a role in the regulation of central reproductive functions. Endocrinology <u>137</u>, 2150–2158
- Mantovani A, Bussolino F, Dejana E (1992): Cytokine regulation of endothelial cell function. FASEB J <u>6</u>, 2591–2599
- Mason AJ, Berkemeier LM, Schmelzer CH, Schwall RH (1989): Activin B: precursor sequences, genomic structure and in vitro activities. Mol Endocrinol <u>3</u>, 1352–1358
- Massagué J, Weis-Garcia F (1996): Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. Cancer Surv <u>27</u>, 41–64
- Masuhr KF, Neumann M: Duale Reihe Neurologie. 6. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2007
- Mathews LS, Vale WW (1991): Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. Cell <u>65</u>, 973–982
- Matsuse T, Ikegami A, Ohga E, Hosoi T, Oka T, Kida K, Fukayama M, Inoue S, Nagase T, Ouchi Y, Fukuchi Y (1996): Expression of immunoreactive activin A protein in remodeling lesions associated with interstitial pulmonary fibrosis. Am J Pathol <u>148</u>, 707–713
- McCarthy SA, Bicknell R (1993): Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A. J Biol Chem <u>268</u>, 23066–23071
- McCarthy SA, Bicknell R (1994): Activin A binds to a heterotrimeric receptor complex on the vascular endothelial cell surface. Evidence for a type 3 activin receptor. J Biol Chem <u>269</u>, 3909–3912
- McClure L, O'Connor AE, Hayward S, Jenkin G, Walker DW, Phillips DJ (2005): Effects of age and pregnancy on the circulatory activin response of sheep to acute inflammatory challenge by lipopolysaccharide. J Endocrinol <u>185</u>, 139–149
- McMenamin PG (1999): Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. J Comp Neurol <u>405</u>, 553–562
- Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G (1997): Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and as-

trocytes. Am J Pathol 150, 1473-1486

- Meehan T, Schlatt S, O'Bryan MK, de Kretser DM, Loveland KL (2000): Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. Dev Biol <u>220</u>, 225–237
- Meli DN, Christen S, Leib SL (2003): Matrix metalloproteinase-9 in pneumococcal meningitis: activation via an oxidative pathway. J Infect Dis <u>187</u>, 1411–1415
- Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W (1988): Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. Proc Natl Acad Sci U S A <u>85</u>, 247–251
- Michel U, Albiston A, Findlay JK. (1990): Rat follistatin: gonadal and extragonadal expression and evidence for alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun <u>173</u>, 401–407
- Michel U, Schneider O, Kirchhof C, Meisel S, Smirnov A, Wiltfang J, Rieckmann P (1996): Production of follistatin in porcine endothelial cells: differential regulation by bacterial compounds and the synthetic glucocorticoid RU 28362. Endocrinology <u>137</u>, 4925–4934
- Michel U, Shintani Y, Nau R (1998): Serum follistatin concentrations are increased in patients with septicaemia. Clin Endocrinol (Oxf) <u>48</u>, 413–417
- Michel U, Ebert S, Schneider O, Shintani Y, Bunkowski S, Smirnov A, Stringaris A, Gerber J, Brück W, Nau R (2000): Follistatin (FS) in human cerebrospinal fluid and regulation of FS expression in a mouse model of meningitis. Eur J Endocrinol <u>143</u>, 809–816
- Michel U, Ebert S, Phillips D, Nau R (2003a): Serum concentrations of activin and follistatin are elevated and run in parallel in patients with septicemia. Eur J Endocrinol <u>148</u>, 559–564
- Michel U, Gerber J, E O'Connor A, Bunkowski S, Brück W, Nau R, Phillips DJ (2003b): Increased activin levels in cerebrospinal fluid of rabbits with bacterial meningitis are associated with activation of microglia. J Neurochem <u>86</u>, 238–245
- Moran LB, Duke DC, Graeber MB (2007): The microglial gene regulatory network activated by interferon-gamma. J Neuroimmunol <u>183</u>, 1–6

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

- Mustafa MM, Ramilo O, Sáez-Llorens X, Mertsola J, Magness RR, McCracken GH (1989): Prostaglandins E2 and I2, interleukin 1-beta, and tumor necrosis factor in cerebrospinal fluid in infants and children with bacterial meningitis. Pediatr Infect Dis J <u>8</u>, 921–922
- Mustafa MM, Ramilo O, Sáez-Llorens X, Olsen KD, Magness RR, McCracken GH (1990): Cerebrospinal fluid prostaglandins, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor in bacterial meningitis. Clinical and laboratory correlations in placebo-treated and dex-

amethasone-treated patients. Am J Dis Child 144, 883-887

Muzio M, Mantovani A (2000): Toll-like receptors. Microbes Infect 3, 251-255

- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H (1990): Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. Science <u>247</u>, 836–838
- Nau GJ, Schlesinger A, Richmond JFL, Young RA (2003): Cumulative Toll-like receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria. J Immunol. <u>170</u>, 5203–5209
- Nüsing RM, Barsig J (1999): Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. Br J Pharmacol <u>127</u>, 919–926
- O'Connor AE, McFarlane JR, Hayward S, Yohkaichiya T, Groome NP, de Kretser DM (1999): Serum activin A and follistatin concentrations during human pregnancy: a cross-sectional and longitudinal study. Hum Reprod <u>14</u>, 827–832
- Ogawa K, Funaba M, Chen Y, Tsujimoto M (2006): Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages. J Immunol <u>177</u>, 6787–6794
- Ogihara T, Watada H, Kanno R, Ikeda F, Nomiyama T, Tanaka Y, Nakao A, German MS, Kojima I, Kawamari R (2003): p38 MAPK is involved in activin A- and hepatocyte growth factor-mediated expression of pro-endocrine gene neurogenin 3 in AR42J-B13 cells. J Biol Chem <u>278</u>, 21693–21700
- Ohga S, Aoki T, Okada K, Akeda H, Fujioka K, Ohshima A, Mori T, Minamishima I, Ueda K (1994): Cerebrospinal fluid concentrations of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha, and interferon gamma in bacterial meningitis. Arch Dis Child <u>70</u>, 123–125
- Orihuela CJ, Mahdavi J, Thornton J, Mann B, Wooldridge KG, Abouseada N, Oldfield NJ, Self T, Ala'Aldeen DA, Tuomanen EL (2009): Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. J Clin Invest <u>119</u>, 1638–1646
- Patella S, Phillips DJ, Tchongue J, de Kretser DM, Sievert W (2006): Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol <u>290</u>, G137–144
- Persson U, Souchelnytskyi S, Franzén P, Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH (1997): Transforming growth factor (TGF-beta)-specific signaling by chimeric TGF-beta type II receptor with intracellular domain of activin type IIB receptor. J Biol Chem <u>272</u>, 21187–21194
- Petraglia F, Sacerdote P, Cossarizza A, Angioni S, Genazzani AD, Franceschi C, Muscettola M, Grasso G (1991): Inhibin and activin modulate human monocyte chemotaxis and human lymphocyte interferon-gamma production. J Clin Endocrinol Metab <u>72</u>, 496–502

- Phillips DJ, de Kretser DM (1998): Follistatin: a multifunctional regulatory protein. Front Neuroendocrinol <u>19</u>, 287–322
- Phillips DJ, Nguyen P, Adamides AA, Bye N, Rosenfeld JV, Kossmann T, Vallance S, Murray L, Morganti-Kossmann MC (2006): Activin a release into cerebrospinal fluid in a subset of patients with severe traumatic brain injury. J Neurotrauma 23, 1283–1294
- Pirisi M, Fabris C, Luisi S, Santuz M, Toniutto P, Vitulli D, Federico E, Del Forno M, Mattiuzzo M, Branca B, Petraglia F (2000): Evaluation of circulating activin A as a serum marker of hepatocellular carcinoma. Cancer Detect Prev <u>24</u>, 150–155
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, et al. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science <u>282</u>, 2085–2088
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Duale Reihe Biochemie. 2. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2008
- Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (2009): Toll-like receptor prestimulation increases phagocytosis of *Escherichia coli* DH5alpha and *Escherichia coli* K1 strains by murine microglial cells. Infect Immun <u>77</u>, 557–564
- Ribes S, Adam N, Ebert S, Regen T, Bunkowski S, Hanisch U, Nau R (2010a): The viral TLR3 agonist poly(I:C) stimulates phagocytosis and intracellular killing of *Escherichia col*i by microglial cells. Neurosci Lett <u>482</u>, 17–20
- Ribes S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch UK, et al. (2010b): Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. Infect Immun <u>78</u>, 865–871
- Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI (1998): Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. J Clin Invest <u>102</u>, 347–360
- Ring A, Braun JS, Nizet V, Stremmel W, Shenep JL (2000): Group B streptococcal betahemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages. J Infect Dis <u>182</u>, 150–157
- Roberts VJ, Barth SL (1994): Expression of messenger ribonucleic acids encoding the inhibin/activin system during mid- and late-gestation rat embryogenesis. Endocrinology <u>134</u>, 914–923
- Roberts VJ, Barth SL, Meunier H, Vale W (1996): Hybridization histochemical and immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits and messenger ribonucleic acids in the rat brain. J Comp Neurol <u>364</u>, 473–493
- Robertson DM, Klein R, de Vos FL, McLachlan RI, Wettenhall RE, Hearn MT, Burger HG, de Kretser DM (1987): The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. Biochem Biophys Res Commun <u>149</u>, 744–749

- Robertson DM, Foulds LM, Prisk M, Hedger MP (1992): Inhibin/activin beta-subunit monomer: isolation and characterization. Endocrinology <u>130</u>, 1680–1687
- Robson NC, Phillips DJ, McAlpine T, Shin A, Svobodova S, Toy T, Pillay V, Kirkpatrick N, Zanker D, Wilson K, et al. (2008): Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. Blood <u>111</u>, 2733–2743
- Russo TA, Johnson JR (2000): Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J Infect Dis <u>181</u>, 1753–1754
- Russo TA, Johnson JR (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes Infect <u>5</u>, 449–456
- Sakamoto Y, Shintani Y, Harada K, Abe M, Shitsukawa K, Saito S (1996): Determination of free follistatin levels in sera of normal subjects and patients with various diseases. Eur J Endocrinol <u>135</u>, 345–351
- Schleifer KH, Kandler O (1972): Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol Rev <u>36</u>, 407–477
- Schneider O, Nau R, Michel U (2000): Comparative analysis of follistatin-, activin beta Aand activin beta B-mRNA steady-state levels in diverse porcine tissues by multiplex S1 nuclease analysis. Eur J Endocrinol <u>142</u>, 537–544
- Schubert D, Kimura H, LaCorbiere M, Vaughan J, Karr D, Fischer WH (1990): Activin is a nerve cell survival molecule. Nature <u>344</u>, 868–870
- Schwall RH, Robbins K, Jardieu P, Chang L, Lai C, Terrell TG (1993): Activin induces cell death in hepatocytes *in vivo* and *in vitro*. Hepatology <u>18</u>, 347–356
- Segura MA, Cléroux P, Gottschalk M (1998): Streptococcus suis and group B Streptococcus differ in their interactions with murine macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol <u>21</u>, 189–195
- Semitekolou M, Alissafi T, Aggelakopoulou M, Kourepini E, Kariyawasam HH, Kay AB, Robinson DS, Lloyd CM, Panoutsakopoulou V, Xanthou G (2009): Activin-A induces regulatory T cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease. J Exp Med 206, 1769–1785
- Shimasaki S, Koga M, Esch F, Mercado M, Cooksey K, Koba A, Ling N (1988): Porcine follistatin gene structure supports two forms of mature follistatin produced by alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun <u>152</u>, 717–723
- Shimizu A, Kato M, Nakao A, Imamura T, ten Dijke P, Heldin CH, Kawabata M, Shimada S, Miyazono K (1998): Identification of receptors and Smad proteins involved in activin signalling in a human epidermal keratinocyte cell line. Genes Cells <u>3</u>, 125–134

Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S, Ling N (1991): Follistatin Binds to both Activin

and Inhibin through the Common Beta-Subunit. Endocrinology <u>128</u>, 3313–3315

- Shoham T, Parameswaran R, Shav-Tal Y, Barda-Saad M, Zipori D (2003): The mesenchymal stroma negatively regulates B cell lymphopoiesis through the expression of activin A. Ann N Y Acad Sci <u>996</u>, 245–260
- Shoji H, Nakamura T, van den Eijnden-van Raaij AJ, Sugino H (1998): Identification of a novel type II activin receptor, type IIA-N, induced during the neural differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun <u>246</u>, 320–324
- Shukla A, Dikshit M, Srimal RC (1995): Nitric oxide modulates blood-brain barrier permeability during infections with an inactivated bacterium. Neuroreport <u>6</u>, 1629–1632
- Sivagnanam V, Zhu X, Schlichter LC (2010): Dominance of *E. coli* phagocytosis over LPS in the inflammatory response of microglia. J Neuroimmunol <u>227</u>, 111–119
- Smith C, Yndestad A, Halvorsen B, Ueland T, Waehre T, Otterdal K, Scholz H, Endresen K, Gullestad L, Frøland SS, et al. (2004): Potential anti-inflammatory role of activin A in acute coronary syndromes. J Am Coll Cardiol <u>44</u>, 369–375
- Smith ME, van der Maesen K, Somera FP (1998): Macrophage and microglial responses to cytokines *in vitro*: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. J Neurosci Res <u>54</u>, 68–78
- Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Häcker H, Heeg K, Wagner H (1997): Bacterial DNA causes septic shock. Nature <u>386</u>, 336–337
- Stamler R, Keutmann HT, Sidis Y, Kattamuri C, Schneyer A, Thompson TB (2008): The structure of FSTL3.activin A complex. Differential binding of N-terminal domains influences follistatin-type antagonist specificity. J Biol Chem <u>283</u>, 32831–32838
- Sterka D, Marriott I (2006): Characterization of nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) protein expression in primary murine microglia. J Neuroimmunol <u>179</u>, 65–75
- Sternberg D, Honigwachs-Sha'anani J, Brosh N, Malik Z, Burstein Y, Zipori D (1995): Restrictin-P/stromal activin A, kills its target cells via an apoptotic mechanism. Growth Factors <u>12</u>, 277–287
- Sugama S, Takenouchi T, Kitani H, Fujita M, Hashimoto M (2007): Activin as an antiinflammatory cytokine produced by microglia. J Neuroimmunol <u>192</u>, 31–39
- Sugiyama M, Ichida T, Sato T, Ishikawa T, Matsuda Y, Asakura H (1998): Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers. Gastroenterology <u>114</u>, 550–558
- Suzumura A, Marunouchi T, Yamamoto H (1991): Morphological transformation of microglia *in vitro*. Brain Res <u>545</u>, 301–306
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and grampositive bacterial cell wall components. Immunity <u>11</u>, 443–451

- Tauber SC, Ebert S, Weishaupt JH, Reich A, Nau R, Gerber J (2009): Stimulation of Tolllike receptor 9 by chronic intraventricular unmethylated cytosine-guanine DNA infusion causes neuroinflammation and impaired spatial memory. J Neuropathol Exp Neurol <u>68</u>, 1116–1124
- Tretter YP, Munz B, Hübner G, ten Bruggencate G, Werner S, Alzheimer C (1996): Strong induction of activin expression after hippocampal lesion. Neuroreport <u>7</u>, 1819–1823
- Tuuri T, Erämaa M, Hildén K, Ritvos O (1994): The tissue distribution of activin beta Aand beta B-subunit and follistatin messenger ribonucleic acids suggests multiple sites of action for the activin-follistatin system during human development. J Clin Endocrinol Metab <u>78</u>, 1521–1524
- Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R (1987): Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. Proc Natl Acad Sci U S A <u>84</u>, 8282–8286
- Unhand M, Mustafa MM, McCracken GHJr., Nelson JD (1993): Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. J Pediatr <u>122</u>,15–21
- Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J (1986): Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. Nature <u>321</u>, 776–779
- Van Pottelberge GR, Bracke KR, Demedts IK, De Rijck K, Reinartz SM, van Drunen CM, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG (2010): Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. Respir Res <u>11</u>, 35
- Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T (1989): Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. J Exp Med <u>170</u>, 1859–1867
- Wada M, Shintani Y, Kosaka M, Sano T, Hizawa K, Saito S (1996): Immunohistochemical localization of activin A and follistatin in human tissues. Endocr J <u>43</u>, 375–385
- Wakatsuki M, Shintani Y, Abe M, Liu ZH, Shitsukawa K, Saito S (1996): Immunoradiometric assay for follistatin: serum immunoreactive follistatin levels in normal adults and pregnant women. J Clin Endocrinol Metab <u>81</u>, 630–634
- Wang M, Liu A, Garcia FU, Rhim JS, Stearns ME (1999): Growth of HPV-18 immortalized human prostatic intraepithelial neoplasia cell lines. Influence of IL-10, follistatin, activin-A, and DHT. Int J Oncol <u>14</u>, 1185–1195
- Wang S, Tai G, Zhang P, Mu D, Zhang X, Liu Z (2008): Inhibitory effect of activin A on activation of lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. Cytokine <u>42</u>, 85–91
- Wang Y, Cui X, Tai G, Ge J, Li N, Chen F, Yu F, Liu Z (2009): A critical role of activin A in maturation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo. Cell Mol Immunol

<u>6</u>, 387–392

- Wekerle H, Schwab M, Linington C, Meyermann R (1986): Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. Eur J Immunol <u>16</u>, 1551–1557
- Wellmer A, Noeske C, Gerber J, Munzel U, Nau R (2000): Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. Neurosci Lett <u>296</u>, 137–140
- Wilms H, Schwark T, Brandenburg L, Sievers J, Dengler R, Deuschl G, Lucius R (2010): Regulation of activin A synthesis in microglial cells: pathophysiological implications for bacterial meningitis. J Neurosci Res <u>88</u>, 16–23
- Wilson KM, Smith AI, Phillips DJ (2006): Stimulatory effects of lipopolysaccharide on endothelial cell activin and follistatin. Mol Cell Endocrinol <u>253</u>, 30–35
- Winkler F, Koedel U, Kastenbauer S, Pfister HW (2001): Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. J Infect Dis <u>183</u>, 1749–1759
- Wohlfahrt JG, Kunzmann S, Menz G, Kneist W, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB (2003): T cell phenotype in allergic asthma and atopic dermatitis. Int Arch Allergy Immunol <u>131</u>, 272–282
- Wu DD, Lai M, Hughes PE, Sirimanne E, Gluckman PD, Williams CE (1999): Expression of the activin axis and neuronal rescue effects of recombinant activin A following hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. Brain Res <u>835</u>, 369–378
- Yamada R, Suzuki T, Hashimoto M, Eto Y, Shiokawa K, Muramatsu M (1992): Induction of differentiation of the human promyelocytic cell line HL-60 by activin/EDF. Biochem Biophys Res Commun <u>187</u>, 79–85
- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2002a): Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. J Immunol <u>169</u>, 6 668–6672
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, et al. (2002b): Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature <u>420</u>, 324–329
- Yamashita N, Nakajima T, Takahashi H, Kaneoka H, Mizushima Y, Sakane T (1993): Effects of activin A on IgE synthesis and cytokine production by human peripheral mononuclear cells. Clin Exp Immunol <u>94</u>, 214–219
- Yasuda H, Mine T, Shibata H, Eto Y, Hasegawa Y, Takeuchi T, Asano S, Kojima I (1993): Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. J Clin Invest <u>92</u>, 1491–1496

Ying SY, Becker A, Swanson G, Tan P, Ling N, Esch F, Ueno N, Shimasaki S, Guillemin

R (1987): Follistatin specifically inhibits pituitary follicle stimulating hormone release in vitro. Biochem Biophys Res Commun <u>149</u>, 133–139

- Yndestad A, Ueland T, Øie E, Florholmen G, Halvorsen B, Attramadal H, Simonson S, Frøland SS, Christensen G. Damås JK, Aukrust P (2004): Elevated levels of activin A in heart failure: potential role in myocardial remodeling. Circulation <u>109</u>, 1379–1385
- Yndestad A, Larsen K, Oie E, Ueland T, Smith C, Halvorsen B, Sjaastad I, Skjønsberg OH, Pederson TM, Anfinsen OG, et al. (2009): Elevated levels of activin A in clinical and experimental pulmonary hypertension. J Appl Physiol <u>106</u>, 1356–1364

You L, Kruse FE (2002): Differential effect of activin A and BMP-7 on myofibroblast differentiation and the role of the Smad signaling pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci 43, 72–81

- Yu EW, Dolter KE, Shao LE, Yu J (1998): Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies. Clin Exp Immunol <u>112</u>, 126–132
- Yuen MF, Norris S, Evans LW, Langley PG, Hughes RD (2002): Transforming growth factor-beta 1, activin and follistatin in patients with hepatocellular carcinoma and patients with alcoholic cirrhosis. Scand J Gastroenterol <u>37</u>, 233–238
- Zhang L, Deng M, Parthasarathy R, Wang L, Mongan M, Molkentin JD, Zheng Y, Xia Y (2005): MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. Mol Cell Biol <u>25</u>, 60–65
- Zhang XJ, Li Y, Tai GX, Xu GY, Zhang PY, Yang Y, Lao FX, Liu ZH (2005): Effects of activin A on the activities of the mouse peritoneal macrophages. Cell Mol Immunol <u>2</u>, 63–67
- Zhou J, Tai G, Liu H, Ge J, Feng Y, Chen F, Yu F, Liu Z (2009): Activin A downregulates the phagocytosis of lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo*. Cell Immunol <u>255</u>, 69–75

DANKSAGUNGEN

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Roland Nau für Überlassung des Dissertationsthemas, die intensive und sehr gute Betreuung.

Besonders bedanke ich mich auch bei Frau Dr. med. Sandra Schütze für ihre intensive und sehr gute Betreuung sowie die Durchsicht des Manuskripts. Außerdem danke ich ihr für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Frau Dr. rer. nat. Sandra Ribes danke ich für die Vermittlung von methodischen Fertigkeiten und ihre Hilfe bei methodischen sowie statistischen Fragen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Sandra Redlich, Dipl.-Biologin, für die Hilfe bei methodischen Fragen und die gegenseitige Unterstützung im Labor.

Ich möchte mich außerdem bei Frau Stefanie Bunkowski, der medizinisch technischen Angestellten der Arbeitsgruppe, für ihre technische Unterstützung bedanken.

Frau Frederike Dießelberg danke ich für die Durchsicht der vorliegenden Arbeit auf Rechtschreibung und Grammatik.

LEBENSLAUF

Am 01. November 1986 wurde ich, Catharina Dießelberg, in Oldenburg (Oldb.) als älteste Tochter von Gerald H. Dießelberg und Elke A. von Maydell, geborene Loewenstein, geschiedene Dießelberg, geboren. Mein Vater ist Geschäftsführer einer GmbH & Co.KG und meine Mutter gelernte Bankkauffrau. Ich wuchs zusammen mit meiner Schwester Frederike Dießelberg (geboren 1988) und meinen beiden Brüdern Christopher Dießelberg (geboren 1991) und Marc-Brian Dießelberg (geboren 1993) in Wüsting (Gemeinde Hude) auf.

Von 1993 bis 1997 besuchte ich die Grundschule in Wüsting, von 1997 bis 1999 die Orientierungsstufe in Hude und von 1999 bis 2006 die Graf-Anton-Günther-Schule in Oldenburg, welche ich 2006 mit der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) abschloss. Von August 2003 bis Januar 2004 nahm ich an einem Schüleraustausch in die USA teil und besuchte die Eden-Valley-Watkins-Highschool. 2002 gewann ich zusammen mit Lena Richter den Schülerwettbewerb des DLR_School_Labs in Göttingen und 2003 erreichten wir den 3. Platz beim Landeswettbewerb ,Jugend Forscht'.

Von August 2006 bis April 2007 absolvierte ich ein Freiwilliges Soziales Jahr im Klinikum Oldenburg in der Allgemein- und Herzchirurgie. Im April 2007 begann ich mein Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen und im März 2009 bestand ich den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Die Experimente für meine Promotionsarbeit führte ich von August 2008 bis Dezember 2010 durch. Zurzeit studiere ich im 10. Semester (6. Klinisches Semester) und werde voraussichtlich im Frühjahr 2012 das Praktische Jahr beginnen. 2013 werde ich wahrscheinlich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen beenden.