

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck
Leitung: Prof. Dr. med. E. Herting**

**Analyse der durch Meningokokken stimulierten altersabhängigen Bildung
proinflammatorischer Zytokine und deren Beeinflussung
durch Erythropoietin**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Medizinische Fakultät –

vorgelegt von
Janna Zimmer aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Schultz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Kerstin Oltmanns

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.05.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Erkrankungen durch Meningokokken	1
1.1.1	Erreger und Epidemiologie	1
1.1.2	Klinisches Bild	2
1.1.3	Therapie	2
1.1.4	Impfung	3
1.2	Zytokine	4
1.2.1	Definition, allgemeine Funktionen	4
1.2.2	Die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α	5
1.2.3	IL-6, IL-8 und TNF- α bei Erkrankungen durch Meningokokken	6
1.3	Erythropoietin	7
1.3.1	Gewebeprotective Eigenschaften	7
1.3.2	Erythropoietin als Therapeutikum	8
2	Fragestellung	10
3	Probanden	12
3.1	Zusammensetzung des Probandenkollektivs	12
3.2	Ein- und Ausschlusskriterien	13
4	Material	14
4.1	Geräte und Computerprogramme	14
4.2	Reagenzien	14
4.3	Monoklonale Antikörper	15
5	Methode	16
5.1	Vorbereitung der Zellen für die Messung	16
5.1.1	Ansatz der Zellkultur und Stimulation	16
5.1.2	Fixation der Zellen	18
5.1.3	Färbung der Zytokine	18
5.2	Versuchsprotokoll	20
5.3	Durchflusszytometrische Messung	22
5.4	Statistik	23

6 Ergebnisse	24
6.1 Zytokinbildung in Abhängigkeit vom eingesetzten Stimulans	24
6.1.1 IL-6-Bildung	24
6.1.1.1 LPS versus Meningokokken	24
6.1.1.2 Serogruppe A versus Serogruppe B	25
6.1.2 IL-8-Bildung	26
6.1.3 TNF- α -Bildung	27
6.1.3.1 LPS versus Meningokokken	27
6.1.3.2 Serogruppe A versus Serogruppe B	29
6.2 Zytokinbildung in Abhängigkeit vom Alter der Probanden	30
6.2.1 IL-6-Bildung	31
6.2.1.1 LPS	31
6.2.1.2 Meningokokken	32
6.2.2 IL-8-Bildung	33
6.2.2.1 LPS	33
6.2.2.2 Meningokokken	34
6.2.3 TNF- α -Bildung	35
6.2.3.1 LPS	35
6.2.3.2 Meningokokken	36
6.2.4 Korrelation zwischen Kindesalter und Zytokinbildung	37
6.2.4.1 IL-6-Bildung	37
6.2.4.2 IL-8-Bildung	37
6.2.4.3 TNF- α -Bildung	37
6.3 Beeinflussung der Zytokinbildung durch Erythropoietin	38
6.3.1 Neugeborene	38
6.3.1.1 IL-6	39
6.3.1.2 IL-8	39
6.3.1.3 TNF- α	40
6.3.2 Kinder	41
6.3.2.1 IL-6	42
6.3.2.2 IL-8	43
6.3.2.3 TNF- α	44
6.3.3 Erwachsene	45
6.3.3.1 IL-6	46
6.3.3.2 IL-8	47
6.3.3.3 TNF- α	48

7	Diskussion	49
7.1	Untersuchung der Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken im Vergleich zur Stimulation mit LPS	50
7.2	Untersuchung der Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A im Vergleich zur Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe B	54
7.3	Untersuchung der Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit LPS bzw. Meningokokken in Abhängigkeit vom Alter	55
7.4	Untersuchung des Einflusses von Erythropoietin auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken	61
8	Zusammenfassung	69
I	Abbildungs-/Tabellenverzeichnis	70
II	Literaturverzeichnis	72
III	Danksagung	92
IV	Lebenslauf und Veröffentlichungen	93

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
CD14	Differenzierungsantigen 14 (<i>cluster of differentiation</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Einw.	Einwohner
Epo	Erythropoietin
Epo-R	Erythropoietin-Rezeptor
Erkr.	Erkrankungen
Erw	Erwachsene
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethanol sulfonsäure
IE	Internationale Einheiten
IMD	invasive Meningokokkenerkrankung (<i>invasive meningococcal disease</i>)
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
K	Kinder
KDO	2-Keto-3-desoxyoctonat
KK	Kleinkinder
LPS	Lipopolysaccharid
MenA	Meningokokken der Serogruppe A
MenB	Meningokokken der Serogruppe B
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> , synonym Meningokokken
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NG	Neugeborene
OMV	<i>outer membrane vesicles</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC5	Phycoerythrin-Cyanin 5.1
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd(lösung)
rBPI ₂₁	<i>recombinant bactericidal permeability increasing protein₂₁</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RPMI 1640	Kulturmedium (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
Sgl	Säuglinge
SSW	Schwangerschaftswoche
STIKO	Ständige Impfkommission
t-PA	Gewebe-Plasminogenaktivator (<i>tissue plasminogen activator</i>)
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U/min	Umdrehungen pro Minute
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Erkrankungen durch Meningokokken

1.1.1 Erreger und Epidemiologie

Meningokokkenerkrankungen werden durch Bakterien der Art *Neisseria meningitidis*, synonym Meningokokken, hervorgerufen. Es handelt sich um gramnegative Diplokokken, die sich auch bei Teilen der gesunden Bevölkerung im Nasen-Rachen-Raum nachweisen lassen. Die Zahl der gesunden Keimträger nimmt unter den Heranwachsenden zu und erreicht im jungen Erwachsenenalter unter Studenten und Soldaten Anteile von bis über 30% (Robinson et al. 2002, Claus et al. 2005, Gardner 2006, Stephens et al. 2007). Die Übertragung erfolgt als Tröpfcheninfektion (Robert Koch-Institut (RKI) 2009a). Aufgrund der Zusammensetzung der kapsulären Polysaccharide werden 12 bis 13 verschiedene Serogruppen unterschieden (Stephens et al. 2007, Caugant und Maiden 2009, Sadarangani und Pollard 2010). Weltweit hauptverantwortlich für invasive Meningokokkenerkrankungen (IMD) sind die Serogruppen A, B, C, W 135 und Y (Caugant und Maiden 2009, Feavers und Pizza 2009). In Deutschland und Europa sind die Meningokokken der Serogruppe B die mit Abstand häufigsten Erreger. In den vergangenen Jahren machten in Deutschland die Serogruppe B etwa 70% und die Serogruppe C etwa 25% der Erkrankungen aus (EU-IBIS 2007, RKI 2009a). Dagegen findet sich weltweit die Serogruppe A als häufigster Erreger. Sie ist verantwortlich für wiederholt auftretende große Epidemien im sogenannten afrikanischen Meningitisgürtel und in Asien (Stephens et al. 2007, Harrison et al. 2009). Die durchschnittliche Inzidenz invasiver Erkrankungen (Erkr.) durch Meningokokken lag in Deutschland in den Jahren 1990 bis 2005 bei 0,9 Erkr./100 000 Einwohner (Einw.) (RKI 2006). In den Jahren 2006 und 2007 gab es einen leichten Rückgang auf 0,67 und 0,53 Erkr./100 000 Einw. und im Jahr 2008 betrug die Inzidenz nahezu unverändert 0,55 Erkr./100 000 Einw. (RKI 2009b). Erkrankungen durch Meningokokken treten in jedem Lebensalter, ganz besonders häufig aber in den ersten Lebensjahren auf. Etwa ein Drittel aller IMD betrifft Kinder unter 5 Jahren (Harrison et al. 2009, RKI 2009a). Die höchste Inzidenz mit 10 Erkr./100 000 Einw. bzw. 15% der Erkrankungsfälle in Deutschland findet sich in den ersten 12 Lebensmonaten. Die Letalität beträgt in Deutschland knapp 10%. In Abhängigkeit vom klinischen Bild schwankt die Letalität zwischen 3% bei alleinigem Vorliegen einer Meningitis bis über 30% beim Waterhouse-Friderichsen-Syndrom (RKI 2009a).

1.1.2 Klinisches Bild

Werden die Schleimhäute eines asymptomatischen Keimträgers von den Meningokokken durchbrochen, so gelangen die Keime in die Blutbahn. Gelingt dort nicht die sofortige Abwehr, kann eine schnelle Vermehrung der Bakterien mit schweren Erkrankungen die Folge sein (Caugant und Maiden 2009, RKI 2009a). Häufigste Verlaufsform schwerer Meningokokkenerkrankungen ist mit über der Hälfte der Fälle die eitrige Meningitis, gefolgt vom ausschließlichen Vorliegen einer Sepsis in etwa einem Viertel der Fälle (Kaplan et al. 2006, RKI 2010). In 10-15% findet sich ein Waterhouse-Friderichsen-Syndrom, die besonders fulminant verlaufende Form der Meningokokkensepsis (RKI 2010). Als Symptome und Komplikationen einer IMD zeigen sich u.a. die klassischen klinischen Zeichen einer bakteriellen Meningitis, makulo-papulöse oder petechiale Exantheme oder eine Purpura fulminans, Krampfanfälle, Hirnödem, Verbrauchskoagulopathie mit Nekrosen, Schock und Multiorganversagen (Mercier et al. 1988, Stephens et al. 2007, RKI 2010). Darüber hinaus haben Überlebende häufig unter dauerhaften Folgen der Erkrankung zu leiden. Nach einer Meningitis kommt es in über 10% der Fälle zu Innenohrschädigungen mit Schwerhörigkeit bis hin zur Taubheit. Weitere mögliche Langzeitfolgen nach IMD sind u.a. Blindheit, Transplantationen und Amputationen als Folge von Nekrosen und Gangrän, Knochenschäden und Störungen des Skelettwachstums, Krampfleiden sowie neuromotorische Behinderungen unterschiedlichsten Ausmaßes (Bedford et al. 2001, Kaplan et al. 2006, RKI 2006). Im Säuglingsalter an einer Meningitis erkrankte Kinder und Jugendliche zeigen zudem signifikant häufiger Verhaltensauffälligkeiten und Lernstörungen (Bedford et al. 2001, Halket et al. 2003, de Louvois et al. 2007).

1.1.3 Therapie

Invasive Erkrankungen durch Meningokokken gehen noch immer mit einer hohen Morbidität und Letalität bei zuvor völlig gesunden Kindern einher. Die schnellstmögliche kausale Therapie mit Antibiotika ist entscheidend in der Behandlung der IMD. Zusätzlich ist die Gabe von Dexamethason heute in der Therapie der bakteriellen Meningitis vielerorts etabliert, dabei aber durchaus umstritten (Greenwood 2007, Pollard et al. 2007, Siberry und McMillan 2008, Peltola und Roine 2009, Schrotten et al. 2009). Der vielfach aufgeführte Nutzen von Dexamethason, insbesondere hinsichtlich einer Senkung des Risikos schwerer Hörschädigungen (van de Beek et al. 2007), muss aufgrund widersprechender Studienergebnisse kritisch hinterfragt werden (Peltola et al. 2007, Mongelluzzo et al. 2008, Peltola et al. 2010). Trotz großer medizinischer Fortschritte in den vergangenen Jahrzehnten blieb die Letalität der IMD in dieser Zeit nahezu unverändert (Havens et al. 1989, RKI 2009a). Zahlreiche adjuvante Therapieversuche z.B. mit dem Endotoxin-bindenden Protein rBPI₂₁ (Levin et al. 2000), Antiseren gegen den mutierten *Escherichia coli*-Typen J5 (J5 Study Group 1992), humanem monoklonalen Endotoxin-(Lipid A-)Antikörper HA-1A

(Derkx et al. 1999) oder Gewebe-Plasminogenaktivator t-PA (Zenz et al. 2004) konnten keine überzeugende Reduktion von Morbidität und Letalität erreichen. Aktiviertes Protein C zeigt in der Behandlung erwachsener Sepsispatienten positive Effekte (Bernard et al. 2001, Vincent et al. 2005). Es ist für die Therapie im Kindesalter wegen fehlender Belege einer ausreichenden Wirksamkeit sowie des Blutungsrisikos unter Therapie jedoch nicht empfohlen (Goldstein et al. 2006, Dellinger et al. 2008).

1.1.4 Impfung

Aufgrund der nach wie vor unzureichenden Behandlungserfolge kommt der Prophylaxe invasiver Erkrankungen durch Meningokokken eine besonders wichtige Rolle zu. Impfungen gegen Meningokokken der Serogruppen A, C, W 135 und Y mit einem Polysaccharidimpfstoff wurden in Deutschland erstmals 1988 von der Ständigen Impfkommision (STIKO) als Indikationsimpfungen für Risikopersonen empfohlen (RKI 2006). Die Polysaccharidimpfstoffe bieten der hauptsächlich gefährdeten Altersgruppe der Säuglinge und Kleinkinder jedoch keinen wirksamen Schutz vor Meningokokkenerkrankungen. In diesem Alter haben die Polysaccharidimpfstoffe nur eine geringe immunogene Wirkung und induzieren kein immunologisches Gedächtnis. Zudem verursachen sie ein sogenanntes *hyporesponsiveness*-Phänomen, d.h. bei Wiederimpfung kommt es zu einer verminderten Immunantwort (MacDonald et al. 1998, MacLennan et al. 1999, Borrow et al. 2000, RKI 2006). Besser geeignet sind dagegen Konjugatimpfstoffe, die auch schon im frühen Kindesalter zu einem wirksamen Impfschutz führen (MacDonald et al. 1998, RKI 2006, Snape et al. 2008, Black et al. 2010). In Deutschland wird von der STIKO seit dem Jahr 2006 die einmalige Impfung mit einem konjugierten Meningokokken-C-Impfstoff für alle Kinder im 2. Lebensjahr zum frühestmöglichen Zeitpunkt empfohlen (RKI 2006). Daten aus Großbritannien zeigen nach einer dort bereits im Jahr 1999 eingeführten Impfung mit einem konjugierten Meningokokken-C-Impfstoff einen deutlichen Rückgang der IMD durch diese Serogruppe sowohl bei geimpften als auch bei nicht-geimpften Kindern und Jugendlichen (Miller et al. 2001, Ramsay et al. 2001 und 2003, Pollard et al. 2007, Campbell et al. 2009). Ursächlich für den indirekten Schutz auch Nicht-Geimpfter ist möglicherweise die nachgewiesene Reduktion der Anzahl asymptomatischer Keimträger nach Impfung (Maiden und Stuart 2002). Auch die Wirksamkeit eines tetravalenten konjugierten Impfstoffs gegen die Serogruppen A, C, W 135 und Y konnte für das Säuglings- und frühe Kindesalter nachgewiesen werden (Snape et al. 2008, Black et al. 2010). Schwierigkeiten bereitet dagegen weiterhin die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Meningokokken der Serogruppe B, also den in Deutschland wie auch in vielen anderen Ländern häufigsten IMD-Erreger. Erschwert wird die Entwicklung einer B-Vakzine u.a. durch Ähnlichkeiten der Polysaccharide der B-Kapsel mit Glykoproteinen des menschlichen Gehirns und durch die geringe

Immunogenität der B-Polysaccharide (Finne et al. 1983). Die Entwicklung eines Impfstoffes konzentriert sich daher stattdessen auf sogenannte *outer membrane vesicles* (OMV) und Proteinantigene auf der Bakterienzelloberfläche (Feavers und Pizza 2009, Holst et al. 2009, Sadarangani und Pollard 2010). Erfolgreiche Anwendung fanden OMV-Impfstoffe, die zur gezielten Eindämmung epidemisch auftretender IMD z.B. in Neuseeland speziell gegen einen Meningokokkenklon entwickelt wurden. Aufgrund ihrer Stammspezifität bieten diese darüber hinaus aber keinen sicheren Schutz gegen andere B-Meningokokken (Bjune et al. 1991, Sexton et al. 2004, Sandbu et al. 2007, Wong et al. 2007, O'Hallahan et al. 2009). Auf der Suche nach einer geeigneten Impfung gegen verschiedene B-Meningokokken könnte die Kombination von Impfstoffen gegen einzelne Klone eine Option darstellen (Boutriau et al. 2007, Sandbu et al. 2007, Holst et al. 2009). Doch trotz der Bemühungen in den vergangenen Jahrzehnten und zahlreichen klinischen Studien gibt es noch immer keinen breit wirksamen, kommerziell zur Verfügung stehenden Impfstoff gegen Meningokokken der Serogruppe B (Harrison 2008, Holst et al. 2009, Sadarangani und Pollard 2010).

1.2 Zytokine

1.2.1 Definition, allgemeine Funktionen

Als Zytokine werden überbegrifflich eine Vielzahl von Mediatoren bezeichnet, mit deren Hilfe Zellen miteinander kommunizieren. Dieses gilt insbesondere auch für die Zellen des Immunsystems. Zytokine regulieren u.a. das Wachstum, die Differenzierung und die Aktivierung dieser Zellen und übernehmen damit eine bedeutsame Rolle in der Vermittlung der angeborenen Immunantwort. Darüber hinaus sind heute zahlreiche weitere physiologische Funktionen der Zytokine u.a. für die Hämatopoese und das Nervensystem bekannt. Zu den Zytokinen werden die Interleukine, Interferone, koloniestimulierenden Faktoren, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Tumornekrosefaktoren gerechnet. Sie interagieren in einem komplizierten Netzwerk, in dem ein einzelnes Zytokin mehrere verschiedene biologische Funktionen übernimmt und einzelne Funktionen wiederum von mehreren verschiedenen Zytokinen übernommen werden. Grundsätzlich lässt sich zwischen den vorwiegend proinflammatorisch und den vorwiegend antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen unterscheiden. Eine genaue Regulierung der Synthese und des komplexen Zusammenspiels der Zytokine ist unabdingbar, da eine Störung des Gleichgewichts zu schädlichen Effekten auf den Organismus führen kann. So ist die Bildung proinflammatorischer Zytokine einerseits eine wichtige Komponente der physiologischen Immunabwehr, andererseits aber auch mitbeteiligt an der Entstehung und Unterhaltung von Entzündungsprozessen. Neben der

Mitverantwortung in der Pathogenese autoimmunologischer Erkrankungen ist als besonders dramatisches Beispiel die Rolle der proinflammatorischen Zytokine in der Vermittlung des septischen Schocks zu nennen (Strober und James 1988, Kishimoto et al. 1995, Rothwell 1999, Hackett et al. 2001, Janeway und Medzhitov 2002, Blanco et al. 2008, de Araujo et al. 2009, Deverman und Patterson 2009).

Im Folgenden werden kurz die in dieser Arbeit untersuchten proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Kap. 1.2.2) und deren Zusammenhang mit Meningokokkenerkrankungen dargestellt (Kap. 1.2.3).

1.2.2 Die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α

Interleukin-6 (IL-6) wird u.a. von Monozyten/Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, verschiedenen Tumorzellen sowie im zentralen Nervensystem (ZNS) von Neuronen und Gliazellen gebildet. Es spielt sowohl für das Immunsystem, bei der Hämatopoese als auch im Nervensystem eine wichtige Rolle (Strober und James 1988, Gadiant und Otten 1997, Blanco et al. 2008, de Araujo et al. 2009). IL-6 induziert beispielsweise die Bildung von hepatischen Akute-Phase-Proteinen (Gauldie et al. 1987, Kopf et al. 1994), fördert die Antikörperbildung in B-Zellen (Kopf et al. 1998, Dienz et al. 2009) und ist an der Differenzierung von Monozyten (Chomarat et al. 2000, Mitani et al. 2000) und Nervenzellen beteiligt (Sterneck et al. 1996, März et al. 1997). Neben zahlreichen physiologischen Aufgaben ist IL-6 entscheidend an Entzündungs- und Autoimmunprozessen beteiligt (Kishimoto 2006), wirkt pyrogen (Chai et al. 1996) und negativ inotrop (Kinugawa et al. 1994, Pathan et al. 2004). Induktoren der IL-6-Synthese sind bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide) und andere Zytokine wie das TNF- α und Interleukin-1 β (Shalaby et al. 1989).

Das Zytokin Interleukin-8 (IL-8) gehört zur Untergruppe der proinflammatorischen Chemokine (chemotaktische Zytokine) und wird als solches aufgrund struktureller Eigenschaften auch als CXCL8 bezeichnet. Zu seinen wichtigsten Aufgaben gehört die Regulierung der Migration und Aktivierung von Leukozyten und insbesondere von neutrophilen Granulozyten. Damit spielt IL-8 eine entscheidende Rolle im Immunsystem und bei Entzündungsreaktionen (Rollins 1997, Luster 1998, Laing und Secombes 2004, Sharma 2010). Zudem fördert IL-8 die Angiogenese (Koch et al. 1992, Strieter et al. 1995). Auch eine Bedeutung der Chemokine für neurophysiologische und neuropathologische Abläufe ist in den vergangenen Jahren mehrfach belegt worden (Banisadr et al. 2005, Ransohoff 2009). IL-8 kann durch eine Vielzahl von Zellen, darunter Monozyten, T-Lymphozyten, Neutrophile, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen, synthetisiert werden

(Baggiolini et al. 1989, Adams und Lloyd 1997, Rollins 1997). Bakterielle Endotoxine und die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 und TNF- α induzieren die IL-8-Bildung (Thornton et al. 1990, Martich et al. 1991, Yasumoto et al. 1992, Xing und Remick 2003).

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), früher auch als Cachectin bezeichnet, erfüllt ebenfalls wichtige physiologische Funktionen der Immunabwehr. TNF- α dient u.a. als Mediator bei der Induktion des programmierten Zelltods und der Angiogenese, wirkt pyrogen, steigert die Phagozytenaktivität, bewirkt entzündliche Veränderungen am Gefäßendothel und induziert die Bildung anderer proinflammatorischer Zytokine (Sherry und Cerami 1988, Dinarello 2004, Bradley 2008, Kruglov et al. 2008). Gleichzeitig gilt es als entscheidendes Zytokin in der Vermittlung des septischen Schocks. Hohe TNF- α -Konzentrationen im Organismus rufen die klassischen klinischen Komponenten des septischen Schocks hervor, wie er auch bei invasiven Meningokokken-erkrankungen auftritt. Es kommt zu Gerinnungsstörungen, metabolischen Veränderungen, Blutdruckabfall und Störungen der Zelladhäsion, der Chemotaxis und der vaskulären Integrität bis hin zum Organversagen und Tod (Beutler et al. 1985, Tracey et al. 1986 und 1987, Mathison et al. 1988, Brett et al. 1989, Salyer et al. 1990). Daneben spielt TNF- α auch in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen eine bedeutende Rolle. Therapeutisch werden TNF- α -Inhibitoren erfolgreich bei Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, Ankylosierenden Spondylitis, dem Morbus Crohn oder der Psoriasis eingesetzt (Chang und Girgis 2007, Bradley 2008). Bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide) sind als besonders potente Induktoren der TNF- α -Synthese bekannt. Auch Viren, Tumorzellen und Zytokine, u.a. Interferon- γ und TNF- α selbst, stimulieren dessen Bildung. Hauptquelle des TNF- α sind Monozyten/Makrophagen, aber auch Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Mastzellen, Endothelzellen, Herzmuskel- und glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Osteoklasten und Zellen des ZNS können TNF- α bilden (Tracey und Cerami 1993, Mirlashari und Lyberg 2003, Bradley 2008, Chen et al. 2008).

1.2.3 IL-6, IL-8 und TNF- α bei Erkrankungen durch Meningokokken

Infektionen durch Meningokokken gehen mit einer starken Bildung proinflammatorischer Zytokine wie des IL-6, IL-8 und TNF- α und den entsprechenden klinischen Folgen einher. Entscheidende bakterielle Faktoren in der Pathogenese systemischer Meningokokkenerkrankungen sind die Endotoxine der Meningokokken mit ihren Lipopolysaccharid-Bestandteilen (LPS). LPS ist eine Komponente der Zellwand von Meningokokken und anderer gramnegativer Bakterien und führt insbesondere in Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen zur Zytokinbildung (Kang et al. 1992, van Deuren et al. 2000, Hackett et al. 2001, de Souza und Seguro 2008). LPS vermittelt seine Wirkung größtenteils über das LPS-bindende Protein (LBP) und einen Rezeptorkomplex, der

sich aus dem Oberflächenmolekül CD14, dem Transmembranrezeptor Toll-like-Rezeptor (TLR)4 und dem extrazellulären Adapterprotein MD-2 zusammensetzt (Schumann et al. 1990, Wright et al. 1990, Shimazu et al. 1999, Pridmore et al. 2001, Zughair et al. 2004). Folge der TLR-Aktivierung ist u.a. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und daraus folgend die Induktion der Synthese proinflammatorischer Zytokine (Pålsson-McDermott und O'Neill 2004, Bryant et al. 2010). Meningokokken können daneben die Zytokinsynthese zu einem kleineren Teil auch LPS-unabhängig anregen. Dieses erfolgt mindestens teilweise über den Rezeptor TLR2 und erfordert ebenfalls das Vorhandensein des Membranproteins CD14 (Uronen et al. 2000, Ingalls et al. 2001, Pridmore et al. 2001, Sprong et al. 2001, Mirlashari und Lyberg 2003, Møller et al. 2005). Daneben wird auch dem TLR9 eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Meningokokken zugeschrieben (Mogensen et al. 2006, Sjölander et al. 2008).

Schwere und Letalität invasiver Meningokokkenerkrankungen korrelieren mit der Konzentration der Zytokine IL-6 (van Deuren et al. 1995, Riordan et al. 1996, Pathan et al. 2004), IL-8 (van Deuren et al. 1995, Møller et al. 2005, Vermont et al. 2006) und TNF- α (Waage et al. 1987, van Deuren et al. 1995, Riordan et al. 1996).

1.3 Erythropoietin

1.3.1 Gewebeprotektive Eigenschaften

Erythropoietin (Epo) ist ein Glykoprotein, das durch seine namensgebende Hämatopoese-stimulierende Wirkung bekannt wurde. Es wird hauptsächlich in der Niere, darüber hinaus aber auch in kleinen Mengen u.a. in der Leber, dem Gehirn, der Lunge, der Gebärmutter, dem Hoden und der Milz gebildet. Erst in den vergangenen Jahren wurde erkannt, dass sich die Funktionen von Epo keineswegs auf das Knochenmark und die Blutbildung beschränken. Epo spielt auch als Wachstums- und Schutzfaktor diverser nicht-hämatopoetischer Gewebe eine bedeutende Rolle (Jelkmann 1992 und 2004, Brines und Cerami 2005, Zoubek 2007, Arcasoy 2008). Besonderes Interesse weckte hierbei ein für Epo nachgewiesener neuroprotektiver Effekt. Epo und der Epo-spezifische Rezeptor (Epo-R) sind für die normale Entwicklung des Gehirns von Bedeutung (Yu et al. 2002, Tsai et al. 2006, Chen et al. 2007). Im gesunden Gehirn des Erwachsenen werden Epo und Epo-R nur noch in geringen Mengen exprimiert. Unter anderem bei hypoxisch-ischämischen Schädigungen kommt es jedoch zu einer verstärkten Expression im Nervensystem (Juul et al. 1999, Chikuma et al. 2000, Sirén et al. 2001a). Ein neuroprotektiver Effekt durch Epo zeigte sich in präklinischen Studien sowohl bei hypoxisch-ischämischen, toxischen, inflammatorischen als auch

bei traumatischen Hirn- und Rückenmarksschädigungen (Sakanaka et al. 1998, Brines et al. 2000, Sirén et al. 2001b, Celik et al. 2002, Gorio et al. 2002, Li et al. 2004, Chang et al. 2005, Demers et al. 2005), so dass die Steigerung der Epo-Synthese z.B. unter ischämischen Bedingungen als endogener Schutzmechanismus betrachtet werden kann. Epo hat mehrere Eigenschaften, die bei der Vermittlung der gewebeschützenden Effekte eine Rolle spielen. Eine entscheidende Komponente hierbei ist die antiapoptotische Wirkung im geschädigten bzw. im angrenzenden Gewebe (Digicaylioglu und Lipton 2001, Sirén et al. 2001b, Celik et al. 2002, Kumral et al. 2006). Zudem wirkt es antiinflammatorisch und hemmt die Einwanderung inflammatorischer Zellen und die Bildung proinflammatorischer Zytokine (Agnello et al. 2002, Villa et al. 2003, Sun et al. 2005, Strunk et al. 2008). Daneben werden seine antioxidative Wirkung (Chattopadhyay et al. 2000, Kumral et al. 2005), die Modulation der Stickstoffmonoxidsynthese (Calapai et al. 2000, Genc et al. 2006, Santhanam et al. 2006) und die Fähigkeit zur Stimulation der Angio- und Neurogenese (Wang et al. 2004a, Gonzalez et al. 2007) ebenfalls als mitverantwortlich für die neuroprotektiven Wirkungen diskutiert. Die genannten Eigenschaften tragen auch zu den weiteren nicht-hämatopoetischen Wirkungen von Epo bei, die unter anderem kardioprotektive Effekte (van der Meer et al. 2005, Rui et al. 2005, Li et al. 2006) und eine fördernde Wirkung auf die Wund- und Knochenheilung beinhalten (Haroon et al. 2003, Galeano et al. 2004, Holstein et al. 2007).

1.3.2 Erythropoietin als Therapeutikum

Rekombinantes Erythropoietin wird mit seinen erythropoetischen Eigenschaften seit über 20 Jahren für die Therapie von renalen und chemotherapieassoziierten Anämien genutzt und ist mit Einschränkungen auch für die Behandlung im Kindesalter zugelassen (Jelkmann 2007, Mache et al. 2007, Witt und Zoubek 2007). Aktuell sind in Deutschland verschiedene Epoetin alfa-, beta- und zeta- und Darbepoetin alfa-Präparate auf dem Markt, von denen NeoRecormon[®] (Epoetin beta) eine Zulassung für die vorbeugende Behandlung der Frühgeborenenanämie hat (Rote Liste[®] Online). Eine therapeutische Nutzung der gewebeprotectiven Effekte von Epo steht noch am Anfang ihrer Entwicklung, erbrachte aber in einzelnen klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse. Ehrenreich et al. (2002) fanden eine Verbesserung des klinisch-neurologischen Outcomes durch Epo nach ischämischen Insulten bei Erwachsenen. Der daraufhin von 2003 bis 2008 durchgeführte German Multicenter EPO Stroke Trial (Phase II/III) konnte die rundum positiven Ergebnisse der Pilotstudie hingegen nicht bestätigen. Patienten, die eine systemische Lyse mit rekombinantem Gewebe-Plasminogenaktivator (t-PA) erhalten hatten, zeigten nicht nur keine Verbesserung des Outcomes nach Epo, sondern auch ein höheres Risiko für gravierende Komplikationen (Ehrenreich et al. 2009, Epo-study.de). Patienten mit Schizophrenie und Multipler Sklerose profitierten in ersten klinischen Studien von einer Behandlung mit Epo (Ehrenreich et al.

2007a und 2007b). Klinische Studien mit Epo als Therapeutikum bei hypoxisch-ischämischen Hirnschädigungen bei reifen Neugeborenen, intrakraniellen Blutungen bei Frühgeborenen, Sepsis/septischem Schock, Myokardischämie/-infarkt, Schlaganfall, Depression, Amyotropher Lateralsklerose, Hirntrauma, spinalem Schock, Friedreich-Ataxie, Parkinson-Erkrankung u.a. laufen derzeit bzw. sind bereits abgeschlossen, so dass in den kommenden Jahren diverse Ergebnisse in diesem Bereich zu erwarten sind (ClinicalTrials.gov).

Epo zeichnet sich insgesamt durch eine gute Verträglichkeit nicht nur bei Erwachsenen, sondern auch bei Kindern einschließlich Neu- und Frühgeborenen aus (Maier et al. 2002, Razzouk et al. 2006, Fauchère et al. 2008, Juul et al. 2008). Zu den möglichen Nebenwirkungen gehören die Erhöhung des Blutdrucks, grippeähnliche Symptome, ein Anstieg der Thrombozytenzahl, thrombembolische Ereignisse, Hautreaktionen und sehr selten die Bildung neutralisierender Epo-Antikörper (Rote Liste®Online). Ein Teil der Nebenwirkungen ist direkt auf die Stimulation der Hämatopoese zurückzuführen. Daher könnten mittlerweile entwickelte Epo-Varianten mit weiterhin neuroprotektiver, aber ohne hämatopoetische Aktivität, zukünftig eine Option für einen noch nebenwirkungsärmeren und gezielteren Einsatz zur Neuroprotektion darstellen (Erbayraktar et al. 2003, Leist et al. 2004, Wang et al. 2004b).

2 Fragestellung

Durch Meningokokken hervorgerufene Meningitiden und Septitiden gehen auch heute noch mit einer hohen Morbidität und Letalität einher. Weiterhin versterben zuvor gesunde Säuglinge und Kleinkinder innerhalb kürzester Zeit oder haben ein Leben lang unter Folgeschädigungen zu leiden. Die Suche nach zusätzlichen therapeutischen Möglichkeiten für die Behandlung der IMD ist daher dringend erforderlich. Erkrankungen durch Meningokokken führen zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α , deren Konzentration mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Aufgrund der herausragenden pathophysiologischen Bedeutung dieser Zytokine bei invasiven Meningokokkenerkrankungen soll in der vorliegenden Arbeit deren Synthese in Monozyten im Vollblut gesunder Probanden nach Stimulation mit Meningokokken unter den im Folgenden dargestellten Aspekten *ex vivo* untersucht werden.

Die Zellwand gramnegativer Bakterien beinhaltet LPS, das als entscheidendes Stimulans der Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α gilt. Zudem beinhalten Meningokokken aber auch non-LPS-Anteile, die in geringerem Maße ebenfalls in der Lage sind, die Zytokinbildung zu stimulieren. In der vorliegenden Studie soll daher ermittelt werden, inwiefern sich das Ausmaß der Bildung von IL-6, IL-8 und TNF- α in Monozyten im Vollblut gesunder Probanden nach Stimulation mit reinem LPS im Vergleich zur Stimulation mit Meningokokken unterscheidet.

Unterschiede zwischen den einzelnen Serogruppen der Meningokokken betreffen u.a. die globale Verteilung und den epidemiologischen Verlauf. Erkrankungen durch Meningokokken der Serogruppe A weisen weltweit die höchste Inzidenz auf und verursachen wiederholt Epidemien in Afrika und Asien. In Deutschland und Europa treten Meningokokkenerkrankungen dagegen in den allermeisten Fällen sporadisch und ausgelöst durch Bakterien der Serogruppe B auf. Voraussichtlich wird die Bedeutung der Serogruppe B in den kommenden Jahren weiter zunehmen, da gerade gegen sie ein wirksamer Impfschutz weiterhin fehlt. Aufgrund der besonderen Bedeutung dieser beider Serogruppen sollen eventuelle quantitative Unterschiede in der Stimulationsfähigkeit der IL-6-, IL-8- und TNF- α -Bildung zwischen ihnen ermittelt werden.

Invasive Meningokokkenerkrankungen können in jedem Lebensalter auftreten, zeigen die weitaus höchste Inzidenz jedoch im frühen Kindesalter und vor allem im Säuglingsalter. Es ist zudem bekannt, dass das Ausmaß der Zytokinbildung im Rahmen der Immunantwort altersabhängig

variieren kann. Vor diesem Hintergrund wird diese Arbeit sich mit der Frage nach möglicherweise bestehenden altersabhängigen Unterschieden der durch Meningokokken angeregten Zytokinbildung beschäftigen. Hierfür werden Untersuchungen der IL-6-, IL-8- und TNF- α -Bildung nach LPS- und Meningokokken-Stimulation an Vollblut von Probanden im Neugeborenen-, Säuglings- und Kleinkind- sowie Erwachsenenalter durchgeführt und verglichen.

In den vergangenen Jahren konnten für Epo nicht-hämatopoetische und insbesondere neuroprotektive Effekte nachgewiesen werden. Diese werden unter anderem durch antiinflammatorische Eigenschaften von Epo erklärt. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass Epo die Bildung proinflammatorischer Zytokine hemmen kann. Da die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α von erheblicher pathophysiologischer Relevanz bei Erkrankungen durch Meningokokken sind und deren Konzentration mit der Schwere und Letalität der IMD korreliert, stellt im Umkehrschluss deren Synthesehemmung einen möglichen Ansatzpunkt auf der Suche nach einer zusätzlichen Therapie dar. Daher soll untersucht werden, inwiefern Epo in der Lage ist, die durch Meningokokken angeregte IL-6-, IL-8- und TNF- α -Bildung zu beeinflussen.

Zusammengefasst beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Themen:

- Untersuchung der Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken im Vergleich zur Stimulation mit LPS
- Untersuchung der Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A im Vergleich zur Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe B
- Untersuchung der Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit LPS bzw. Meningokokken in Abhängigkeit vom Alter
- Untersuchung des Einflusses von Epo auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken

3 Probanden

3.1 Zusammensetzung des Probandenkollektivs

Die Untersuchungen wurden mit Lithium-heparinisiertem Vollblut von 20 reifen Neugeborenen, 29 Kindern im Alter von 1 Monat bis 3 Jahren und 21 erwachsenen Spendern durchgeführt. Das Material der Neugeborenen stammte von 11 weiblichen und 9 männlichen Reifgeborenen aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Lübeck, und wurde unmittelbar postnatal aus dem placentaren Anteil der Nabelschnur entnommen. Die Gewinnung der Blutproben der Säuglinge ($n = 12$) und Kleinkinder ($n = 17$) erfolgte im Rahmen von medizinisch erforderlichen venösen Punktionen bei 14 weiblichen und 15 männlichen Patienten (Alter: 1 bis 34 Monate, Mittelwert: 15,8 Monate; Abb. 1) aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UKSH, Campus Lübeck. Bei den erwachsenen Probanden handelte es sich um 5 weibliche und 15 männliche Blutspender (Alter: 23 bis 57 Jahre; Mittelwert: 34,9 Jahre) des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin des UKSH, Campus Lübeck.

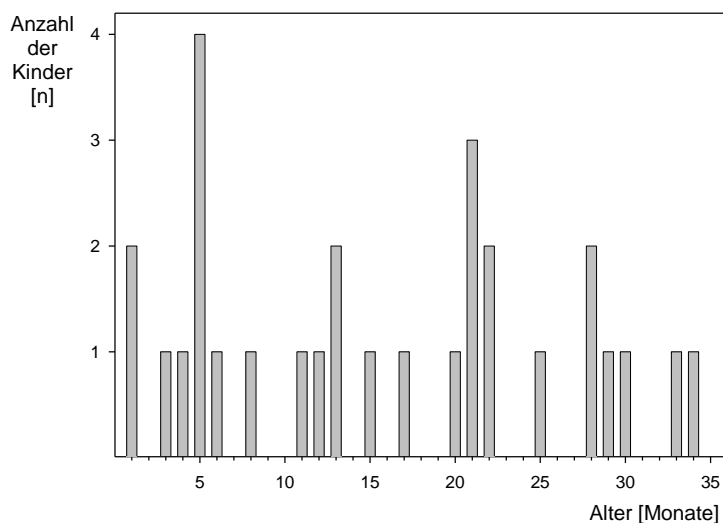


Abb. 1 Altersverteilung der Probanden im Kindesalter

Dargestellt ist die Verteilung der Probanden im Kindesalter ($n = 29$) auf die zu untersuchende Altersspanne von 1 bis 36 Monaten.

3.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Bei den Neugeborenen galten Frühgeburtlichkeit (< 37. SSW), ein Geburtsgewicht von unter 2500 g, Anpassungsstörungen mit Apgar-Werten unter 8 Punkten oder ein Nabelarterien-pH unter 7,2 sowie klinische oder laborchemische Hinweise auf eine Infektion als Ausschlusskriterien. Für das Kollektiv der Kinder wurden Patienten im Alter von 1 bis 36 Monaten berücksichtigt. Die Gewinnung von Probenmaterial von gesunden Kindern hätte eine eigens dafür durchgeführte venöse Punktion erfordert und wäre ethisch nicht vertretbar gewesen. Die Probengewinnung für diese Studie erfolgte daher im Rahmen medizinisch indizierter venöser Punktionen, denen sich die Kinder zu diagnostischen Zwecken oder im Zusammenhang mit operativen Eingriffen unterziehen mussten. Voraussetzung für alle an dieser Studie teilnehmenden Probanden war, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Anzeichen einer Infektion bestanden und keine bekannten immunologischen Erkrankungen vorlagen. Ebenso schloss die Einnahme immunsuppressiver Medikamente eine Teilnahme als Proband aus. Sämtliche Blutentnahmen erfolgten nach Aufklärung über den Zweck der geplanten Untersuchung und Einholen des Einverständnisses der Eltern bzw. der erwachsenen Spender.

Eine positive Stellungnahme der zuständigen Ethikkommission liegt vor (Az. 04-164).

4 Materialien

4.1 Geräte und Computerprogramme

- FACSCanto (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- FACSDiva Software Version 4.0 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- SPSS 13.0 und 15.0, Statistik Software (SPSS Inc. Chicago, USA)
- SigmaPlot 2001, Graphik Software (SPSS Inc. Chicago, USA)

4.2 Reagenzien

- HEPES Puffer (1M) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Lipopolysaccharide, *Escherichia coli* 0127:B8 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Magermilchpulver, sprühgetrocknet (Spinnrad, Norderstedt, Deutschland)
- Meningokokken der Serogruppe A (ATCC 13077) und der Serogruppe B (Isolat eines 6 Monate alten Meningitis-Patienten der hiesigen Kinderklinik), hitzeinaktiviert, $1,2 \times 10^9$ Keime/ml (entsprechend McFarland 4) (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, UKSH, Campus Lübeck, Deutschland)
- Monensin sodium salt 90-95% (TLC) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Natriumpyruvat 100 mM (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- NeoRecormon[®] Injektionslösung in Fertigspritzen (Epoetin beta) (Roche, Hertfordshire, Großbritannien)
- Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Paraformaldehyd (Riedel de Haen, Seelze, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin 10 000 Einheiten/10 000 µg/ml (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- PBS-Puffer pH 7,2 (Apotheke UKSH, Campus Lübeck, Deutschland)
- RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO₃, ohne L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Saponin (Riedel de Haen, Seelze, Deutschland)

4.3 Monoklonale Antikörper

- Anti-human CD14-PC5 (Klon RMO52, Maus IgG2a) (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich)
- Anti-human CD14-PE (Klon M5E2, Maus IgG2a) (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich)
- Anti-human IL-6-FITC (Klon MQ2-13A5, Ratte IgG1)
- Anti-human IL-8-FITC (Klon G265-8, Maus IgG2b)
- Anti-human IL-8-PE (Klon G265-8, Maus IgG2b)
- Anti-human TNF- α -FITC (Klon Mab11, Maus IgG1)
- Purified anti-human IL-6 (Klon MQ2-13A5, Ratte IgG1)
- Purified anti-human IL-8 (Klon G265-8, Maus IgG2b)
- Purified anti-human TNF- α (Klon Mab11, Maus IgG1)

(alle Zytokinantikörper wurden von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland bezogen)

5 Methode

Kapitel 5.1 beschreibt die für die spätere durchflusszytometrische Messung durchgeführten Vorbereitungen des Vollbluts von der Stimulation der Zellen bis zur Färbung der Zytokine. In Kapitel 5.2 sind die einzelnen Arbeitsschritte in einem Versuchsprotokoll zusammengefasst. Kapitel 5.3 stellt kurz die durchflusszytometrische Messung und Kapitel 5.4 die statistische Auswertung der Ergebnisse dar.

Das heparinisierte Vollblut der Probanden wurde jeweils innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme verwertet. Angaben zu Zusammensetzung und Konzentration der im Folgenden genannten Reagenzien finden sich in Tabelle 1.

5.1 Vorbereitung der Zellen für die Messung

5.1.1 Ansatz der Zellkultur und Stimulation

Zunächst wurde die Anzahl der weißen Blutkörperchen in den Vollblutproben ermittelt. Zur Schaffung einheitlicherer Ausgangsbedingungen wurde ein Blutvolumen mit 5×10^6 Leukozyten pro Ansatz verwendet. Im Falle nicht ausreichenden Probenmaterials bei Säuglingen oder Kleinkindern wurde die Leukozytenzahl auf 2×10^6 pro Ansatz reduziert. Die eingesetzte Menge Blut wurde mit Nährmedium auf 1500 μl Zellsuspension verdünnt. Pro Proband wurden zwei Ansätze mit 100 IE Epo und zwei weitere mit 500 IE Epo versetzt. Das Material wurde für eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 vorinkubiert, bevor die Stimulation mit LPS und Meningokokken erfolgte.

Die Meningokokken wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKSH, Campus Lübeck zur Verfügung gestellt. Bei den verwendeten Bakterien der Serogruppe A (MenA) handelte es sich um den Stamm 13077 der American Type Culture Collection (ATCC), der aus dem Liquor eines an einer Meningokokkenmeningitis verstorbenen Patienten isoliert worden war. Die Meningokokken der Serogruppe B (MenB) waren ein Isolat aus dem Liquor einer im Jahr 2004 an einer Meningokokkenmeningitis erkrankten, 6 Monate alten Patientin aus der hiesigen Kinderklinik. Diese Bakterien waren auf eine Keimzahl von $1,2 \times 10^9/\text{ml}$ eingestellt und für eine Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert worden. Zur Absicherung der Sterilität der Proben war nach dem Auftauen der bei -70°C

gelagerten Aliquots eine 48-stündige Inkubation auf Blut- und Schoko-Agar bei 36°C und 5% CO₂ erfolgt, bei der sich kein Wachstum der Meningokokken nachweisen ließ.

Die Stimulation der Monozyten erfolgte mit 150 µl der beschriebenen Meningokokkensuspensionen, entsprechend 1,8x10⁸ Keime/Ansatz bzw. 1,2x10⁸ Keime/ml, oder mit 50 µl 0,1%igem Lipopolysaccharid (LPS), entsprechend 30 ng LPS/ml Zellsuspension. Bei nicht ausreichendem Probenmaterial entfiel die Stimulation mit LPS bzw. der mit Meningokokken stimulierte Ansatz mit 100 IE Epo. Als Akkumulationsreagenz wurde nach Stimulation der Monozyten Monensin hinzugefügt, das den intrazellulären Transport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgiapparat blockiert (Luttmann et al. 2004) und so eine Ausschleusung der Zytokine aus den Zellen verhindert. Es folgte eine vierstündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Die bis hier dargestellten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 1: Reagenzien

Nährmedium	19,2 ml RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin, versetzt mit <ul style="list-style-type: none"> - 200 µl Penicillin/Streptomycin - 200 µl N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM - 200 µl nicht-essentiellen Aminosäuren - 200 µl Natriumpyruvat 100 mM
Epo	1000 IE entspr. 8,3 µg rekombinantes humanes Erythropoietin beta
LPS 0,1%	Stocklösung: 10 mg LPS + 10 ml PBS Arbeitsverdünnung: 0,1% der Stocklösung, Verdünnung mit Nährmedium
Meningokokken	Hitzeinaktiviert, 1,2x10 ⁹ Keime/ml in der Ursprungslösung
Monensin 1%	Molekulargewicht 692,9 g/l Stocklösung: 69,29 mg + 10 ml Ethanol Arbeitsverdünnung: 1% der Stocklösung (100 µM), Verdünnung mit Nährmedium
PFA-Lösung 4%	1 g PFA + 25 ml PBS
PBS	pH 7,2
Magermilch 5%	2,5 g Magermilchpulver + 50 ml PBS
Saponinpuffer	Stocklösung: 1 g + 10 ml PBS Arbeitsverdünnung: 0,1%; 1 ml der Stocklösung mit <ul style="list-style-type: none"> - 1 ml HEPES Puffer - 98 ml PBS

5.1.2 Fixation der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Probenmaterial durch Aufnahme in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen/min (U/min) gewaschen. Darauf folgten eine 10-minütige Inkubation bei 4°C in Paraformaldehydlösung (PFA) zur Fixierung der Zellen und ein erneuter Waschvorgang mit PBS. Zum Abfangen unspezifischer Bindungen wurden die Zellen über 16 Stunden bei 4°C in Magermilch resuspendiert.

5.1.3 Färbung der Zytokine

Zur Vorbereitung der Färbung der intrazellulären Zytokine wurde die Zellsuspension mit 0,1%igem Saponinpuffer gewaschen, wobei das Saponin durch Reaktion mit dem Cholesterol der Zellmembran eine reversible Permeabilisierung verursacht (Luttmann et al. 2004). Mit Hilfe von spezifisch an Oberflächenantigene von Zellen bindenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD14 wurde die Population der Monozyten angefärbt. Gleichzeitig wurden die durch Permeabilisierung für eine Färbung zugänglich gemachten, nach Stimulation mit LPS oder Meningokokken synthetisierten intrazellulären Zytokine mit fluorochrommarkierten anti-humanen Antikörpern gegen IL-6, IL-8 und TNF- α gekennzeichnet.

Für jeden Probanden wurden Probenröhrchen mit den in Tabelle 2a dargestellten Fluoreszenzmarkierungen der Antikörper angesetzt.

Tabelle 2a: Fluoreszenzmarkierung der Antikörper (I)		
	Antikörper 1	Antikörper 2
1.	CD14-PE	IL-6-FITC
2.	CD14-PE	IL-8-FITC
3.	CD14-PE	TNF- α -FITC

Da der zunächst verwendete IL-8-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Antikörper im Verlauf nicht mehr erhältlich war, wurde für weitere Färbungen der Phycoerythrin (PE)-markierte Antikörper desselben Klons gegen IL-8 und ein Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PC5)-markierter Antikörper gegen CD14 verwendet (Tabelle 2b).

Tabelle 2b: Fluoreszenzmarkierung der Antikörper (II)

	Antikörper 1	Antikörper 2
1.	CD14-PE	IL-6-FITC
2.	CD14-PC5	IL-8-PE
3.	CD14-PE	TNF- α -FITC

Der Inkubation für 20 min bei 4°C im Dunkeln folgte eine erneute Permeabilisierung mit Saponin und nach Abzentrifugation die Resuspension in PBS und Lagerung bei 4°C bis zur Messung. Als Negativkontrolle der intrazellulären Markierung diente ein Ansatz mit vor der Färbung im Überschuss eingesetzten, nicht-fluoreszenzmarkierten Zytokinantikörpern (Schultz et al. 2002a). Die Negativkontrollen inkubierten vor Resuspension in PBS für weitere 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

5.2 Versuchsprotokoll

Einstellen der Zellzahl und Vorinkubation mit Epo (steril):

- Bestimmung der Anzahl der Leukozyten im Vollblut
- 7 sterile Ansätze mit der auf die gewünschte Zellzahl eingestellten Menge Vollblut (bei ausreichendem Probenmaterial 5×10^6 Leukozyten, sonst 2×10^6 Leukozyten) mit Nährmedium auf je 1500 μl verdünnen
- Zugabe von 100 IE Epo und 500 IE Epo in je zwei Ansätze
- Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 für eine Stunde

Zellstimulation (steril):

- Zugabe der Stimulanzien gemäß Tabelle 3

Tabelle 3: Übersicht Epo und Stimulation

	Epo	Stimulans
1	-	50 μl LPS 0,1%
2	-	150 μl MenA $1,2 \times 10^9/\text{ml}$
3	-	150 μl MenB $1,2 \times 10^9/\text{ml}$
4	100 IE	150 μl MenA $1,2 \times 10^9/\text{ml}$
5	100 IE	150 μl MenB $1,2 \times 10^9/\text{ml}$
6	500 IE	150 μl MenA $1,2 \times 10^9/\text{ml}$
7	500 IE	150 μl MenB $1,2 \times 10^9/\text{ml}$

- nach Ablauf einer Minute Zugabe von je 50 μl Monensinverdünnung 100 μM
- Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 für vier Stunden

Fixieren der Zellen und Abfangen unspezifischer Bindungen:

- Überführen der Zellsuspensionen in Spitzbodenröhrchen und Verdünnung mit PBS
- Zentrifugieren mit 1200 U/min für 10 min, Überstand verwerfen
- Zugabe von je 2 ml PFA 4%
- Inkubation bei 4°C für 10 min
- Zentrifugieren mit 1200 U/min für 10 min, Überstand verwerfen
- Resuspension in je 1 ml Magermilch 5% bei 4°C für 16 Stunden

Permeabilisation der Zellmembranen:

- Zentrifugieren mit 1200 U/min für 10 min, Überstand verwerfen
- Zugabe von je 1 ml Saponinpuffer 0,1%
- bei Bedarf (großes eingesetztes Blutvolumen) Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min und anschließendes Zentrifugieren mit 1200 U/min für 10 min, Überstand verwerfen, Resuspension in je 1 ml Saponinpuffer 0,1%

Färben der Monozyten und der intrazellulären Zytokine:

- Vorlegen von je 10 µl der unverdünnten fluorochrommarkierten Antikörper gegen CD14-Antigen in 30 Durchflusszytometer(FACS)-Röhrchen (10 pro Zytokin)
- Zugabe von 5 µl der unverdünnten nicht-fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen IL-6, IL-8 bzw. TNF- α als Negativkontrolle in je 3 der FACS-Röhrchen
- Zugabe von 10 µl der mit PBS 1:20 verdünnten fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen IL-6, IL-8 bzw. TNF- α in die verbliebenen FACS-Röhrchen (7 Röhrchen pro Zytokin)
- Überführen von 200 µl Zellsuspension in die entsprechenden FACS-Röhrchen (Tabelle 4)

Tabelle 4: Übersicht FACS-Röhrchen (pro Zytokin)

	Oberflächen-antikörper	Zytokinantikörper	Zellsuspension / Stimulation
1	CD14	nicht-fluoreszenzmarkiert	LPS
2	CD14	nicht-fluoreszenzmarkiert	MenA
3	CD14	nicht-fluoreszenzmarkiert	MenB
4	CD14	fluoreszenzmarkiert	LPS
5	CD14	fluoreszenzmarkiert	MenA
6	CD14	fluoreszenzmarkiert	MenB
7	CD14	fluoreszenzmarkiert	MenA und 100 IE Epo
8	CD14	fluoreszenzmarkiert	MenB und 100 IE Epo
9	CD14	fluoreszenzmarkiert	MenA und 500 IE Epo
10	CD14	fluoreszenzmarkiert	MenB und 500 IE Epo

- Inkubation bei 4°C für 20 min
- Zugabe von je 1 ml Saponinpuffer 0,1%
- Zentrifugieren mit 1000 U/min für 5 min, Überstand verwerfen
- Zugabe von je 500 µl PBS in die Röhrchen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Lagerung bei 4°C in Dunkelheit bis zur Messung

Negativkontrollen:

- einen Tropfen Saponin zum Volumenausgleich in die Röhren mit den nicht-fluoreszenzmarkierten Antikörpern geben
- Zugabe von 10 µl der entsprechenden 1:20 verdünnten fluoreszenzmarkierten Antikörper zu den Röhren mit den nicht-markierten Antikörpern
- Inkubation bei 4°C für 20 min
- Zugabe von je 1 ml Saponinpuffer 0,1%
- Zentrifugieren mit 1000 U/min für 5 min, Überstand verwerfen
- Zugabe von je 500 µl PBS und Lagerung bei 4°C in Dunkelheit bis zur Messung

5.3 Durchflusszytometrische Messung

Die durchflusszytometrische Messung wurde mit dem FACSCanto (BD Biosciences) und der FACSDiva Software Version 4.0 durchgeführt.

Über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (Abb. 2a) und die Markierung der Oberflächenantigene (nicht abgebildet) wurden die CD14-positiven Monozyten bestimmt. Die zu messende Anzahl an CD14-positiven Monozyten war auf 2000 Zellen eingestellt. Die gleichzeitige Fluorochrommarkierung der intrazellulären Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α ermöglichte die Bestimmung des prozentualen Anteils der zytokinpositiven Zellen an der gesamten beobachteten CD14-positiven Monozytenpopulation (Abb. 2b). Anhand der Negativkontrollen wurde zuvor eine Schwelle < 2% zur Unterscheidung zwischen falsch und richtig positiven Ereignissen festgelegt (nicht abgebildet).

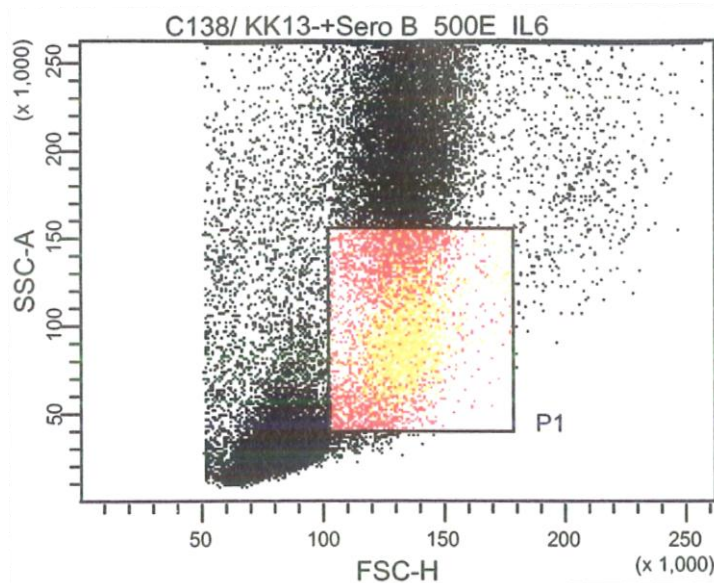


Abb. 2a Durchflusszytometrische Bestimmung der Population der Monozyten (Beispielabbildung)

Mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts (FSC-H) und des Seitwärtsstreulichts (SSC-A) lassen sich die Monozyten (gelb) von den Lymphozyten (Zellpopulation links unten) und den Granulozyten (Zellpopulation oberhalb der Monozyten) abgrenzen. Für die weitere Untersuchung der Monozyten wird um diese ein mit P1 markiertes Fenster gelegt.

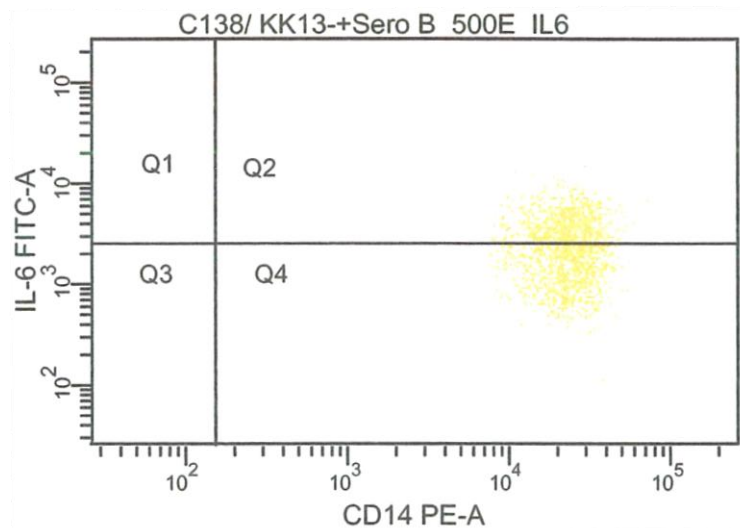


Abb. 2b Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils zytokinpositiver Monozyten (Beispielabbildung)

Die Fluorochrommarkierung der intrazellulären Zytokine (hier IL-6) ermöglicht die Bestimmung des prozentualen Anteils der zytokinpositiven Monozyten (Q2) an der gesamten Population der CD14-positiven Monozyten. Mit Hilfe der Negativkontrollen wurde zuvor der Bereich falsch positiver Ereignisse (Q4) festgelegt.

5.4 Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde die SPSS 13.0 Statistik Software und deren aktualisierte Version 15.0 verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte mit SigmaPlot 2001.

Verbundene Stichproben, d.h. innerhalb einer Altersgruppe auftretende Unterschiede hinsichtlich der Zytokinbildung nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen, wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon-Tests untersucht. Unverbundene Stichproben, also die Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen verschiedenen Altersgruppen, wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Die Tests wurden zweiseitig angewendet. Mögliche Korrelationen zwischen der Zytokinbildung und dem Alter der Kinder wurden mit dem Pearson-Test geprüft. Das Signifikanzniveau wurde als $p \leq 0,05$ definiert. Als bedeutende Korrelation wurden Werte $< -0,7$ bzw. $> 0,7$ festgelegt. Zur Beschreibung der Ergebnisse werden, soweit nicht anders angegeben, der Median und Interquartilbereich (25. bis 75. Perzentile) verwendet.

6 Ergebnisse

Im Folgenden wird bei der Darstellung der Untersuchungsergebnisse wiederholt von der Altersgruppe der „Kinder“ die Rede sein. Hierunter sind die Kinder im Alter von 1 bis 36 Monaten zusammengefasst, nicht jedoch die Neugeborenen, die getrennt davon betrachtet werden. Werden die Kinder unterteilt in „Säuglinge“ und „Kleinkinder“ näher beschrieben, so sind unter den Säuglingen die 1 bis 12 Monate alten und unter den Kleinkindern die 13 bis 36 Monate alten Probanden zu verstehen.

6.1 Zytokinbildung in Abhängigkeit vom eingesetzten Stimulans

Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) spielen eine Schlüsselrolle im Rahmen septischer Erkrankungen und werden häufig experimentell zur *ex vivo*-Simulation einer Sepsis eingesetzt. LPS ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, zu denen auch die Meningokokken gehören. In den hier durchgeführten Messungen wurde Vollblut verschiedener Altersgruppen vergleichend sowohl mit purem LPS als auch mit LPS-enthaltenden Meningokokken der Serogruppen A und B versetzt. Die quantitative Untersuchung der dadurch angeregten Zytokinbildung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Bestimmung des IL-6-, IL-8- und TNF- α -positiven Anteils der Monozyten. Ziel der Untersuchung war die Ermittlung möglicher Unterschiede in der stimulatorischen Potenz der Substanzen im Hinblick auf die genannten proinflammatorischen Zytokine.

6.1.1 IL-6-Bildung

6.1.1.1 LPS versus Meningokokken

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse finden sich graphisch dargestellt in Abbildung 3. Der IL-6-produzierende Anteil der Monozyten ist bei den Neugeborenen nach Stimulation mit LPS signifikant höher als nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe B ($_{LPS}58,8\%$ (48,9-66,8%) versus $_B52,3\%$ (47,5-63,1%); $p = 0,021$). Zwischen LPS und der Serogruppe A ist dagegen kein eindeutiger Unterschied festzustellen ($_{LPS}58,8\%$ (48,9-66,8%) versus $_A55,4\%$ (44,2-69,5%); $p = 0,279$). In der Gruppe der Kinder zeigt sich eine deutlich stärker stimulierende Wirkung des LPS im Vergleich zu den Meningokokken beider Serogruppen ($_{LPS}68,8\%$ (61,5-74,9%) versus $_A56,7\%$ (47,0-65,4%) bzw. versus $_B55,2\%$ (45,9-60,0%); $p < 0,001$). Ähnliche Unterschiede

zwischen LPS und Meningokokken zeigen sich bei getrennter Betrachtung von Säuglingen und Kleinkindern (nicht abgebildet), wobei sie sich bei den Kleinkindern ($L_{PS}69,6\%$ (60,2-79,0%) versus $A54,0\%$ (44,1-65,4%) bzw. versus $B49,9\%$ (41,3-61,1%); $p = 0,001$) etwas ausgeprägter darstellen als bei den Säuglingen ($L_{PS}67,6\%$ (62,8-71,8%) versus $A58,8\%$ (53,3-66,9%) bzw. versus $B56,6\%$ (51,7-60,0%); $p = 0,013$). Der Anteil der IL-6-positiven Zellen ist auch bei den Erwachsenen nach Stimulation mit LPS deutlich größer als nach Stimulation mit Meningokokken ($L_{PS}65,2\%$ (54,1-73,0%) versus $A49,0\%$ (33,1-54,2%) bzw. versus $B54,0\%$ (37,3-63,5%); $p < 0,001$ bzw. $p = 0,001$).

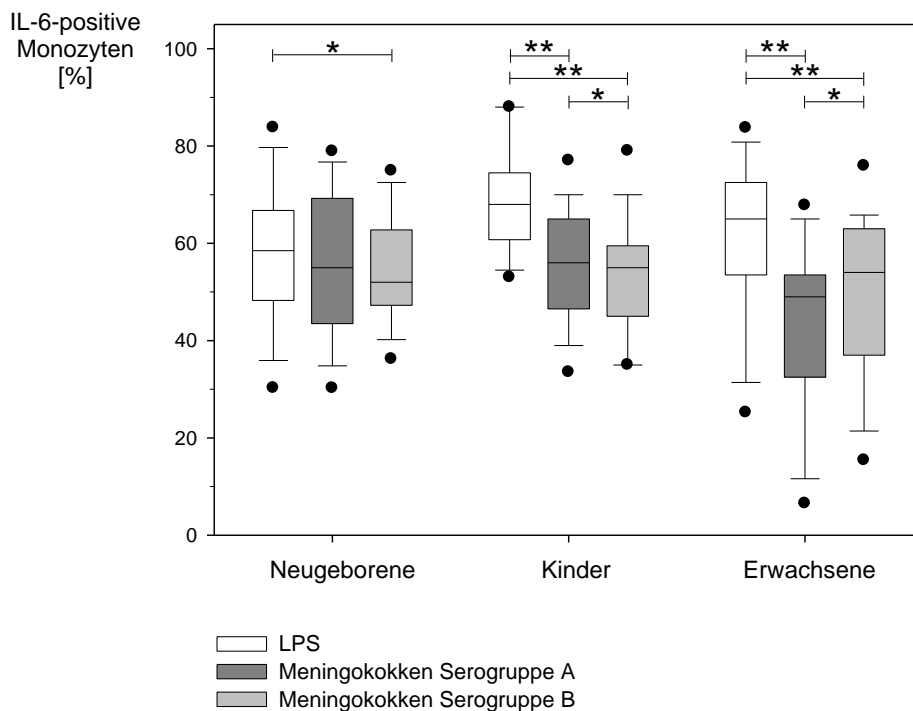


Abb. 3 IL-6-Bildung: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B

Die Stimulation mit LPS führt insbesondere bei Kindern und Erwachsenen zu einer stärkeren IL-6-Bildung als die Stimulation mit Meningokokken. Beim Vergleich der Meningokokken untereinander werden bei den Kindern durch die Serogruppe A und bei den Erwachsenen durch die Serogruppe B mehr Monozyten zur IL-6-Bildung angeregt. Dargestellt ist jeweils der IL-6-positive Anteil der Monozyten anhand des Medians und dem Interquartilbereich in der Box, der 10. und 90. Perzentile am Ende der Whiskers und der 5. und 95. Perzentile in Form von Punkten. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**)

6.1.1.2 Serogruppe A versus Serogruppe B

Bei den Neugeborenen zeigt der Vergleich der Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A und der Serogruppe B bei der IL-6-Bildung keinen signifikanten Unterschied ($A55,4\%$ (44,2-69,5%) versus $B52,3\%$ (47,5-63,1%); $p = 0,179$). Die Kinder reagieren mit einer geringeren IL-6-Bildung auf die Stimulation mit B-Meningokokken als auf die Stimulation mit A-Meningokokken ($B55,2\%$ (45,9-60,0%) versus $A56,7\%$ (47,0-65,4%), $p = 0,017$), wobei sowohl die Gruppe der Ein-

bis Dreijährigen ($_B49,9\%$ (41,3-61,1%) versus $_A54,0\%$ (44,1-65,4%); $p = 0,072$) als auch die der Säuglinge ($_B56,6\%$ (51,7-60,0%) versus $_A58,8\%$ (53,3-66,9%); $p = 0,091$) für sich betrachtet jeweils keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Serogruppen zeigt (nicht abgebildet). Bei den Erwachsenen verursacht die Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe B einen signifikant höheren Anteil IL-6-positiver Monozyten als die Stimulation mit den A-Meningokokken (54,0% (37,3-63,5%) versus 49,0% (33,1-54,2%), $p = 0,025$) (Abb. 3).

6.1.2 IL-8-Bildung

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse zur IL-8-Bildung sind in Abbildung 4 dargestellt. Neugeborene zeigen nach Stimulation mit B-Meningokokken eine etwas geringer ausgeprägte IL-8-Produktion als nach LPS-Stimulation ($_B58,4\%$ (33,8-94,4%) versus $_{LPS}73,5\%$ (48,2-93,1%); $p = 0,005$). Darüber hinaus sind in dieser Altersgruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulanzen festzustellen. Bei den Kindern führen A-Meningokokken sowohl im Vergleich zum LPS als auch im Vergleich zu den B-Meningokokken zu einer stärkeren IL-8-Bildung ($_A76,9\%$ (61,7-84,7%) versus $_{LPS}68,3\%$ (56,1-78,6%) bzw. versus $_B67,3\%$ (51,4-86,0%); $p = 0,025$ bzw. $p = 0,006$). Der Vergleich zwischen LPS und der Serogruppe B zeigt keinen signifikanten Unterschied ($_{LPS}68,3\%$ (56,1-78,6%) versus $_B67,3\%$ (51,4-86,0%); $p = 0,394$). Bei isolierter Betrachtung der Altersgruppe der Ein- bis Dreijährigen zeigt sich auch hier eine stärkere Zytokinbildung durch die Stimulation mit A-Meningokokken im Vergleich zum LPS und den B-Meningokokken ($_A77,6\%$ (59,0-84,8%) versus $_{LPS}68,3\%$ (54,7-76,9%) bzw. versus $_B67,7\%$ (51,9-82,2%); $p = 0,022$ bzw. $0,013$) und kein Unterschied zwischen LPS und der Serogruppe B ($_{LPS}68,3\%$ (54,7-76,9%) versus $_B67,7\%$ (51,9-82,2%); $p = 0,433$) (nicht abgebildet). Bei den Säuglingen gibt es hinsichtlich der Anzahl IL-8-produzierender Monozyten keine Unterschiede nach der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B (nicht abgebildet). Die Gruppe der Erwachsenen zeigt bei Stimulation durch A-Meningokokken einen etwas geringeren Anteil IL-8-produzierender Monozyten als bei Stimulation mit LPS ($_A89,8\%$ (66,7-94,0%) versus $_{LPS}91,1\%$ (84,4-95,4%); $p = 0,049$). Der Vergleich von LPS und B-Meningokokken sowie der beiden Serogruppen untereinander ergibt keine signifikanten Unterschiede ($_{LPS}91,1\%$ (84,4-95,4%) bzw. $_A89,8\%$ (66,7-94,0%) versus $_B90,0\%$ (73,1-93,1%); $p = 0,131$ bzw. $p = 0,532$).

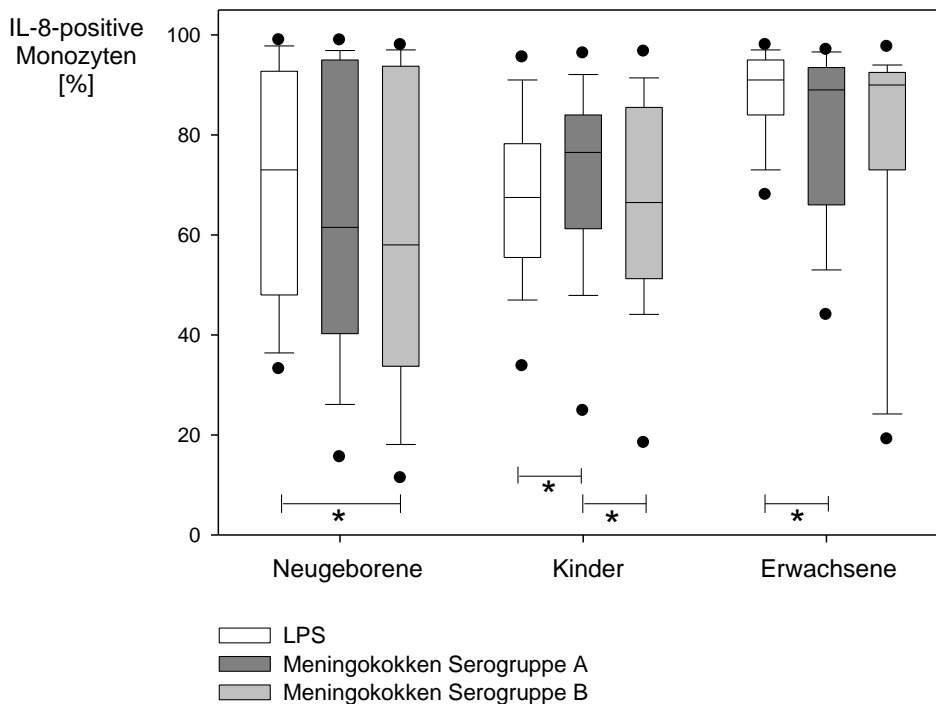


Abb. 4 IL-8-Bildung: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B

Beim Vergleich des LPS und der beiden Bakterienstämme miteinander zeigen Neugeborene und Erwachsene nach LPS-Stimulation und Kinder nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A den in ihrer Altersgruppe höchsten Anteil IL-8-produzierender Monozyten. Dieser ist in Prozent der CD14-positiven Monozytenpopulation dargestellt und jeweils durch die 5., 10., 25., 50., 75., 90. und 95. Perzentile beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulanzen ($p \leq 0,05$) sind mit (*) gekennzeichnet.

6.1.3 TNF- α -Bildung

6.1.3.1 LPS versus Meningokokken

Neugeborene reagieren auf die Stimulation mit Meningokokken, insbesondere mit denen der Serogruppe A, mit einer höheren TNF- α -Produktion als auf eine Stimulation mit LPS ($A_{53,1\%}$ (17,4-69,1%) bzw. $B_{38,5\%}$ (15,0-66,8%) versus $LPS_{33,1\%}$ (11,9-46,7%); $p = 0,001$ bzw. $p = 0,038$) (Abb. 5). Ausgeprägter noch als bei den Neugeborenen zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis bei der Betrachtung der Gruppe der Kinder. Bei ihnen ist der Anteil der TNF- α -produzierenden Monozyten nach Stimulation mit Meningokokken verglichen mit der Stimulation durch LPS deutlich größer ($A_{70,4\%}$ (60,3-78,8%) bzw. $B_{64,3\%}$ (52,3-72,1%) versus $LPS_{44,6\%}$ (30,4-55,0%); $p < 0,001$) (Abb. 5 und 6).

Ein ähnliches Bild findet sich auch bei Betrachtung der Kleinkinder ($A_{77,8\%}$ (65,8-79,2%) bzw. $B_{64,3\%}$ (52,5-71,4%) versus $LPS_{47,8\%}$ (42,0-56,5%); $p = 0,001$). Die Säuglinge zeigen ebenfalls eine stärkere TNF- α -Stimulation durch Meningokokken als durch LPS ($A_{64,9\%}$ (44,2-70,3%) bzw. $B_{63,9\%}$ (49,5-76,2%) versus $LPS_{36,2\%}$ (21,9-53,5%); $p = 0,028$ bzw. $p = 0,005$), wobei der Unterschied in dieser Altersgruppe weniger ausgeprägt ist als bei den Kleinkindern (Abb. 7). Im Gegensatz zu den Neugeborenen und zu den Kindern führt die LPS-Stimulation bei den Erwachsenen, verglichen mit der Stimulation durch Meningokokken, nicht zu signifikanten Unterschieden bezüglich der Anteile der TNF- α -bildenden Zellen ($LPS_{32,4\%}$ (12,4-60,6%) versus $A_{27,7\%}$ (14,5-52,7%) bzw. versus $B_{32,0\%}$ (20,4-59,4%); $p = 0,107$, $p = 0,778$) (Abb. 5).

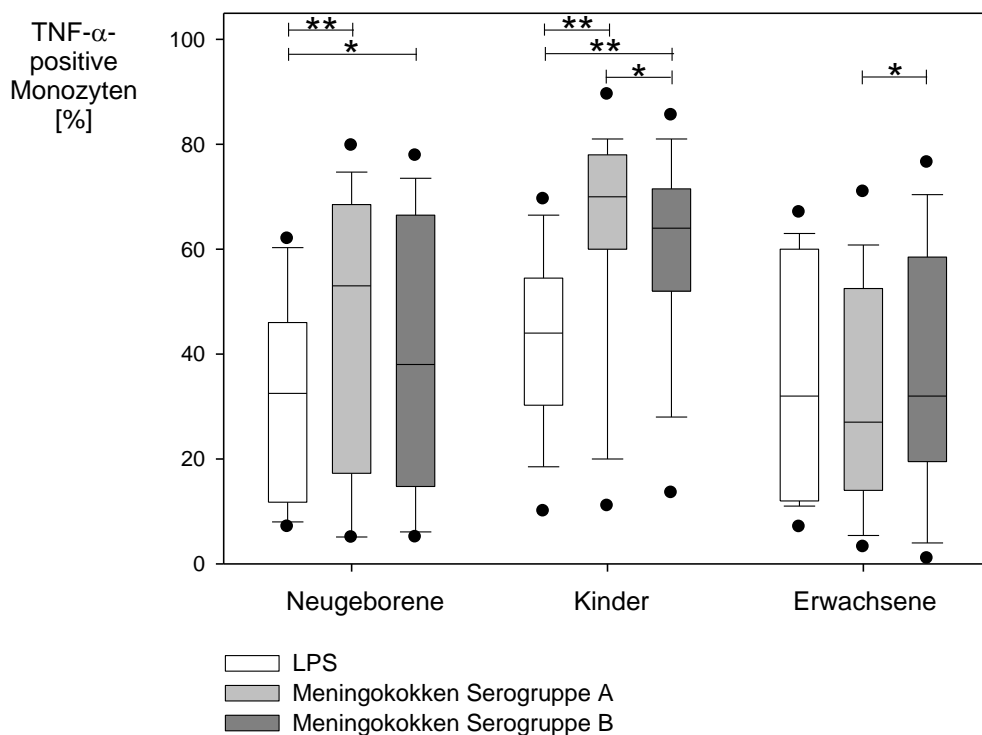


Abb. 5 TNF- α -Bildung: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B

Die Stimulation mit Meningokokken regt bei den Neugeborenen und noch deutlicher bei den Kindern mehr Monozyten zur TNF- α -Bildung an als die Stimulation mit LPS. Besonders ausgeprägt zeigt sich dieser Unterschied nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A. Die Ergebnisse sind durch den Median mit den unteren und oberen Quartilen sowie der 5., 10., 90. und 95. Perzentile abgebildet. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**)

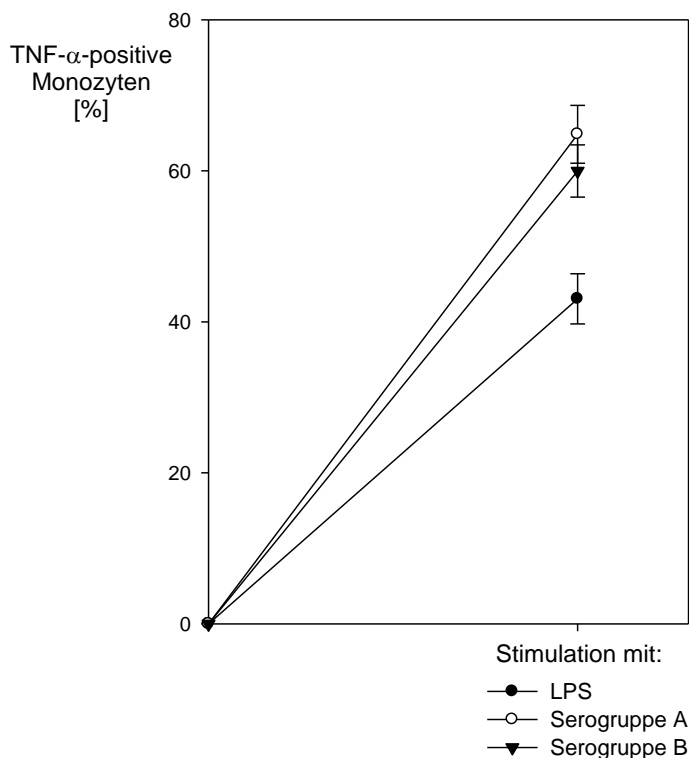


Abb. 6 TNF- α -Bildung bei Kindern: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B

Kindliches Vollblut reagiert auf die Stimulation mit Meningokokken mit einem deutlich größeren Anteil TNF- α -positiver Monozyten als auf die Stimulation mit LPS. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler.

6.1.3.2 Serogruppe A versus Serogruppe B

Bei den Neugeborenen ist kein signifikanter Unterschied zwischen der TNF- α -Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A und der Serogruppe B festzustellen ($_A$ 53,1% (17,4-69,1%) versus $_B$ 38,5% (15,0-66,8%); $p = 0,145$) (Abb. 5). Auch bei den Säuglingen zeigen beide Serogruppen im Vergleich miteinander keinen Unterschied ($_A$ 64,9% (44,2-70,3%) versus $_B$ 63,9% (49,5-76,2%); $p = 0,875$). Die Kleinkinder reagieren dagegen mit einer deutlich stärkeren TNF- α -Expression auf die Stimulation mit Bakterien der Serogruppe A als der Serogruppe B ($_A$ 77,8% (65,8-79,2%) versus $_B$ 64,3% (52,5-71,4%); $p = 0,001$) (Abb. 7). Die Betrachtung der Säuglinge und Kleinkinder zusammengefasst zeigt weiterhin eine größere TNF- α -stimulierende Wirkung durch die A- als durch die B-Meningokokken ($_A$ 70,4% (60,3-78,8%) versus $_B$ 64,3% (52,3-72,1%); $p = 0,008$). Im Gegensatz dazu führt bei den Erwachsenen die Serogruppe B zu einer etwas höheren TNF- α -Bildung als die Serogruppe A ($_B$ 32,0% (20,4-59,4%) versus $_A$ 27,7% (14,5-52,7%); $p = 0,023$) (Abb. 5).

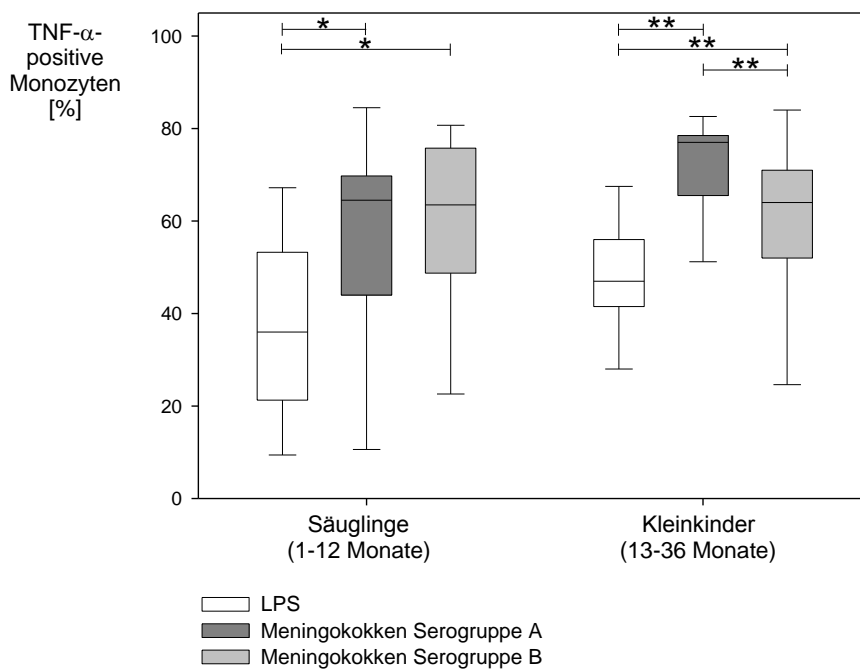


Abb. 7 TNF- α -Bildung bei Säuglingen und Kleinkindern: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B

Die TNF- α -Bildung wird bei Säuglingen und Kleinkindern stärker durch Meningokokken als durch LPS angeregt. Meningokokken der Serogruppe A zeigen bei den Kleinkindern eine stärker stimulatorische Wirkung als Meningokokken der Serogruppe B. Der TNF- α -positive Anteil der Monozyten ist in der Abbildung durch den Median, den Interquartilbereich sowie die 10. und 90. Perzentile dargestellt. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**)

6.2 Zytokinbildung in Abhängigkeit vom Alter der Probanden

Proinflammatorische Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese septischer Erkrankungen wie sie auch durch Meningokokken hervorgerufen werden. Erkrankungen durch Meningokokken treten jedoch nicht gleichmäßig über alle Altersschichten verteilt auf, sondern zeigen eine Häufung in den ersten Lebensjahren und insbesondere im Säuglingsalter. Um mögliche altersabhängige Unterschiede im Ausmaß der Zytokinproduktion aufzuspüren, wurde Vollblut sowohl von Neugeborenen, Kindern als auch Erwachsenen durch LPS und Meningokokken zur Zytokinbildung angeregt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der IL-6-, IL-8- und TNF- α -positive Anteil an den Monozyten bestimmt. Die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen sind für die einzelnen Zytokine in Kapitel 6.2.1 bis 6.2.3 dargestellt. Die Ergebnisse der Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen Kindesalter und Ausmaß der Zytokinproduktion finden sich in Kapitel 6.2.4.

6.2.1 IL-6-Bildung

6.2.1.1 LPS

Nach Stimulation mit LPS reagieren die Kinder (K) verglichen mit den Neugeborenen (NG) mit einem höheren Anteil IL-6-bildender Zellen (K 68,8% (61,5-74,9%) versus NG 58,8% (48,9-66,8%); $p = 0,008$). Im Vergleich mit den Erwachsenen (Erw) zeigen sich weder bei den Neugeborenen noch bei den Kindern signifikante Unterschiede (Erw 65,2% (54,1-73,0%) versus NG 58,8% (48,9-66,8%) bzw. versus K 68,8% (61,5-74,9%); $p = 0,201$ bzw. $p = 0,148$) (Abb. 8).

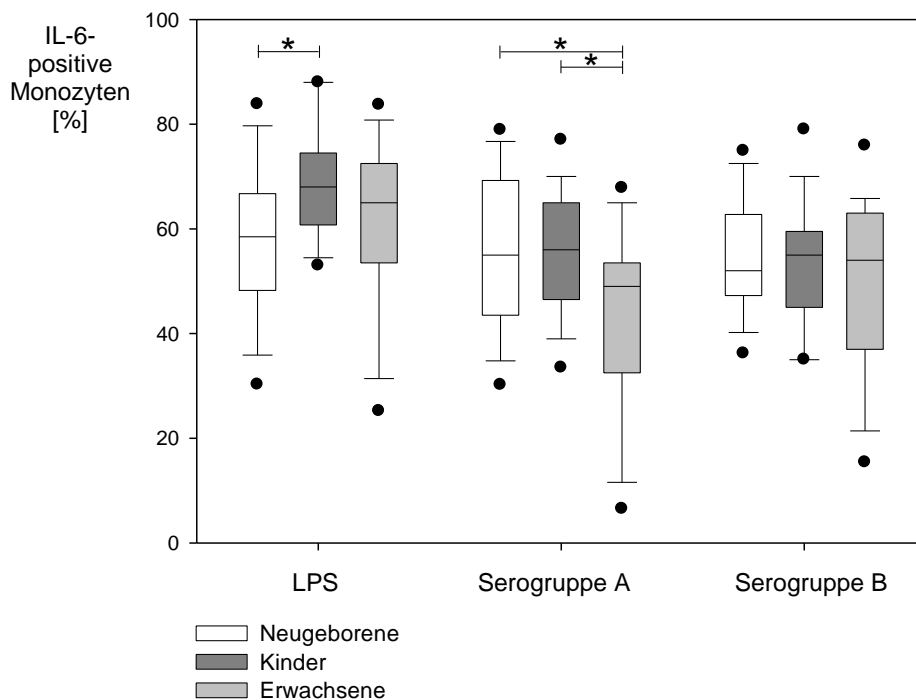


Abb. 8 IL-6-Bildung: Vergleich zwischen Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen

Nach LPS-Stimulation zeigen Kinder einen höheren Anteil IL-6-produzierender Monozyten als Neugeborene. Nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A kommt es sowohl bei Neugeborenen als auch Kindern zu einer stärkeren IL-6-Bildung als bei Erwachsenen. Die Reaktion auf Stimulation mit B-Meningokokken unterscheidet sich nicht zwischen den verschiedenen Altersgruppen. In der Abbildung sind jeweils die 5., 10., 25., 50., 75., 90. und 95. Perzentile dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen ($p \leq 0,05$) sind durch (*) gekennzeichnet.

6.2.1.2 Meningokokken

Nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A fällt die IL-6-Bildung sowohl bei den Kindern als auch bei den Neugeborenen signifikant stärker aus als bei den Erwachsenen (K 56,7% (47,0-65,4%) bzw. NG 55,4% (44,2-69,5%) versus Erw 49,0% (33,1-54,2%); $p = 0,011$ bzw. $p = 0,018$) (Abb. 8). Bei Unterteilung des Kinderkollektivs in Ein- bis Dreijährige und ein bis zwölf Monate alte Kinder gibt es bei den Kleinkindern (KK) im Vergleich zu den Erwachsenen keine signifikanten Unterschiede in der IL-6-Produktion, wohingegen die Säuglinge (Sgl) eine stärkere IL-6-Bildung zeigen als die Erwachsenen (KK 54,0% (44,1-65,4%) bzw. Sgl 58,8% (53,3-66,9%) versus Erw 49,0% (33,1-54,2%); $p = 0,121$ bzw. $p = 0,004$) (Abb. 9). Die IL-6-Bildung nach Stimulation mit A-Meningokokken unterscheidet sich bei den Neugeborenen nicht von derjenigen der Kinder ($p = 0,863$). Nach Stimulation mit B-Meningokokken ergeben sich zwischen den einzelnen Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede des IL-6-positiven Anteils der Monozyten (Abb. 8).

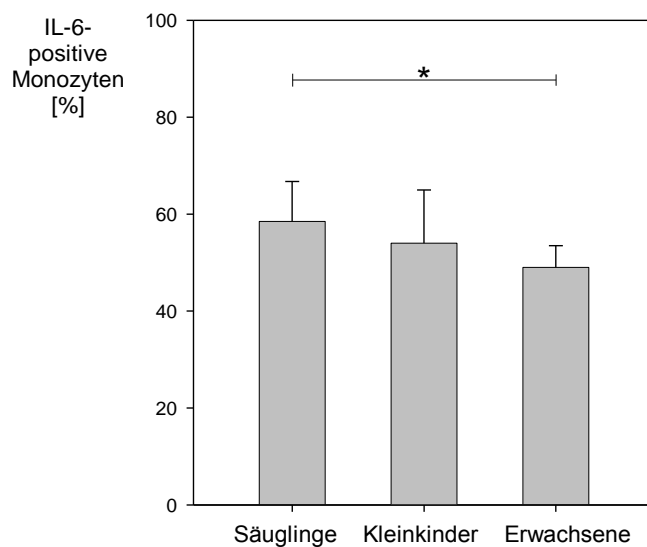


Abb. 9 IL-6-Bildung: Vergleich zwischen Säuglingen, Kleinkindern und Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A

Nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A zeigt der Vergleich der IL-6-Bildung von Säuglingen und Kleinkindern mit der von Erwachsenen einen signifikanten Unterschied zwischen den Säuglingen und Erwachsenen ($p \leq 0,05$ (*)). Abgebildet sind der Median und die 75. Perzentile.

6.2.2 IL-8-Bildung

6.2.2.1 LPS

Bei den Erwachsenen führt die Stimulation mit LPS zu einem sehr hohen Anteil IL-8-positiver Zellen (E_{Erw} 91,1% (84,4-95,4%)). Dieser ist signifikant höher als bei den Neugeborenen (E_{Erw} 91,1% (84,4-95,4%) versus N_{G} 73,5% (48,2-93,1%); $p = 0,029$) (Abb. 10). Ein noch deutlicherer Unterschied zeigt sich im Vergleich der Erwachsenen zu den Kindern (E_{Erw} 91,1% (84,4-95,4%) versus K 68,3% (56,1-78,6%); $p < 0,001$), wobei der Unterschied zu den 13 bis 36 Monate alten Kleinkindern deutlicher ausfällt als zu den Säuglingen (E_{Erw} 91,1% (84,4-95,4%) versus K_K 68,3% (54,7-76,9%) bzw. versus S_{gl} 67,5% (55,2-83,9%); $p < 0,001$ bzw. $p = 0,001$) (Abb. 10 und 11). Kinder und Neugeborene unterscheiden sich nicht in ihrer IL-8-Bildung nach LPS-Stimulation. Auffällig ist die breite Streuung der ermittelten Daten der Neugeborenen insbesondere im Vergleich zu den Erwachsenen. Während sich der Interquartilbereich I_{50} bei den Neugeborenen über 45 Prozentpunkte erstreckt, zeigt sich bei den Erwachsenen eine Breite von $I_{50} = 11\%$ (Abb. 10).

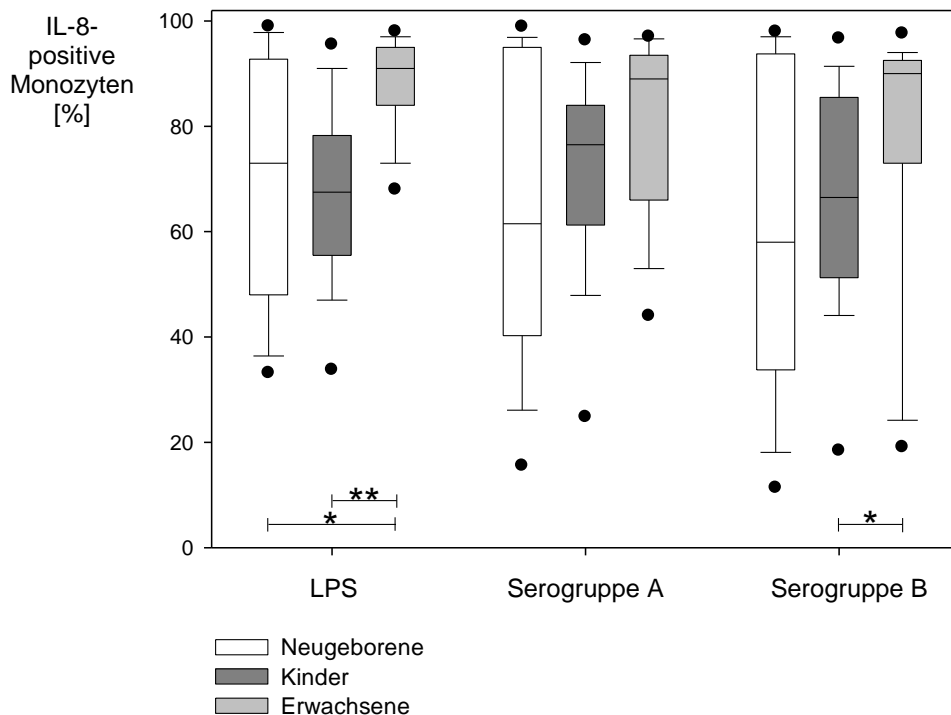


Abb. 10 IL-8-Bildung: Vergleich zwischen Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen

Der höchste Anteil IL-8-positiver Monozyten findet sich jeweils bei den Erwachsenen. Besonders eindeutig ist die stärker ausgeprägte IL-8-Bildung der Erwachsenen nach Stimulation mit LPS. Die Neugeborenen zeigen eine auffallend breite Streuung mit Quartilsabständen von bis über 60 Prozentpunkten. Es sind die Mediane mit den Quartilen sowie die 5., 10., 90. und 95. Perzentile abgebildet. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**)

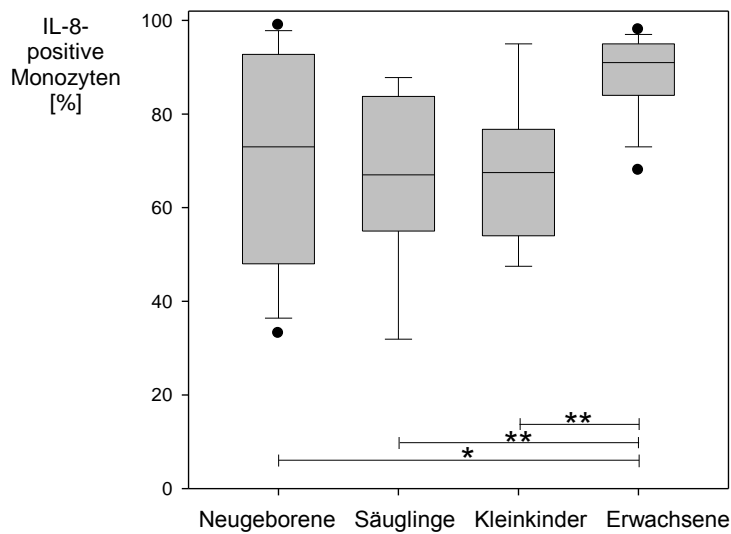


Abb. 11 IL-8-Bildung: Vergleich zwischen Neugeborenen, Säuglingen, Kleinkindern und Erwachsenen nach Stimulation mit LPS

Erwachsene zeigen nach LPS-Stimulation einen hohen Anteil IL-8-positiver Monozyten. Der Unterschied der Erwachsenen zu den anderen Altersgruppen nimmt dabei von den Neugeborenen über die Säuglinge bis hin zu den Kleinkindern zu. Dargestellt sind die 5., 10., 25., 50., 75., 90. und 95. Perzentile. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**).

6.2.2.2 Meningokokken

Ebenso wie LPS stimulieren bei den Erwachsenen auch Meningokokken eine große Zahl der Monozyten zur IL-8-Expression. Meningokokken führen bei Kindern zu einer geringeren IL-8-Bildung als bei Erwachsenen, ein signifikanter Unterschied findet sich aber lediglich nach Stimulation mit Bakterien der Serogruppe B (Serogruppe B: E_{rw} 90,0% (73,1-93,1%) versus K 67,3% (51,4-86,0%); $p = 0,01$; Serogruppe A: E_{rw} 89,8% (66,7-94,0%) versus K 76,9% (61,7-84,7%); $p = 0,056$). Neugeborene zeigen weder im Vergleich zu Erwachsenen noch im Vergleich zu Kindern eindeutige Unterschiede. Auch bei den Meningokokken zeigen die Neugeborenen eine große Streubreite der Messwerte (Serogruppe A: $I_{50} = 55\%$, Serogruppe B: $I_{50} = 61\%$). Demgegenüber betragen die Interquartilbereiche beispielsweise der Erwachsenen bei der Serogruppe A $I_{50} = 27\%$ und bei der Serogruppe B $I_{50} = 20\%$ (Abb. 10)

6.2.3 TNF- α -Bildung

6.2.3.1 LPS

LPS regt bei Kindern mehr Monozyten zur TNF- α -Bildung an als bei Neugeborenen (K 44,6% (30,4-55,0%) versus NG 33,1% (11,9-46,7%); $p = 0,032$). Der Unterschied der Kinder gegenüber den Erwachsenen stellt sich nicht-signifikant dar (K 44,6% (30,4-55,0%) versus Erw 32,4% (12,4-60,6%); $p = 0,212$). Die TNF- α -Expression der Erwachsenen unterscheidet sich nicht nennenswert von der der Neugeborenen (Erw 32,4% (12,4-60,6%) versus NG 33,1% (11,9-46,7%); $p = 0,593$) (Abb. 12).

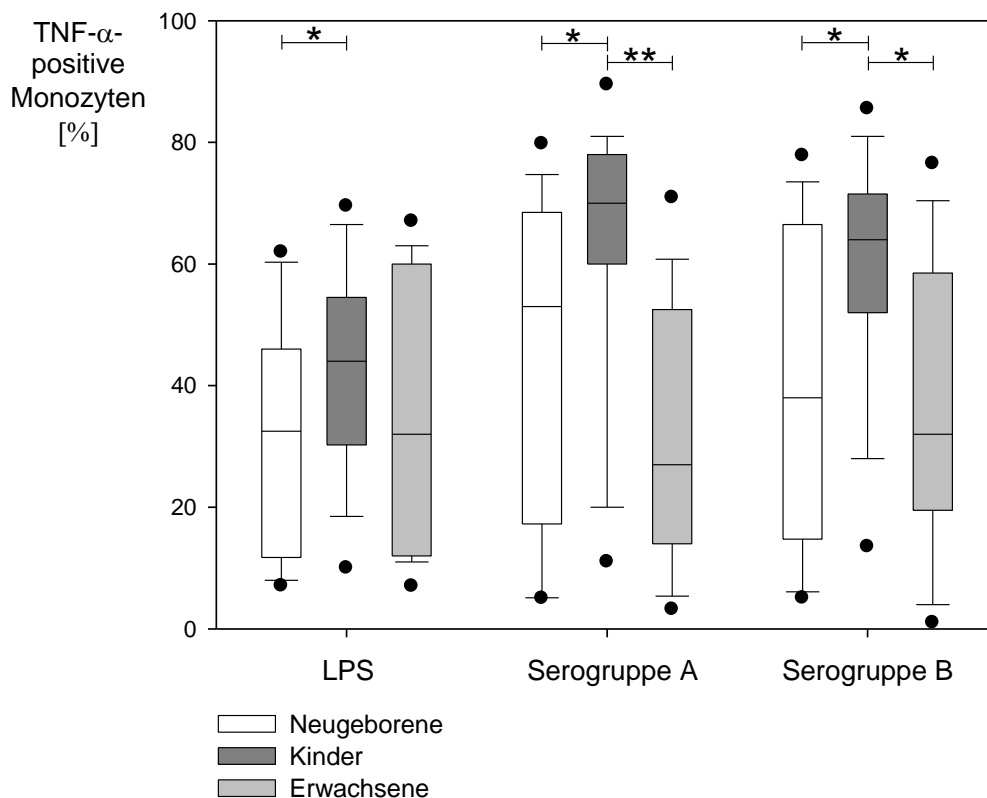


Abb. 12 TNF- α -Bildung: Vergleich zwischen Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen

Nach Stimulation mit LPS und Meningokokken kommt es bei den Kindern zur stärksten TNF- α -Bildung. Besonders deutlich zeigt sich der im Vergleich zu den Neugeborenen und Erwachsenen höhere Anteil TNF- α -positiver Monozyten nach Stimulation mit Meningokokken. Median und Quartile sind jeweils durch eine Box veranschaulicht. Die Whiskers stellen die 10. und 90., die Punkte die 5. und 95. Perzentile dar. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**)

6.2.3.2 Meningokokken

Auf Stimulation mit Meningokokken reagieren Kinder im Alter von 1 bis 36 Monaten mit einer stärkeren TNF- α -Produktion als Neugeborene und Erwachsene. Vor allem gegenüber den Erwachsenen ist der Anteil TNF- α -bildender Zellen stark erhöht (Serogruppe A: κ 70,4% (60,3-78,8%) versus Erw 27,7% (14,5-52,7%); $p < 0,001$; Serogruppe B: κ 64,3% (52,3-72,1%) versus Erw 32,0% (20,4-59,4%); $p = 0,002$), doch auch im Vergleich zu den Neugeborenen fällt die Zytokinbildung deutlich stärker aus (Serogruppe A: κ 70,4% (60,3-78,8%) versus NG 53,1% (17,4-69,1%); $p = 0,004$; Serogruppe B: κ 64,3% (52,3-72,1%) versus NG 38,5% (15,0-66,8%); $p = 0,016$) (Abb. 12 und 13). Erwachsene und Neugeborene zeigen keine signifikanten Unterschiede (Serogruppe A: $p = 0,081$; Serogruppe B: $p = 0,876$) (Abb. 12). Beim Vergleich der Säuglinge mit den Kleinkindern fallen die Kleinkinder durch eine stärkere TNF- α -Bildung nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A auf ($\kappa\kappa$ 77,8 (65,8-79,2%) versus sgl 64,9 (44,2-70,3%); $p = 0,046$) (nicht abgebildet).

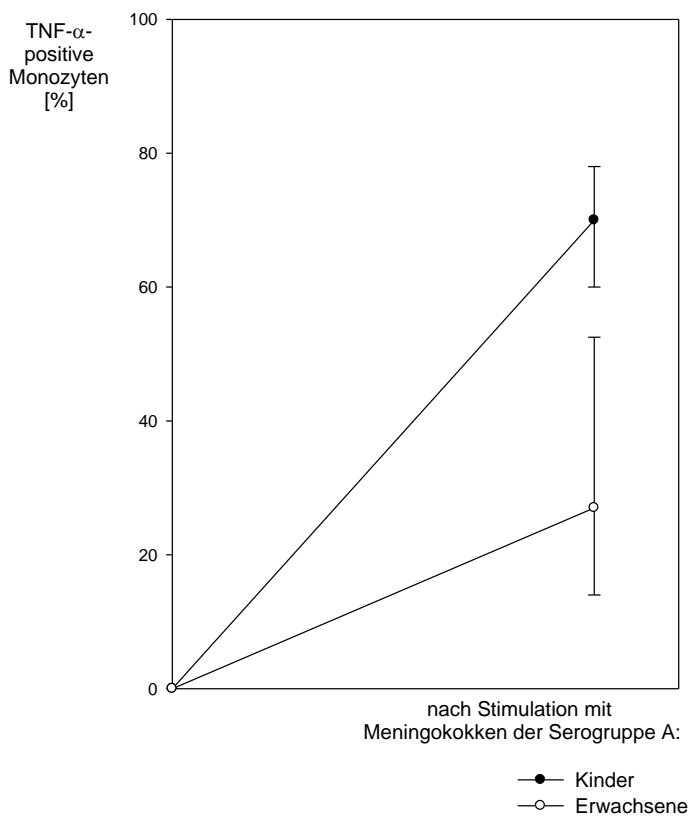


Abb. 13 TNF- α -Bildung: Vergleich zwischen Kindern und Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A

Auf Stimulation mit Meningokokken reagieren Kinder mit einer deutlich höheren TNF- α -Bildung als Erwachsene. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile.

6.2.4 Korrelation zwischen Kindesalter und Zytokinbildung

Es zeigen sich keine bedeutenden Korrelationen zwischen Kindesalter (1-36 Monate) und Zytokinproduktion.

6.2.4.1 IL-6-Bildung

Das Alter der Kinder (1-36 Monate) und die IL-6-Produktion zeigen eine nicht-signifikante, sehr geringe positive Korrelation ($< 0,2$) nach Stimulation mit LPS sowie nicht-signifikante, geringe negative Korrelationen ($> -0,5$) nach Stimulation mit Meningokokken beider Stämme mit und ohne Zusatz von Epo.

6.2.4.2 IL-8-Bildung

Alter der Kinder und IL-8-Bildung zeigen unabhängig von der Art der Stimulation keine signifikanten Korrelationen. Nach Stimulation mit LPS zeigt sich eine sehr geringe negative Korrelation, nach Stimulation mit Meningokokken mit und ohne Epo zeigen sich geringe oder sehr geringe positive Korrelationen.

6.2.4.3 TNF- α -Bildung

Das Alter der Kinder und die TNF- α -Bildung zeigen bei Zusatz von 100 IE Epo bzw. 500 IE Epo nach Stimulation mit B-Meningokokken eine signifikante, geringe positive Korrelation. Bei den anderen Stimulationsansätzen gab es keine signifikanten Korrelationen zwischen der TNF- α -Produktion und dem Alter der Kinder.

6.3 Beeinflussung der Zytokinbildung durch Erythropoietin

Zur Klärung, inwieweit Epo eine durch Meningokokken stimulierte Produktion der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α zu beeinflussen vermag, wurde Blut von Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen mit Meningokokken der Serogruppen A und B stimuliert und ein Teil der Ansätze mit Epo in zwei verschiedenen hohen Dosen versetzt. Anschließend wurde der zytokinpositive Anteil der Monozyten durchflusszytometrisch bestimmt und zwischen den Ansätzen ohne und mit Epo verglichen.

6.3.1 Neugeborene

Der Zusatz von 500 IE Epo bewirkt bei Neugeborenen nach Stimulation mit Meningokokken im Mittel eine Reduktion der IL-6- und TNF- α -synthetisierenden Monozyten um etwa 30%. IL-8 zeigt sich durch 500 IE Epo weitgehend unbeeinflusst. 100 IE Epo führen dagegen zu einer ca. 10%igen Steigerung des IL-8-positiven Anteils der Monozyten (Abb. 14a und 14b). Eine detailliertere Darstellung des Verhaltens der einzelnen Zytokine unter dem Einfluss von Epo findet sich in den Kapiteln 6.3.1.1 bis 6.3.1.3.

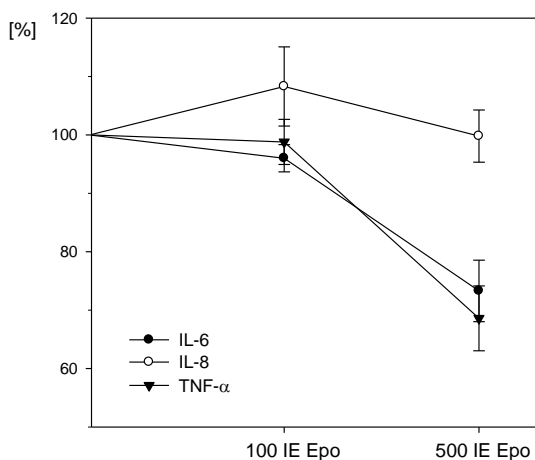


Abb. 14a Neugeborene:
Serogruppe A und Epo

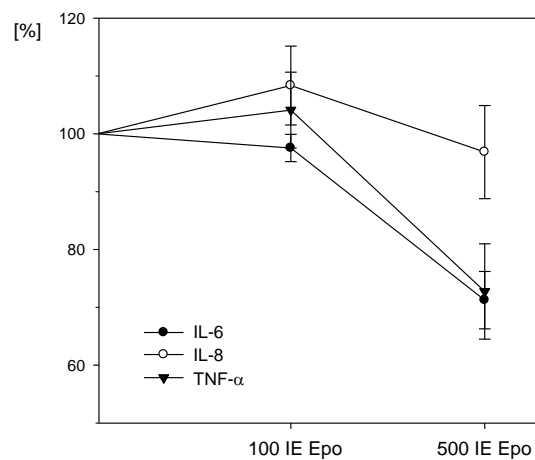


Abb. 14b Neugeborene:
Serogruppe B und Epo

Dargestellt sind prozentuale Veränderungen in der Zytokinbildung nach Stimulation mit Meningokokken durch Zusatz von Epo gegenüber der Stimulation ohne Zusatz von Epo (= 100%) bei Neugeborenen. Während 100 IE Epo keine relevanten Veränderungen der IL-6- und TNF- α -Bildung bewirken, kommt es unter dem Einfluss von 500 IE Epo zu einer Reduktion der Anzahl IL-6- und TNF- α -bildender Zellen um etwa 25 bis 30%. Das IL-8 zeigt sich bei den Neugeborenen dagegen weitgehend unbeeinflusst durch Epo. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardfehler.

6.3.1.1 IL-6

Der Zusatz von 500 IE Epo zur Stimulation mit Meningokokken bewirkt bei Neugeborenen eine deutliche Reduktion des Anteils IL-6-bildender Zellen im Vergleich zur Stimulation ohne Epo (Serogruppe A: 55,4% (44,2-69,5%) versus 44,4% (31,1-56,1%); $p < 0,001$, Serogruppe B: 52,3% (47,5-63,1%) versus 40,0% (27,2-51,7%); $p < 0,001$). Auch bei Zugabe von 100 IE Epo zeigt sich bei der Serogruppe A eine signifikante, aber weniger ausgeprägte Verringerung der IL-6-Expression (55,4% (44,2-69,5%) versus 53,7% (45,6-67,6%); $p = 0,014$) (Abb. 15).

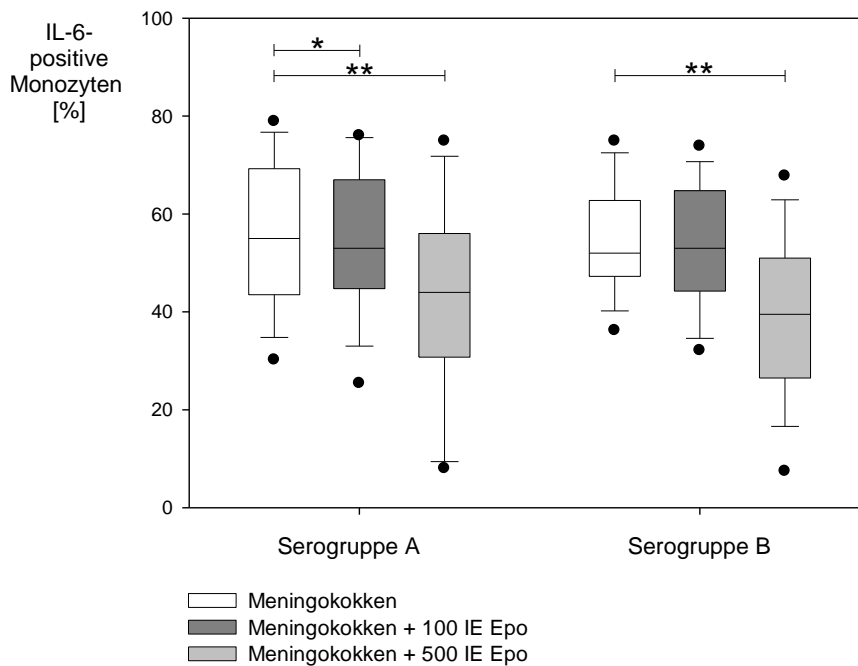


Abb. 15 Einfluss von Epo auf die IL-6-Bildung bei Neugeborenen nach Stimulation mit Meningokokken

Epo zeigt bei den Neugeborenen, vor allem in höherer Dosierung eingesetzt, einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von IL-6 nach Stimulation mit Meningokokken. Dargestellt sind der Median mit den Quartilen und die 5., 10., 90. und 95. Perzentile. Signifikante Unterschiede innerhalb einer Serogruppe sind gekennzeichnet: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**).

6.3.1.2 IL-8

Epo zeigt keine relevante Beeinflussung der durch Meningokokken angeregten IL-8-Bildung bei Neugeborenen (nicht abgebildet).

6.3.1.3 TNF- α

Die TNF- α -Expression der Neugeborenen bleibt durch die geringere Dosis Epo unbeeinflusst (Serogruppe A: 53,1% (17,4-69,1%) versus 46,1% (20,6-68,0%); $p = 0,695$, Serogruppe B: 38,5% (15,0-66,8%) versus 38,7% (13,1-65,9%); $p = 0,856$). Dagegen verursacht die höhere Dosis Epo eine deutliche Reduktion der TNF- α -Produktion verglichen mit der Stimulation ohne Zusatz von Epo (Serogruppe A: 53,1% (17,4-69,1%) versus 39,7% (13,1-49,7%); $p < 0,001$, Serogruppe B: 38,5% (15,0-66,8%) versus 28,1% (8,1-50,3%); $p = 0,002$) (Abb. 16).

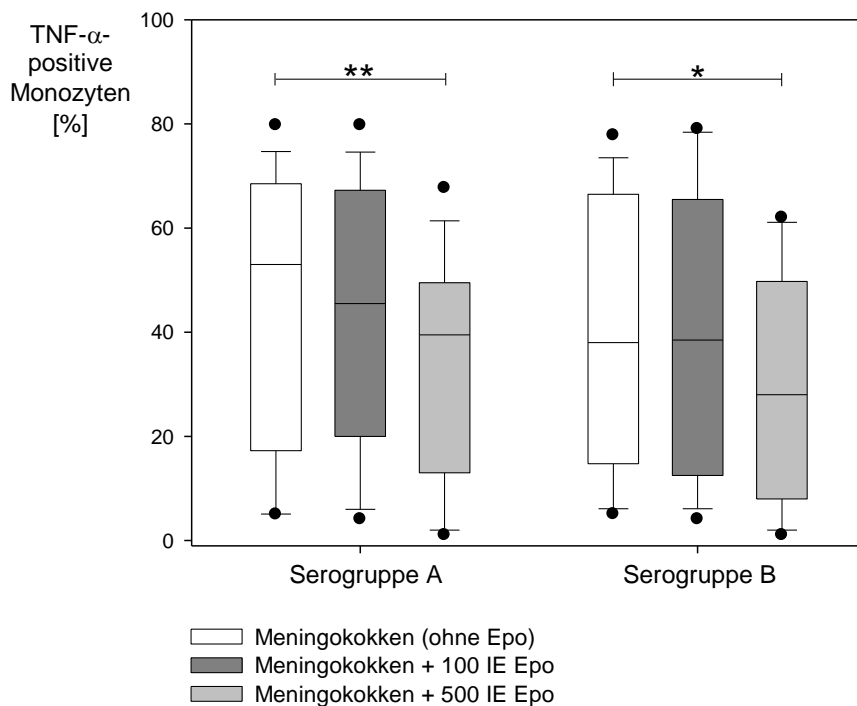


Abb. 16 Einfluss von Epo auf die TNF- α -Bildung bei Neugeborenen nach Stimulation mit Meningokokken

Die höhere eingesetzte Menge Epo führt bei Stimulation von Vollblut Neugeborener mit Meningokokken zu einer Reduktion des Anteils TNF- α -positiver Monozyten. Die Ergebnisse sind abgebildet durch die 5., 10., 25., 50., 75., 90. und 95. Perzentile. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**)

6.3.2 Kinder

Kinder reagieren mit einer verminderten IL-6- und TNF- α -Produktion auf die Zugabe insbesondere der höheren eingesetzten Dosis Epo, wohingegen das IL-8 durch Epo nicht gehemmt wird (Abb. 17a und 17b). Eine genauere Betrachtung des Verhaltens der einzelnen Zytokine unter dem Einfluss von Epo bei Kindern findet sich in den Kapiteln 6.3.2.1 bis 6.3.2.3.

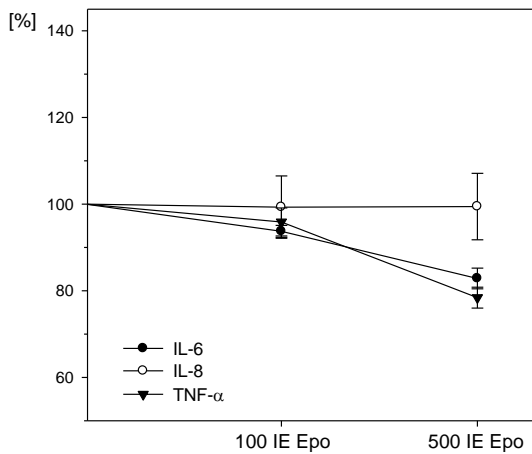


Abb. 17a Kinder: Serogruppe A und Epo

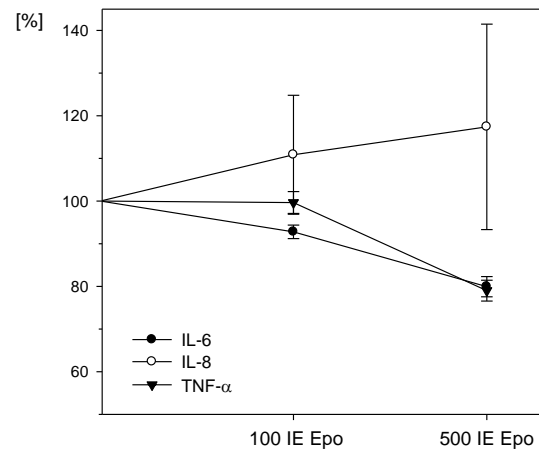


Abb. 17b Kinder: Serogruppe B und Epo

Abgebildet sind Veränderungen der IL-6-, IL-8- und TNF- α -Bildung durch Epo ausgehend von der Zytokinbildung nach Stimulation mit Meningokokken ohne Zusatz von Epo. Es zeigt sich ein hemmender Effekt auf die IL-6- und TNF- α -Produktion insbesondere bei Zugabe von 500 IE Epo. Beim IL-8 lässt sich dagegen keine hemmende Wirkung durch Epo feststellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler.

6.3.2.1 IL-6

Bei Kindern stellt sich die durch Meningokokken angeregte Bildung von IL-6 unter dem Einfluss von 500 IE Epo deutlich geringer dar als bei Stimulation mit Meningokokken ohne Zugabe von Epo (Serogruppe A: 56,7% (47,0-65,4%) versus 49,2% (35,9-56,0%); $p < 0,001$; Serogruppe B: 55,2% (45,9-60,0%) versus 43,5% (32,0-56,0%); $p < 0,001$). Der Zusatz von 100 IE Epo bewirkt keine relevante Beeinflussung der IL-6-Bildung bei Kindern (Abb. 18).

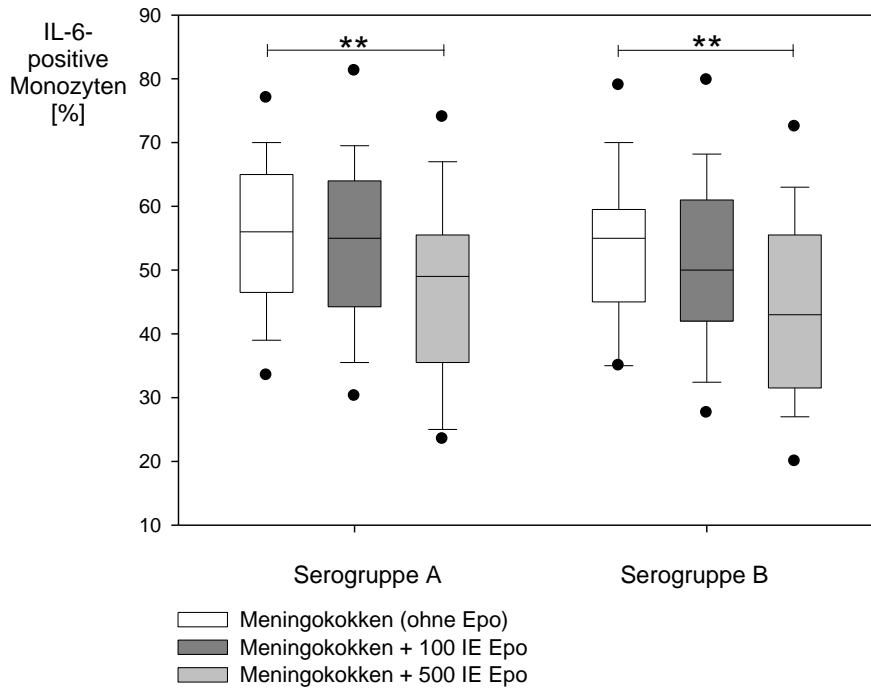


Abb. 18 Einfluss von Epo auf die IL-6-Bildung bei Kindern nach Stimulation mit Meningokokken
Die durch Meningokokken angeregte IL-6-Bildung kindlicher Monozyten wird durch 500 IE Epo gehemmt. Dargestellt sind die Mediane und Interquartilbereiche sowie die 5., 10., 90. und 95. Perzentile. Die Ergebnisse sind signifikant auf einem Niveau von $p \leq 0,001$ (**).

6.3.2.2 IL-8

Nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A zeigt sich unter Einwirkung von 500 IE Epo ein geringerer Anteil IL-8-positiver Zellen als bei Stimulation ohne Epo (76,9% (61,7-84,7%) versus 64,7% (54,4-82,8%); $p = 0,011$). Darüber hinaus stellt sich die IL-8-Bildung der Kinder nicht in signifikantem Maße durch Epo verändert dar (Abb. 19).

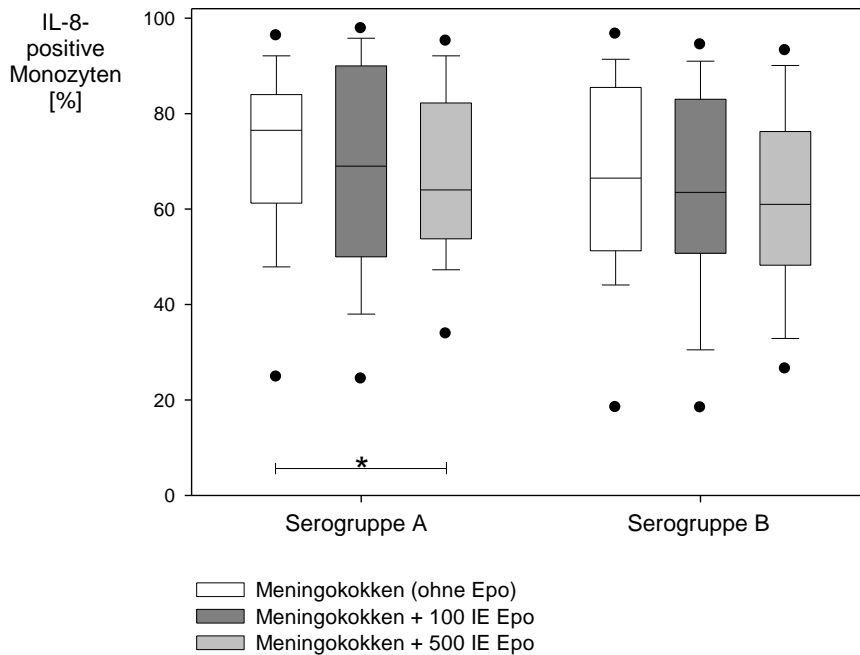


Abb. 19 Einfluss von Epo auf die IL-8-Bildung bei Kindern nach Stimulation mit Meningokokken
Die IL-8-Bildung der Kinder bleibt, abgesehen von einer Reduktion der Zytokinbildung unter 500 IE Epo nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A, durch das Epo weitgehend unbeeinflusst. Dargestellt ist der Anteil IL-8-positiver Monozyten in Prozent der Gesamtmonozyten. Die Abbildung zeigt die 5., 10., 25., 50., 75., 90. und 95. Perzentile. $p \leq 0,05$ (*)

6.3.2.3 TNF- α

Der Zusatz von 500 IE Epo verringert die durch Meningokokken angeregte TNF- α -Bildung der kindlichen Monozyten im Vergleich zur Stimulation ohne Zusatz von Epo (Serogruppe A: 70,4% (60,3-78,8%) versus 56,2% (40,1-66,2%); $p < 0,001$, Serogruppe B: 64,3% (52,3-72,1%) versus 48,4% (38,7-58,6%); $p < 0,001$). Während die niedrigere Menge Epo (100 IE) bei den Meningokokken der Serogruppe A ebenfalls zu einer merklichen Reduktion des TNF- α führt (70,4% (60,3-78,8%) versus 65,6% (52,1-75,2%); $p = 0,003$), zeigt sich ein solcher Effekt bei der Serogruppe B nicht (64,3% (52,3-72,1%) versus 63,3% (55,2-70,8%); $p = 0,28$) (Abb. 20).

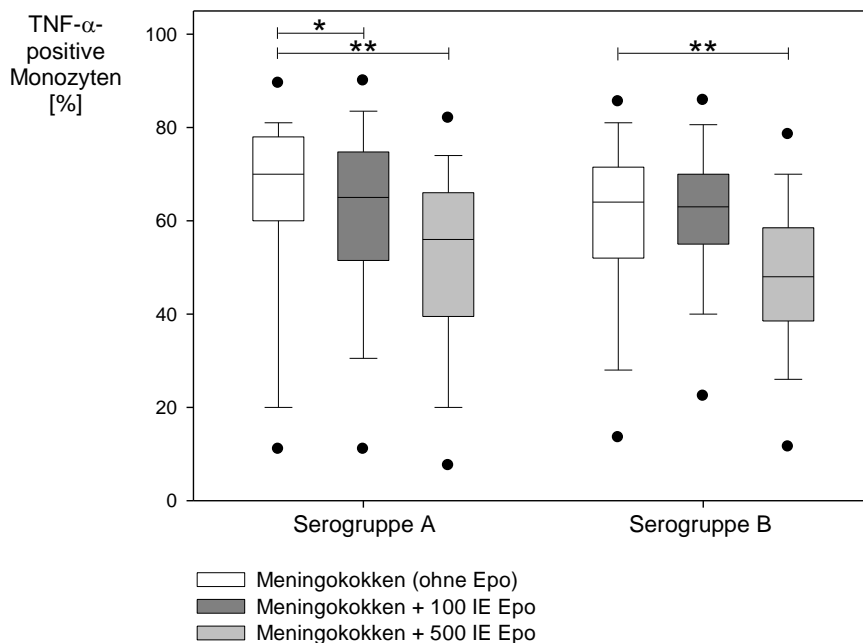


Abb. 20 Einfluss von Epo auf die TNF- α -Bildung bei Kindern nach Stimulation mit Meningokokken
Epo wirkt insbesondere in der Dosierung von 500 IE nach Stimulation mit Meningokokken hemmend auf die monozytäre TNF- α -Bildung bei Kindern. Abgebildet sind die Mediane und der Interquartilbereich, die 10. und 90. Perzentile am Ende der Whiskers und die 5. und 95. Perzentile in Form von Punkten. Signifikante Unterschiede innerhalb einer Serogruppe sind gekennzeichnet: $p \leq 0,05$ (*) bzw. $p \leq 0,001$ (**).

6.3.3 Erwachsene

Abbildung 21a und 21b veranschaulichen die durch Epo bedingten prozentualen Veränderungen des Anteils der IL-6-, IL-8- und TNF- α -bildenden Monozyten nach Stimulation mit Meningokokken bei Erwachsenen. Die deutlichsten Effekte zeigen sich bei der höher gewählten Dosis von 500 IE Epo. Während sie eine deutliche Verminderung der Produktion des IL-6 und TNF- α bewirkt, steigert sie die IL-8-Bildung im Mittel um etwa 10%. Eine weitergehende Betrachtung des Verhaltens der einzelnen Zytokine unter dem Einfluss von Epo erfolgt in den Kapiteln 6.3.3.1 bis 6.3.3.3.

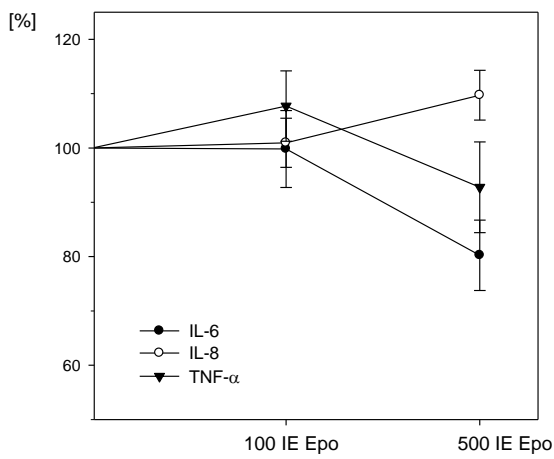


Abb. 21a Erwachsene: Serogruppe A und Epo

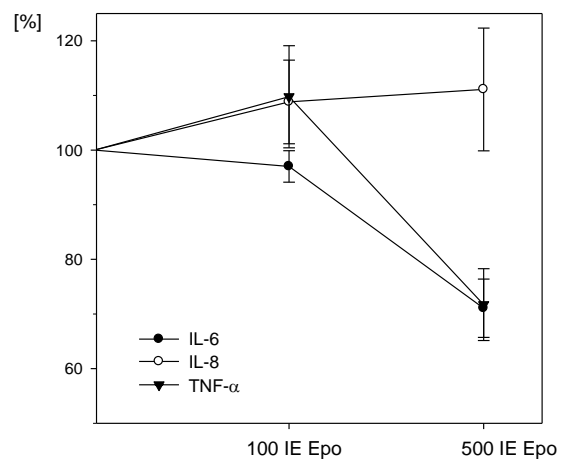


Abb. 21b Erwachsene: Serogruppe B und Epo

Bei den Erwachsenen kommt es unter dem Einfluss von 500 IE Epo zu einer Verringerung der Produktion von IL-6 und TNF- α nach Stimulation mit Meningokokken. Das IL-8 steigt dagegen um etwa 10 % an. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Anteils der zytokinpositiven Monozyten an den Gesamtmonozyten unter dem Einfluss von 100 bzw. 500 IE Epo. Als Ausgangswert wird der Anteil IL-6-, IL-8- bzw. TNF- α -exprimierender Monozyten nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppen A (Abb. 21a) und B (Abb. 21b) ohne Zusatz von Epo betrachtet. Es sind die Mittelwerte und Standardfehler abgebildet.

6.3.3.1 IL-6

Die mit 100 IE niedrig gewählte Dosis Epo führt bei den Erwachsenen zu keiner bedeutsamen Veränderung der IL-6-Expression nach Stimulation mit Meningokokken (Serogruppe A: $p = 0,566$, Serogruppe B: $p = 0,071$). Beim Vergleich der Zytokinbildung ohne Zusatz von Epo mit derjenigen unter einer höher gewählten Dosis von Epo (500 IE) stellt sich der Anteil IL-6-positiver Zellen unter dem Einfluss von Epo dagegen deutlich geringer dar (Serogruppe A: 49,0% (33,1-54,2%) versus 37,4% (23,7-48,6%); $p = 0,001$, Serogruppe B: 54,0% (37,3-63,5%) versus 37,2% (22,9-52,0%); $p < 0,001$) (Abb. 22).

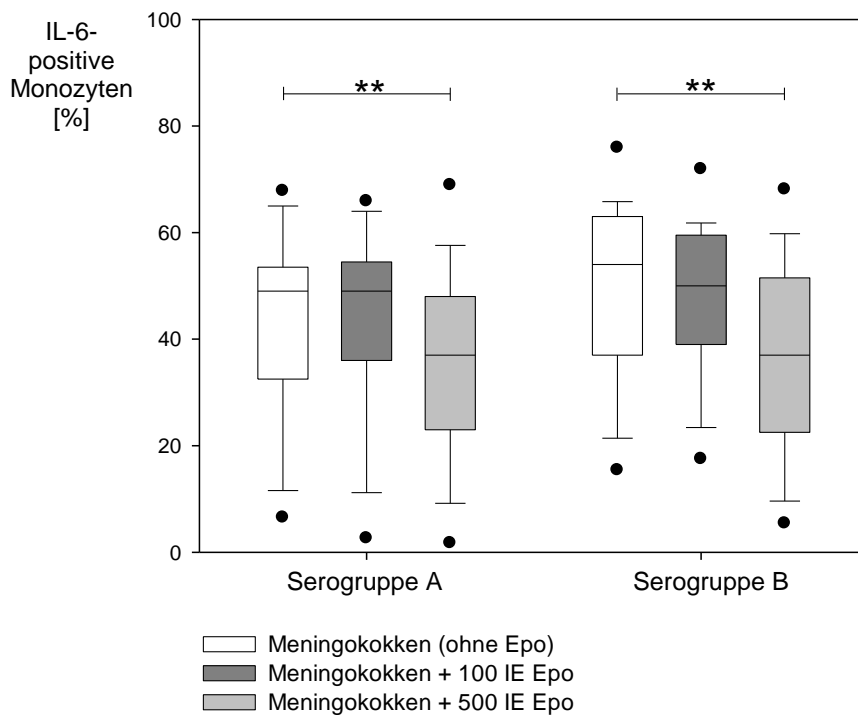


Abb. 22 Einfluss von Epo auf die IL-6-Bildung bei Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken
Eine ausreichend hoch gewählte Dosis Epo führt nach Stimulation mit Meningokokken sowohl der Serogruppe A als auch B bei Erwachsenen zu einer deutlichen Reduktion des IL-6-positiven Anteils der Monozyten. Die Ergebnisse sind durch Box-and-Whisker-Plots veranschaulicht. Eine Box beinhaltet jeweils den Median und wird durch die 25. und 75. Perzentile begrenzt. Die Whisker beschreiben die 10. und 90. und die Punkte die 5. und 95. Perzentile. $p \leq 0,001$ (**)

6.3.3.2 IL-8

Bei den Erwachsenen verursacht Epo bei Verwendung von 100 IE bei der Serogruppe B (90,0% (73,1-93,1) versus 93,2% (72,0-94,9); $p = 0,038$) sowie bei 500 IE Epo bei der Serogruppe A (89,8% (66,7-94,0) versus 92,5% (85,2-95,1); $p = 0,012$) eine leichte Erhöhung des Anteils IL-8-positiver Zellen. Insgesamt zeigt sich die IL-8-Bildung der Erwachsenen kaum durch Epo beeinflusst (Abb. 23).

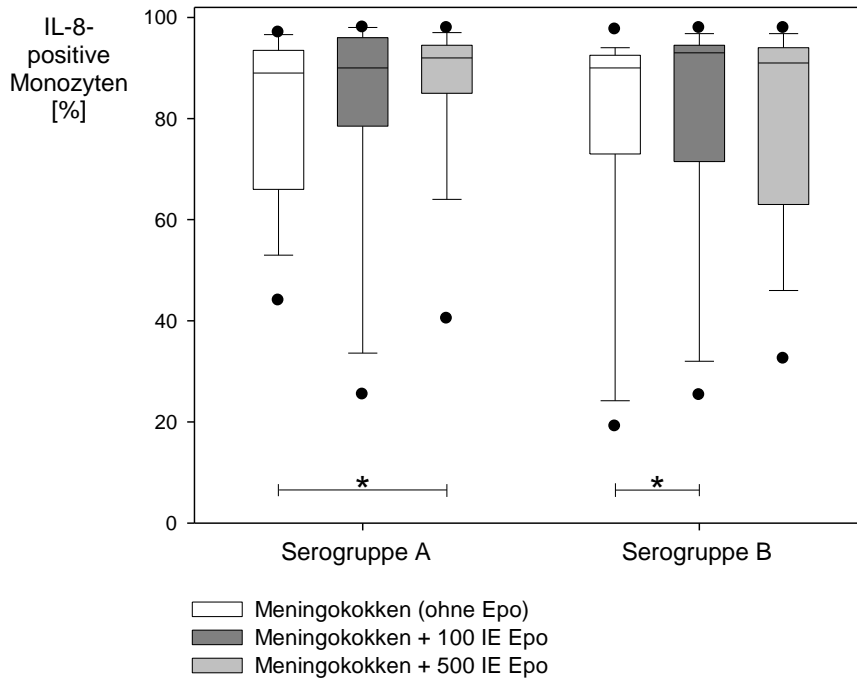


Abb. 23 Einfluss von Epo auf die IL-8-Bildung bei Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken
Die IL-8-Produktion Erwachsener bleibt durch den Zusatz von Epo weitgehend unbeeinflusst. Es zeigt sich lediglich bei den Meningokokken der Serogruppe A unter Zusatz von 500 IE Epo und bei den Meningokokken der Serogruppe B unter Zusatz von 100 IE Epo eine geringfügige Erhöhung des Anteils IL-8-bildender Monozyten. Dargestellt sind jeweils die 5., 10., 25., 50., 75., 90. und 95. Perzentile. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind mit (*) gekennzeichnet.

6.3.3.3 TNF- α

Bei der Serogruppe A ist der Anteil TNF- α -produzierender Zellen nach Zusatz von 100 IE Epo etwas größer verglichen mit der bakteriellen Stimulation ohne Epo (27,7% (14,5-52,7%) versus 30,8% (10,5-59,3%); $p = 0,013$). 500 IE Epo bewirken keinen Unterschied zur TNF- α -Bildung ohne Epo. Nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe B bleiben 100 IE ohne relevanten Einfluss auf die TNF- α -Bildung der Erwachsenen. Die größere eingesetzte Menge Epo führt zu einer Verringerung der Zytokinexpression (32,0% (20,4-59,4%) versus 26,8% (11,6-33,1%); $p < 0,001$) (Abb. 24).

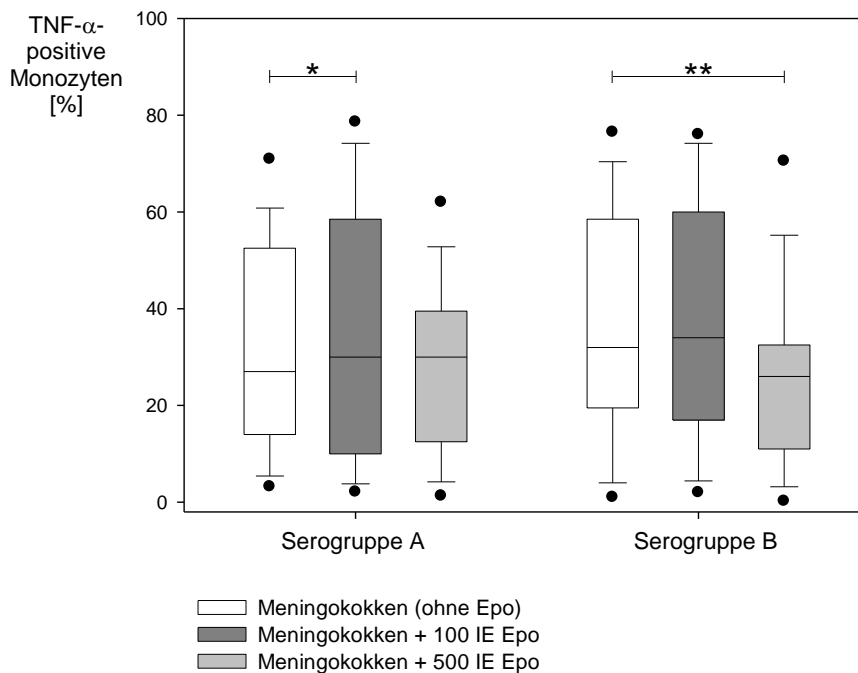


Abb. 24 Einfluss von Epo auf die TNF- α -Bildung bei Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken

Während die Erwachsenen bei der Serogruppe A unter Zugabe von 100 IE Epo eine leichte Erhöhung der TNF- α -Produktion zeigen, kommt es bei der Serogruppe B und Zusatz von 500 IE Epo zu einer deutlichen Reduktion der TNF- α -Bildung. Dargestellt sind die Ergebnisse in Form von Boxplots mit dem Median und dem Interquartilbereich als Box, mit bis zur 10. und 90. Perzentile reichenden Whiskers und mit der als Punkt beschriebenen 5. und 95. Perzentile. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**)

7 Diskussion

Invasive Erkrankungen durch Meningokokken gehen unverändert mit einer hohen Morbidität und Letalität einher. Am häufigsten erkranken Säuglinge und Kleinkinder, die innerhalb von Stunden versterben oder lebenslange Folgeschäden davontragen können. Der Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α spielt für die Pathophysiologie der IMD eine bedeutende Rolle. Ihre Konzentrationen korrelieren mit der Erkrankungsschwere (Kap. 1.2). Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist daher die quantitative Untersuchung dieser inflammatorischen Zytokinreaktion auf Meningokokken sowie deren mögliche Beeinflussung durch Epo in einem *ex vivo*-Sepsismodell. Vorteil eines *ex vivo*-Modells gegenüber der *in vivo*-Untersuchung von Zytokinen bei IMD-Erkrankten ist die Durchführung unter standardisierten Bedingungen, die eine bessere Vergleichbarkeit der Daten gewährleisten. Dagegen kommt es bei *in vivo*-Analysen unvermeidlich zu Unterschieden u.a. des Zeitpunktes der Probenentnahme nach Erkrankungsbeginn und der zugrundeliegenden Bakterienkonzentration. Darüber hinaus kann *in vivo* im Verlauf einer schweren Sepsis ein als Immunparalyse bezeichnetes Phänomen auftreten, bei dem die Zytokinbildung beeinträchtigt ist (Ertel et al. 1995, Astiz et al. 1996). Für das hier verwendete *ex vivo*-Sepsismodell wurde Vollblut gesunder Probanden verschiedener Altersgruppen verwendet. Besser als bei gereinigten Zellen ermöglicht die Untersuchung an Vollblut, sich der physiologischen Situation mit den wechselseitigen Beeinflussungen der Zellen und Zytokine anzunähern. Mittels Durchflusszytometrie lassen sich die Monozyten im Vollblut einzeln auf ihre intrazelluläre Zytokinbildung hin untersuchen (Maino und Picker 1998, Pala et al. 2000).

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der untersuchten Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α nach Stimulation mit Meningokokken im Vergleich zur Stimulation mit LPS und möglichen Ursachen für die Unterschiede der stimulatorischen Potenz (Kap. 7.1). Es folgt ein kurzer Blick auf den Vergleich der Zytokinbildung nach Stimulation mit zwei verschiedenen Meningokokkenstämmen (Kap. 7.2). In Kapitel 7.3 werden die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchung der altersabhängigen Unterschiede der Zytokinbildung nach LPS- bzw. Meningokokkenstimulation dargestellt sowie mögliche Ursachen und Folgen dieser Unterschiede besprochen. Das letzte Kapitel geht auf die Untersuchung des Einflusses von Epo auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken ein und diskutiert die Möglichkeit eines therapeutischen Einsatzes von Epo bei IMD (Kap. 7.4).

7.1 Untersuchung der Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken im Vergleich zur Stimulation mit LPS

LPS ist als wichtiger Bestandteil gramnegativer Bakterien bekannt, der sehr sensitiv vom Wirtsorganismus erkannt wird und dadurch die angeborene Immunabwehr des Wirts aktiviert. Zur angeborenen Immunabwehr gehören u.a. die Komplementaktivierung, Phagozytose, Aktivierung von Immunzellen und Bildung von Zytokinen. LPS ruft also u.a. durch die Induktion der Bildung proinflammatorischer Zytokine wichtige Schutzmechanismen des Organismus gegen „angreifende“ Bakterien hervor. Gleichzeitig gilt es aber auch als wichtigster Faktor in der Pathogenese gramnegativer Infektionen. Die durch LPS hervorgerufenen Mechanismen des natürlichen Schutzes kehren sich bei übermäßiger Aktivierung in schädliche Effekte gegen den Wirtsorganismus um (Cross und Opal 1995, Munford 2008, Mogensen 2009). LPS setzt sich aus Polysacchariden und einer Lipid A-Komponente zusammen. Das LPS verschiedener gramnegativer Bakterien variiert deutlich im Aufbau der Polysaccharidanteile. So fehlt beispielsweise den Meningokokken das sich wiederholende O-Antigen der enterischen Lipopolysaccharide, weshalb bei den Meningokokken häufig exakter von LOS (Lipooligosaccharide) statt von LPS die Rede ist (Plant et al. 2006, Munford 2008). Hier soll vereinfachend jedoch auch im Folgenden die Bezeichnung LPS verwendet werden.

Meningokokken tragen eine vom Wirtsorganismus besonders gut zu detektierende Form des LPS (Munford 2008). Die genaue Struktur des LPS ist bereits bei der Entscheidung von Bedeutung, ob eine Meningokokkenbesiedelung der Schleimhäute asymptomatisch bleibt oder zu einer invasiven Meningokokkenerkrankung führt. Veränderungen spezifischer LPS-Strukturen beeinflussen aber nicht nur die Adhäsions- bzw. Invasionsfähigkeit der Meningokokken an bzw. durch die Schleimhäute, sondern auch das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion nach Invasion der Bakterien (Plant et al. 2006, John et al. 2009). Eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der biologischen Aktivität des Meningokokken-LPS spielen das Lipid A und der LPS-spezifische 2-Keto-3-desoxyoctonat (KDO)-Anteil (Zughaier et al. 2004 und 2007, Zhang et al. 2008). Anders als zunächst angenommen (Kirsch et al. 1996, van Deuren et al. 2000) ist das LPS allerdings nicht der einzige Aktivator der angeborenen Immunabwehr gegen Meningokokken. Die Komplementaktivierung erfolgt LPS-unabhängig (Sprong et al. 2004a) und auch die Bildung proinflammatorischer Zytokine kann durch non-LPS-Bestandteile der Meningokokken angeregt werden. Welche non-LPS-Komponenten dabei im Einzelnen für die Zytokinsynthese ursächlich sind, ist bislang noch ungeklärt. Membrangebundene Faktoren, z.B. Proteine, Lipoproteine, Porine oder Phospholipide, werden ebenso als mögliche Verantwortliche angesehen wie auch die chromosomale DNA (Ingalls et al. 2001, Sprong et al. 2001). In bisherigen Studien zeigten sich non-LPS-Meningokokken im Vergleich zum Wildtyp als schwächeres, aber dennoch potentes Stimulans der Bildung

von IL-6 (Uronen et al. 2000), IL-8 (Sprong et al. 2004a) und TNF- α (Ingalls et al. 2001, Pridmore et al. 2001, Sprong et al. 2001 und 2004a, Uronen et al. 2000). Bei hohen Bakterienkonzentrationen fanden Uronen et al. (2000) für Wildtyp- und non-LPS-Meningokokken sogar ein äquivalentes Stimulationspotential für die IL-6 und TNF- α -Bildung. Es stellt sich daher die Frage, welche Rolle die non-LPS-Anteile in der Pathogenese der IMD spielen. LPS ist zweifellos ein potentes Stimulans der Zytokinsynthese und damit ein entscheidender pathogenetischer Faktor bei IMD. Einerseits wäre es denkbar, dass die inflammationsstimulatorische Potenz der non-LPS-Anteile im Vergleich zum LPS vernachlässigbar klein ist und bei intakten, LPS-beinhaltenen Keimen nicht zum Tragen kommt. Andererseits wäre es ebenso möglich, dass LPS und non-LPS-Anteile synergistisch zusammenwirken. Während Ingalls et al. (2001) keine eindeutigen synergistischen Effekte von LPS und den LPS-freien Membranbestandteilen bei der TNF- α -Bildung fanden, beschreiben Sprong et al. (2001) bei Konzentrationen ab 10^7 Bakterien/ml eine stärkere TNF- α -Bildung durch intakte, ganze Bakterien als durch äquivalente Mengen von isoliertem, reinem LPS und einen additiven Effekt der LPS- und non-LPS-induzierten TNF- α -Synthese. Uronen et al. (2000) fanden ebenfalls ab einer Konzentration von 10^7 Bakterien/ml eine relevante LPS-unabhängige TNF- α -Synthese und bei 10^8 Bakterien/ml äquivalente TNF- α - und IL-6-Mengen durch non-LPS-Meningokokken und den Wildtyp. Sie vermuten synergistische Effekte von LPS und non-LPS-Bestandteilen als Ursache für ihre Beobachtung, dass Wildtyp-Meningokokken häufig höhere TNF- α -Spiegel verursachen als hohe LPS-Konzentrationen. Bei einer Keimkonzentrationen von 10^6 /ml zeigte sich weder bei Sprong et al. (2001) noch bei Uronen et al. (2000) eine LPS-unabhängige Zytokinbildung. Eine vergleichbare Dosisabhängigkeit zeigte sich für die LPS-unabhängige TNF- α -Bildung bei Pridmore et al. (2001). Møller et al. (2005) schlossen aus den von ihnen gemessenen vernachlässigbar niedrigen IL-8-Konzentrationen nach Stimulation mit non-LPS-Meningokokken, dass LPS die Hauptrolle als IL-8-Induktor bei Meningokokken-erkrankungen spiele. Bei der Einordnung ihrer Ergebnisse muss allerdings beachtet werden, dass in den Versuchen eine bakterielle Konzentration von 10^6 /ml eingesetzt wurde. Sie lag damit unter derjenigen, die in anderen Untersuchungen als notwendig für die LPS-unabhängige Zytokinbildung beobachtet wurde. Die Bakterienlast ist bei Meningokokken-erkrankungen umso höher, je schwerer die Erkrankung ausfällt. Bei IMD finden sich Konzentrationen von etwa 10^4 bis 10^7 Bakterien/ml, bei schweren Verläufen bis 10^8 Bakterien/ml (Hackett et al. 2002, Øvstebø et al. 2004). Unter der Annahme, dass sich die beschriebenen *ex vivo*-Untersuchungsergebnisse auf die Situation *in vivo* übertragen lassen, werden also teilweise Meningokokkenkonzentrationen erreicht, bei denen eine LPS-unabhängige Zytokinstimulation von Relevanz sein könnte.

LPS wurde für die vorliegende Studie in einer Konzentration von 30 ng/ml verwendet. Etwa 7×10^5 bis 1×10^6 Meningokokken enthalten 1 ng LPS (Uronen et al. 2000, Sprong et al. 2001), so dass 30 ng Meningokokken-LPS/ml einer Bakterienkonzentration von etwa 2 bis 3×10^7 /ml entsprechen.

Für die vorliegende Arbeit wurde jedoch *E.coli*-LPS verwendet, das sich in seinem Molekulargewicht vom Meningokokken-LPS unterscheidet. Schätzungen des LPS-Gehalts von *E.coli* gehen von etwa 1 ng LPS in 10^5 Bakterien aus (Sprong et al. 2001). Die für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gewählte LPS-Konzentration entspricht daher einer hohen bakteriellen Konzentration um $> 10^6$ bis 10^7 /ml, wie sie auch bei Meningokokkenerkrankungen zu finden ist.

Die in Kapitel 6 vorgestellten Untersuchungsergebnisse zeigten Unterschiede in der Zytokinbildung nach der Stimulation mit LPS im Vergleich zu der Stimulation mit Meningokokken. Diese Unterschiede stellten sich in den verschiedenen Altersgruppen allerdings nicht einheitlich dar. Während die IL-6-Bildung sowohl bei den Kindern als auch bei den Erwachsenen nach reiner LPS-Stimulation eindeutig höher ausfiel als nach Stimulation mit Meningokokken, lag ein solches Muster bei den Neugeborenen allenfalls angedeutet vor (Kap. 6.1.1, Abb. 3). Bei Betrachtung der TNF- α -Bildung zeigte sich dagegen bei den Erwachsenen kein Unterschied der TNF- α -stimulierenden Potenz zwischen LPS und Meningokokken. Bei den Neugeborenen und Kindern führten Meningokokken und insbesondere Meningokokken der Serogruppe A zu einer deutlich stärkeren TNF- α -Bildung als reines LPS (Kap. 6.1.3, Abb. 5). Dieses stellte sich besonders eindrücklich bei den Kindern dar (Kap. 6.1.3, Abb. 6). Die berücksichtigte Altersspanne der untersuchten Kinder schließt unmittelbar an das Neugeborenenalter an und umfasst die ersten drei Lebensjahre, in denen wichtige Schritte in der Entwicklung des Immunsystems stattfinden. Vor diesem Hintergrund erfolgte für eine genauere Betrachtung die weitere Unterteilung der Gruppe der Kinder in Säuglinge und Kleinkinder. Hierbei wurde erkennbar, dass sich die beschriebenen Unterschiede bei den Kleinkindern erheblich ausgeprägter darstellten als bei den Säuglingen (Kap. 6.1.3, Abb. 7). Die IL-8-Bildung zeigte keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulanzien (Kap. 6.1.2).

Die starke IL-6-Bildung bei Kindern und Erwachsenen nach LPS-Stimulation passt zu der Annahme, dass LPS zu einer maximalen inflammatorischen Reaktion mit entsprechend ausgeprägter Zytokinbildung führt (Strunk et al. 2008). Auffällig ist dagegen die ausgeprägtere TNF- α -Bildung nach Stimulation mit Meningokokken im Vergleich zur Stimulation mit LPS bei Neugeborenen und Kindern. Es wurde bereits dargestellt, dass bei entsprechender Konzentration der Meningokokken eine LPS-unabhängige Zytokininduktion beobachtbar ist. In der vorliegenden Arbeit wurde eine hohe Konzentration von $1,2 \times 10^8$ Meningokokken/ml zur Stimulation der Zytokinbildung eingesetzt. Sie lag somit in einem Bereich, in dem neben dem LPS eine synergistische non-LPS-Komponente als Auslöser der inflammatorischen Antwort von Bedeutung sein könnte. Diese stellt eine potentielle Ursache für den stärkeren TNF- α -Anstieg durch Meningokokken als durch LPS dar. Es ist aber zu berücksichtigen, dass es sich um Untersuchungsergebnisse zum einen nach Stimulation mit Meningokokken und zum anderen nach Stimulation mit reinem

LPS von *E.coli*, nicht von Meningokokken, handelte. Möglicherweise war der stärkere TNF- α -Anstieg durch Meningokokken also auch Ausdruck einer unterschiedlich ausgeprägten stimulatorischen Potenz zwischen dem LPS der Meningokokken und dem der *E.coli*-Bakterien. In diesem Fall würde eine Messung nach Stimulation mit reinem Meningokokken-LPS und *E.coli*-LPS ein vergleichbares Ergebnis liefern wie in den hier durchgeführten Untersuchungen. Laut Munford (2008) rufen das Lipid A von Meningokokken und von *E.coli* eine inflammatorische Antwort mit vergleichbarer Potenz hervor. Zhang et al. (2008) beobachteten dagegen an murinen Zellen eine stärkere Induktion der TNF- α -Synthese durch Lipid A von Meningokokken als von *E.coli*. Allerdings haben sich für verschiedene gramnegative Bakterien Unterschiede in der LPS-Erkennung zwischen menschlichen und murinen Zellen gezeigt, so dass sich tierexperimentell erworbene Erkenntnisse nur bedingt auf die Situation beim Menschen übertragen lassen (Munford 2008). Auch können Ergebnisse für das Lipid A ohne Berücksichtigung des KDO-Anteils nur bedingt auf die immunstimulatorische Potenz des gesamten LPS ausgeweitet werden (Zughaier et al. 2004 und 2007, Zhang et al. 2008). LPS von Meningokokken ist beim Menschen in sehr niedrigen äquimolaren Konzentrationen bis 1 pmol/ml ein potenterer TNF- α -Induktor als *E.coli*-LPS (Sprong et al. 2004b). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden jedoch mit hohen LPS-Konzentrationen durchgeführt. Zusätzlich ist zu beachten, dass das Untersuchungsmaterial der genannten Autoren von Erwachsenen stammte, während die starke TNF- α -Expression hier bei den Neugeborenen und Kleinkindern auftrat. Sowohl eine zusätzliche LPS-unabhängige Zytokinbildung durch Meningokokken als auch eine höhere TNF- α -stimulatorische Potenz des in Meningokokken enthaltenen LPS bleiben als Ursache der beobachteten Unterschiede der TNF- α -Bildung denkbar.

Für einen aussagekräftigeren Vergleich der stimulatorischen Potenz von LPS und Meningokokken müsste die Untersuchung mit vom verwendeten Meningokokkenklon isoliertem LPS durchgeführt werden. Eine solche Untersuchung würde auch indirekte Aussagen über mögliche synergistische Effekte von LPS und non-LPS-Komponenten zulassen. Die Verwendung eines beliebigen anderen Meningokokken-LPS ist weniger geeignet, da das LPS verschiedener Meningokokkenstämme ebenfalls eine unterschiedliche zytokinstimulatorische Potenz aufweisen kann (Prins et al. 1998). Für einen Vergleich der stimulatorischen Potenz von Meningokokken und *E.coli* wäre der Einsatz hitzeinaktivierter *E.coli* anstelle von *E.coli*-LPS erforderlich. Zusammenfassend ist zu sagen, dass der in der vorliegenden Studie durchgeführte Vergleich zwischen *E.coli*-LPS und Meningokokken eindeutige Unterschiede im Ausmaß der Zytokinbildung zeigt und sich dabei das Reaktionsmuster für die einzelnen Zytokine altersabhängig unterscheidet, es sich aber keine sicheren Aussagen über die Ursachen machen lassen.

7.2 Untersuchung der Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A im Vergleich zur Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe B

Für die vergleichende Untersuchung möglicher Unterschiede der zytokinstimulatorischen Potenz zweier Meningokokkenstämme verschiedener Serogruppen wurden Meningokokken der Serogruppen A und B verwendet. Bei beiden gewählten Stämmen handelte es sich um Isolate von an Meningitis erkrankten Patienten. Die Serogruppen A und B sind von besonderer Relevanz, da es sich bei ihnen um die häufigsten IMD-Erreger weltweit (Serogruppe A) bzw. in Deutschland und Europa (Serogruppe B) handelt (Kap. 1.1.1). Ein besonderes Problem im Hinblick auf die Serogruppe B stellt zudem das Fehlen einer allgemein anwendbaren Impfung dar (Kap. 1.1.4).

Keiner der untersuchten Meningokokkenstämme führte zu einer generell stärkeren Zytokinbildung als der andere. Bei den Kindern fiel jedoch eine signifikant höhere Bildung der drei untersuchten Zytokine nach Stimulation mit A-Meningokokken gegenüber der Stimulation mit B-Meningokokken auf. Die Erwachsenen zeigten annähernd umgekehrte Verhältnisse mit einer höheren IL-6- und TNF- α -Bildung durch Meningokokken der Serogruppe B als durch Meningokokken der Serogruppe A (Kap. 6.1). Derartige Unterschiede der Zytokinbildung könnten auf eine differierende Reagibilität der verschiedenen Altersgruppen auf bestimmte Serogruppen hinweisen. Allerdings waren die hier aufgetretenen Unterschiede nicht sehr ausgeprägt. Zudem lässt sich von jeweils nur einem betrachteten Meningokokkenstamm zweier verschiedener Serogruppen nicht zwangsläufig auf eine unterschiedliche zytokinstimulierende Potenz ganzer Serogruppen schließen. Dennoch wäre an dieser Stelle ein Abgleich der hier gewonnenen Daten mit dem klinischen Verlauf beider Serogruppen von Interesse, da Schwere und Letalität invasiver Meningokokken-erkrankungen mit der Konzentration der untersuchten proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α korrelieren (Kap. 1.2.3). Geht eine Serogruppe also mit einer stärkeren Zytokinbildung einher als eine andere, so wäre gleichzeitig auch ein schwereres Krankheitsbild zu erwarten. Die Ergebnisse dieser Arbeit würden demnach vermuten lassen, dass der Stamm der Serogruppe A im Kindesalter zu einem schwereren klinischen Bild der IMD führt als im Erwachsenenalter bzw. umgekehrt bei der Serogruppe B. Miteinander vergleichbare Datensätze zum klinischen Verlauf der IMD durch die Serogruppen A und B sind aufgrund der weltweit unterschiedlichen Verteilung jedoch schwierig zu erheben. In unseren Breiten treten Erkrankungen durch die Serogruppe A selten auf, so dass hier keine zuverlässigen Aussagen zur Letalität vorliegen (Kaplan et al. 2006, RKI 2009a). Ein Vergleich der hiesigen Letalitätsdaten der Serogruppe B mit den Letalitätsdaten der Serogruppe A beispielsweise aus dem afrikanischen Meningitisgürtel ist ebenfalls ungeeignet, da eine erhebliche Beeinflussung der Daten durch die Unterschiede in der medizinischen Versorgung zu vermuten ist. Unter identischen Bedingungen erhobene und damit für einen Vergleich geeignetere Daten liegen insbesondere für die Serogruppen B und C vor. Während

Kaplan et al. (2006) keine Assoziation von Serogruppe und Letalität feststellen konnten, beobachtete das Robert Koch-Institut (RKI 2009a) über mehrere Jahre hinweg eine etwas höhere Letalität bei der Serogruppe C. Auch Levy et al. (2010) fanden in Frankreich eine signifikant höhere Letalität bei Erkrankungen durch die Serogruppe C im Vergleich zur Serogruppe B. Vergleichende Untersuchungen der Zytokinbildung bei Stimulation mit Meningokokken der Serogruppen B und C würden folglich eine verstärkte Zytokinbildung durch die Serogruppe C vermuten lassen. Im Falle der Durchführung einer solchen Untersuchung sollte zur Vermeidung von Verzerrungen immer die Herkunft der verschiedenen Meningokokken berücksichtigt werden, so dass die verwendeten Stämme beispielsweise alle von invasiv Erkrankten oder alle von Trägern ohne ernsthafte Erkrankungszeichen stammen (Prins et al. 1998).

Der Vergleich der Zytokinbildung nach Stimulation mit Meningokokkenstämmen der Serogruppen A und B erbrachte keine relevanten Unterschiede. Obwohl es sich bei der Serogruppe A um die weltweit bedeutsamste Serogruppe handelt, wäre für eine bessere Vergleichbarkeit der erhobenen Daten der Zytokinbildung mit dem klinischen Verlauf die Verwendung von Meningokokken der Serogruppen B und C sinnvoll.

7.3 Untersuchung der Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit LPS bzw. Meningokokken in Abhängigkeit vom Alter

In Kapitel 7.1 und 7.2 wurde beim Vergleich der Zytokinantwort auf Meningokokken und LPS bereits ersichtlich, dass sich das Reaktionsmuster in den verschiedenen Altersgruppen z.T. deutlich voneinander unterscheidet. Eine ausführliche Beschäftigung mit diesen altersabhängigen Unterschieden erfolgt in den nun folgenden Abschnitten.

Das Immunsystem des menschlichen Organismus muss in den ersten Lebenstagen mit den Herausforderungen einer vollständig neuen Umgebung mit zahllosen Fremdantigenen und mikrobiellen Pathogenen zurechtkommen. Säuglinge und Neugeborene und unter ihnen ganz besonders die Frühgeborenen sind u.a. wegen der noch unzureichend schützenden adaptiven Immunität in besonderem Maße durch Infektionen gefährdet. Doch auch das angeborene Immunsystem und die inflammatorischen Reaktionen des Neugeborenen unterscheiden sich erheblich von der Situation beim Erwachsenen. Die bestehenden Unterschiede wurden früher als generelle Unreife angesehen, die mit einer allgemein verminderten Zytokinbildungsfähigkeit einhergingen (Levy 2007, Philbin und Levy 2009). Dieses hat sich mittlerweile als falsch herausgestellt. Während bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen das antiinflammatorische IL-10 zwar vermindert gebildet wird

(Kotiranta-Ainamo et al. 2004, Schultz et al. 2004), fällt die Bildung proinflammatorischer Zytokine nicht generell schwächer, sondern teilweise sogar stärker aus als bei Erwachsenen (Schultz et al. 2002b, Kotiranta-Ainamo et al. 2004, Mohamed et al. 2007, Yerkovich et al. 2007). Die noch nicht ausgereifte Immunantwort manifestiert sich demnach offenbar weniger in einer verminderten Zytokinbildungsfähigkeit als vielmehr in einer mangelhaften Regulation der Zytokinbildung und einer damit einhergehenden übersteigerten proinflammatorischen Reaktion. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben ist aber gerade die exakte Regulation der inflammatorischen Antwort entscheidend bei der Gratwanderung zwischen einer adäquaten Abwehrreaktion und den für den Wirtsorganismus schädlichen bis hin zu tödlichen Auswirkungen. Zusätzlich zu dem noch unzureichenden adaptiven Immunschutz ist ein Zusammenhang zwischen der unausgereiften Regulation der angeborenen Immunantwort und der besonderen Anfälligkeit für schwere Infektionen bei Neugeborenen denkbar. Nach der Neugeborenenzeit durchläuft das Muster der Zytokinbildung gravierende, aber bislang im Einzelnen nur wenig bekannte Veränderungen. Im Säuglingsalter und in den ersten Lebensjahren fällt die Bildung einiger proinflammatorischer Zytokine nach LPS-Stimulation deutlich niedriger aus als bei Neugeborenen und nimmt bis zum Erwachsenenalter wieder zu (Härtel et al. 2005, Yerkovich et al. 2007). Das Ausmaß der Bildung der einzelnen Zytokine ist jedoch nicht nur vom Entwicklungsstand des Immunsystems abhängig, sondern unterscheidet sich auch je nach Art des Pathogens. Verschiedene Bakterien führen zu verschiedenen Mustern der Zytokinbildung (Mohamed et al. 2007, Tatad et al. 2008).

Für die vorliegende Arbeit erfolgte die Untersuchung und der Vergleich der Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α nach Stimulation mit reinem LPS bzw. Meningokokken in verschiedenen Altersgruppen: (1) bei den besonders infektionsgefährdeten Neugeborenen, deren Immunsystem nach den sterilen intrauterinen Bedingungen postnatal plötzlich einer Umgebung voller Fremdantigene ausgesetzt ist, (2) bei Säuglingen und Kindern bis zu 3 Jahren, der am häufigsten von IMD betroffenen Altersgruppe und (3) bei Erwachsenen.

Während die IL-6-Bildung nach Stimulation mit LPS bei den Kindern stärker ausfiel als bei den Neugeborenen, unterschied sie sich bei den Erwachsenen nicht von den anderen Altersgruppen. Dagegen reagierten die Neugeborenen und Kinder nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A mit einem höheren Anteil IL-6-bildender Monozyten als Erwachsene (Kap. 6.2.1, Abb. 8). Die detailliertere Betrachtung des Kinderkollektivs zeigte eine im Vergleich zu den Erwachsenen signifikant stärkere IL-6-Bildung bei den Säuglingen, nicht aber bei den Kleinkindern (Kap. 6.2.1, Abb. 9). Auffallendes Merkmal bei der Betrachtung der IL-8-Bildung war der generell hohe Anteil IL-8-positiver Monozyten nach Stimulation. In allen Altersgruppen fanden sich einzelne Probanden, bei denen er annähernd 100% erreichte. Die Neugeborenen zeigten eine große interindividuelle Variabilität mit einer breiten Streuung der Ergebnisse. Insgesamt zeigte sich die

stärkste IL-8-Bildung bei den Erwachsenen und nicht wie beim IL-6 und v.a. beim TNF- α bei den Kindern. Besonders markant stellte sich der Unterschied zwischen den Erwachsenen und den anderen Altersgruppen nach Stimulation mit LPS dar (Kap. 6.2.2, Abb. 10), wobei er von den Neugeborenen über die Säuglinge zu den Kleinkindern hin zunahm (Kap. 6.2.2, Abb. 11). Nach Stimulation mit Meningokokken relativierten sich die beschriebenen Unterschiede zwischen den Erwachsenen und den Neugeborenen bzw. Kindern, wenngleich ein vergleichbares Muster weiterhin erkennbar blieb (Kap. 6.2.2, Abb. 10). Dagegen stellten sich die altersabhängigen Unterschiede der TNF- α -Produktion nach Stimulation mit Meningokokken besonders deutlich dar. Beide Serogruppen riefen bei den Kindern eine sehr ausgeprägte TNF- α -Bildung im Vergleich zu den Neugeborenen und besonders im Vergleich zu den Erwachsenen hervor. Auch nach Stimulation mit LPS fand sich zwar der höchste Anteil TNF- α -positiver Monozyten bei den Kindern, doch gerade der bei den Meningokokken so ausgeprägte Unterschied zu den Erwachsenen zeigte sich hier nicht (Kap. 6.2.3, Abb. 12).

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse fällt auf, dass die am häufigsten von IMD betroffene Altersgruppe der Säuglinge und Kleinkinder mit einer stärkeren Zytokinbildung auf Meningokokken reagierte als die der Erwachsenen. Die stärkere IL-6- und v.a. TNF- α -Produktion der Kinder könnte Ausdruck einer generell höheren Zytokinbildung in dieser Altersgruppe sein. In diesem Fall wäre aber auch nach Stimulation mit reinem LPS bei den Kindern ein entsprechend höherer Anteil IL-6- und TNF- α -positiver Monozyten als bei den Erwachsenen zu erwarten, unabhängig davon, ob es sich um Meningokokken-LPS oder, wie in der vorliegenden Untersuchung, um *E.coli*-LPS handelt. Ein derartiger Unterschied zwischen Kindern und Erwachsenen war nach LPS-Stimulation jedoch nicht beobachtbar. Auch Yerkovich et al. (2007) fanden bei Einjährigen nach LPS/IFN γ -Stimulation vielmehr eine niedrigere proinflammatorische IL-6- und TNF- α -Bildung als bei Erwachsenen. Die in der vorliegenden Arbeit zu beobachtende markante Zytokinantwort der Kinder stellt daher möglicherweise eine für Meningokokken spezifische Besonderheit dar. Eine Ursache hierfür könnte in der Verteilung der TLR-Rezeptoren liegen. Verschiedene Bakterien aktivieren die Bildung proinflammatorischer Zytokine über verschiedene TLR-Muster. Im Falle der Meningokokken sind es die Rezeptoren TLR4, TLR2 und TLR9, über die die inflammatorische Antwort des Wirts durch Bakterienanteile aktiviert wird (Mogensen et al. 2006). Doch auch die TLR-Expression durchläuft vermutlich vor allem in den ersten Lebensjahren, aber auch noch im späten Erwachsenenalter, altersabhängige Veränderungen (van Duin und Shaw 2007, Yerkovich et al. 2007). Yerkovich et al. (2007) fanden bei einjährigen Kindern eine niedrigere TLR4-Expression auf CD14-positiven Zellen nach LPS/IFN γ -Stimulation als bei Erwachsenen. TLR4 ist bekannt als entscheidender Rezeptor für die durch LPS induzierte proinflammatorische Zytokinsynthese. Eine reduzierte TLR4-Expression bei einjährigen Kindern würde folglich nach LPS-Stimulation auch eine im Vergleich zu Erwachsenen verminderte Zytokinbildung erwarten

lassen, so wie es auch von Yerkovich et al. (2007) gezeigt wurde. Die einjährigen Kinder entfallen in der vorliegenden Arbeit auf die Gruppe der Kinder mit einer deutlich breiteren Altersspanne von 1 bis 36 Monaten. In dieser weiter gefassten Altersgruppe fiel die TNF- α -Bildung nach LPS-Stimulation im Kindesalter ähnlich aus wie bei den Erwachsenen. Ganz anders stellte sich die Situation dagegen bei den Meningokokken dar. Der Anteil der TNF- α bildenden Monozyten lag nach Stimulation mit Meningokokken bei den Kindern deutlich höher als bei den Erwachsenen. Unter der früher vorherrschenden Annahme, dass Meningokokken die inflammatorische Reaktion des Wirtsorganismus nur über LPS und seinen Rezeptor TLR4 hervorrufen würden, stünde diese höhere TNF- α -Bildung im Widerspruch zur verminderten TLR4-Expression bei Kindern. Mit der Entdeckung einer zusätzlichen, LPS-unabhängigen Aktivierung der inflammatorischen Antwort durch Meningokokken hebt sich dieser Widerspruch auf. Wenn Kinder eine verminderte TLR4-Expression haben, aber gleichzeitig auf Stimulation mit Meningokokken mit einer deutlich stärkeren TNF- α -Bildung reagierten als nach Stimulation mit LPS (Kap. 6.1.3) und als Erwachsene nach Stimulation mit Meningokokken (Kap. 6.2.3), so lässt sich spekulieren, dass die non-LPS-Anteile der Meningokokken für die immunologische Antwort im Kindesalter von besonderer Bedeutung sein könnten. Ob die hierfür benötigten Rezeptoren TLR2 und TLR9 im Kindesalter verglichen mit dem Erwachsenenalter möglicherweise verstärkt exprimiert werden, ist nicht bekannt. Van Duin et al. (2007) beobachteten allerdings bei über 65-Jährigen im Vergleich zu jungen Erwachsenen einen funktionellen Defekt der TLR1/2-Funktion mit einer verminderten TNF- α - und IL-6-Bildung, wohingegen die TLR4-Funktion in den beiden Altersgruppen keinen Unterschied aufwies. Möglicherweise wird also die inflammatorische Reaktion auf Meningokokken mit zunehmendem Alter vorwiegend über LPS/TLR4 vermittelt, während in jungen Jahren die über TLR2 (und TLR9) übermittelten Signale der non-LPS-Komponenten noch einen bedeutenderen Anteil beitragen. Dieses könnte mit erklären, wieso sich in den hier durchgeführten Untersuchungen das Ausmaß der TNF- α -Bildung bei Erwachsenen nach Stimulation mit LPS und Meningokokken glich, während es sich bei den Kindern nach Stimulation mit Meningokokken so viel ausgeprägter darstellte als nach Stimulation mit LPS (Kap. 6.1.3). Beim IL-8 hingegen zeigten sich in keiner der Altersgruppen gravierende Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulanzen (Kap. 6.1.2). Die Erwachsenen präsentierten sich durchgehend als Altersgruppe mit dem höchsten Anteil IL-8-positiver Monozyten. Eine derartige Altersverteilung könnte die Folge einer möglicherweise vorrangig LPS- und TLR-4-vermittelten IL-8-Synthese sein.

Es ist sicherlich ein Zusammenspiel vieler Faktoren, welches darüber entscheidet, ob und wie schwer eine mit Meningokokken kolonisierte Person bzw. eine Person nach Kontakt zu einem IMD-Patienten tatsächlich erkrankt. Neben Eigenschaften des Bakteriums selbst spielen hierbei individuelle Merkmale im Immunsystem des Wirts eine Rolle (Kvalsvig und Unsworth 2003). Dazu gehören z.B. bestimmte genetische Polymorphismen des angeborenen Immunsystems

einschließlich der TL-Rezeptoren, die mit einer erhöhten IMD-Anfälligkeit und Letalität einhergehen (Smirnova et al. 2003, Brouwer et al. 2009 und 2010). Neben Komplementdefekten als bekanntem Risikofaktor für IMD werden auch eine geschädigte Mukosabariere und eine generalisierte Immundefizienz als IMD-begünstigende Faktoren vermutet. Der Großteil der IMD trifft dennoch vor allem Säuglinge und Kinder ohne bekannte zugrundeliegende Störungen des Komplementsystems oder sonstige Vorerkrankungen. Die erhöhte IMD-Anfälligkeit im frühen Kindesalter wird u.a. mit dem Abfall des mütterlichen Nestschutzes und damit der adaptiven Immunität in Verbindung gebracht (Kvalsvig und Unsworth 2003). Oben wurde bereits dargestellt, dass ein Zusammenhang zwischen der allgemeinen Infektionsanfälligkeit Neugeborener und der mangelhaften Regulation der Zytokinbildung möglich ist. Entsprechend ist auch ein ursächlicher Zusammenhang der hohen Inzidenz invasiver Meningokokkenerkrankungen in den ersten Lebensjahren mit der hier *ex vivo* beobachteten besonderen inflammatorischen Reagibilität des kindlichen Bluts auf Meningokokken denkbar. Die im Vergleich zu Erwachsenen übersteigerte proinflammatorische Reaktion der Kinder, möglicherweise durch ein für das Alter spezifisches TLR-Muster bedingt, könnte dabei zu dem bedrohlichen Übergang von gesunder Abwehr zu schwerer Erkrankung beitragen.

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden Kinder im Alter von ein bis 36 Monaten zu einer Gruppe zusammengefasst. Unter der Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen der IMD-Inzidenz und einer besonders ausgeprägten Bildung proinflammatorischer Zytokine besteht, erfolgte eine weitere Unterteilung in Säuglinge und Kleinkinder. IMD zeigen die höchste Inzidenz im Säuglingsalter (Kap. 1.1.1). Demzufolge wäre in diesem Alter eine noch stärkere TNF- α - und IL-6-Bildung zu erwarten als bei den Kleinkindern. Derartige relevante Unterschiede waren aber für keines der Zytokine zwischen Säuglingen und Kleinkindern nachweisbar. Lediglich nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A zeigten die Säuglinge eine nicht-signifikant höhere IL-6-Bildung als Kleinkinder (Kap. 6.2.1, Abb. 9). Ebenso ergaben sich in der vorliegenden Arbeit keine bedeutenden Korrelationen zwischen Kindesalter und Zytokinsynthese (Kap. 6.2.4). Einschränkend muss hierbei angemerkt werden, dass die Unterteilung der Kinder in Säuglinge und Kleinkinder zu einer die Aussagekraft mindernden Verkleinerung der Fallzahlen der Subgruppen führte. Eventuell bestehende geringe Unterschiede wurden möglicherweise aufgrund einer zu kleinen Fallzahl nicht dargestellt. Vergleichbares gilt für eine potentielle Korrelation zwischen Kindesalter und Zytokinsynthese.

Als bemerkenswertestes Ergebnis dieses Teils der durchgeführten Studie ist die im Vergleich zu den Erwachsenen übersteigerte TNF- α -Bildung der hauptsächlich von IMD betroffenen Altersgruppe der Säuglinge und Kleinkinder nach Stimulation mit Meningokokken hervorzuheben, die sich entsprechend auch für das IL-6 nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A

darstellte. Ein Überblick über die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieser Zytokine findet sich in Kapitel 1.2. Im Hinblick auf die mögliche Bedeutung der besonders ausgeprägten TNF- α - und IL-6-Bildung im Kindesalter nach Stimulation mit Meningokokken sollen an dieser Stelle zwei gravierende Aspekte der IMD herausgehoben werden, die auf eben diese Zytokine zurückgeführt werden: der septische Schock und kardiale Funktionsstörungen im Rahmen der Meningokokkensepsis. Erkrankungen durch Meningokokken verlaufen in der Regel als Meningitis, Sepsis oder als Mischform aus beidem (Rosenstein et al. 2001, RKI 2010). Als IMD-Form mit der höchsten Letalität sind die Sepsis und ganz besonders das fulminant verlaufende Waterhouse-Friderichsen-Syndrom gefürchtet (RKI 2009a). Dabei kommt dem als Hauptvermittler des septischen Schocks geltenden TNF- α unter den Zytokinen eine herausragende Bedeutung zu (Kap. 1.2.2). Ein großer Teil der schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen der Meningokokkensepsis sowie der septische Schock lassen sich auf kardiovaskuläre Störungen und eine pathologische intravaskuläre Gerinnung zurückführen (Pathan et al. 2003). Kardiale Funktionsstörungen stellen eine bedeutende Komponente und häufige Todesursache des septischen Schocks insbesondere auch bei der Sepsis durch Meningokokken dar (Boucek et al. 1984, Monsalve et al. 1984, Mercier et al. 1988, Krishnagopalan et al. 2002, Makwana und Baines 2005). Das Versagen der Herzfunktion ist hierbei teilweise als sekundärer Effekt bei Hypovolämie aufgrund eines Kapillarlecks zu sehen (Pathan et al. 2003). Seit längerem wird aber auch eine direkte negativ inotrope Wirkung verschiedener proinflammatorischer Zytokine diskutiert (Krishnagopalan et al. 2002, Hunter und Doddi 2010). Vor wenigen Jahren konnte das IL-6 als wichtiger verantwortlicher Mediator der myokardialen Dysfunktion bei IMD identifiziert werden (Pathan et al. 2002 und 2004). Die Beispiele des septischen Schocks und der kardialen Funktionsstörungen verdeutlichen die außerordentliche Rolle der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α für den Krankheitsverlauf der IMD. Die bei Kindern beobachtete übersteigerte Synthese dieser Zytokine könnte folglich neben dem oben beschriebenen möglichen Zusammenhang mit der Erkrankungsanfälligkeit auch negative Folgen für den Verlauf einer Erkrankung haben.

Das zunehmende Wissen der vergangenen zwei Jahrzehnte um die Bedeutung der Zytokine legt die Hoffnung nahe, den Krankheitsverlauf der Sepsis durch eine Hemmung der Zytokinsynthese positiv beeinflussen zu können. Während Versuche bei Tieren erfolversprechend ausfielen (Tracey et al. 1987, Nassif et al. 1992), erbrachten adjuvante Therapieveruche der Sepsis beim Menschen z.B. mit einer gezielten TNF- α -Blockade (Grau und Maennel 1997, Kox et al. 2000) oder mit anti-LPS-Antikörpern bislang enttäuschende Ergebnisse (Opal und Glück 2003; Kap. 1.1.3). Eine mögliche Ursache für die fehlenden Erfolge mag in einem zu späten Zeitpunkt des Therapiebeginns liegen. Darüber hinaus ist das TNF- α zwar ein Zytokin von immenser Bedeutung bei der Sepsis, aber dennoch nicht das einzige, das zu gravierenden Schädigungen des

Organismus führen kann. Eine gezielte Blockade des TNF- α greift daher möglicherweise zu kurz, weil es das restliche Netzwerk der Zytokine unbeeinflusst lässt. Anti-LPS-Antikörper hemmen dagegen die Synthese eines breiteren Spektrums von Zytokinen. Wie bereits dargelegt sind aber u.a. Meningokokken zu einer LPS-unabhängigen Zytokinstimulation in der Lage. *Ex vivo*-Experimente zeigen bei hohen Meningokokkenkonzentrationen einen relevanten Beitrag der non-LPS-Anteile an der Zytokinbildung (Kap. 7.1). Auf die Situation *in vivo* übertragen könnte dieses bedeuten, dass gerade bei den Schwerstkranken die LPS-unabhängige Zytokinbildung von Bedeutung ist, da die Bakterienlast mit der Erkrankungsschwere korreliert (Hackett et al. 2002). Eben diese bilden aber die Patientengruppe, für die dringend verbesserte Therapiemöglichkeiten benötigt werden und die als Patientstamm für viele der Therapiestudien mit anti-LPS-Antikörpern dienen (J5 Study Group 1992, Derkx et al. 1999, Levin et al. 2000), was ebenfalls eine Ursache für die bislang ausgebliebenen Erfolge darstellen könnte.

7.4 Untersuchung des Einflusses von Erythropoietin auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken

Der therapeutische Ansatz einer Beeinflussung der Zytokinkonzentration ist aufgrund der immensen pathophysiologischen Bedeutung der proinflammatorischen Zytokine für die IMD trotz der bisherigen Misserfolge vielversprechend. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit einer medikamentösen Beeinflussung der durch Meningokokken angeregten Synthese proinflammatorischer Zytokine mittels Epo untersucht.

Epo hemmt die Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit LPS (Kumral et al. 2007, Strunk et al. 2008) ebenso wie die Zytokinsynthese nach traumatischen und ischämischen Schädigungen des Gehirns (Villa et al. 2003, Gorio et al. 2005) und nach ischämischen Schädigungen des Herzens (Li et al. 2006). In der vorliegenden Studie wurde *ex vivo* die Hypothese untersucht, dass Epo die Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-6-, IL-8- und TNF- α nach Stimulation mit Meningokokken beeinflusst. Hierfür wurde mit Meningokokken versetztes Vollblut zunächst für eine Stunde mit Epo vorinkubiert. Epo wurde in zwei verschiedenen Dosierungen eingesetzt, um mögliche dosisabhängige Unterschiede darzustellen. Die höhere Dosierung (500 IE) bewirkte dabei in allen untersuchten Altersgruppen eine deutlich hemmende Wirkung auf die IL-6-Bildung (Kap. 6.3, Abb. 15, 18 und 22). Ähnlich wie die IL-6-Bildung verhielt sich auch die TNF- α -Bildung unter dem Einfluss von Epo. Mit Ausnahme der Erwachsenen bei Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A übte die höhere Dosis Epo in allen Versuchsgruppen einen hemmenden Effekt auf die TNF- α -Bildung aus, der sich in geringerem

Ausmaß bei den Kindern nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A auch bei der niedrigen Dosis Epo zeigte (Kap. 6.3, Abb. 16, 20 und 24). Anders als das IL-6 und TNF- α wurde das IL-8 durch Epo kaum beeinflusst. Eine leichte Reduktion der IL-8-Bildung durch Epo fand sich lediglich bei den Kindern nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A. Bei den Erwachsenen bewirkte Epo dagegen einen geringen Anstieg des Anteils der IL-8-bildenden Monozyten (Kap. 6.3, Abb. 19 und 23).

Epo zeigte im durchgeführten *ex vivo*-Versuch die Fähigkeit, die Bildung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken zu reduzieren. Die höhere der verwendeten Dosierungen (500 IE) führte in allen Altersgruppen zu einer eindeutigen Hemmung der IL-6- und TNF- α -Bildung. Epo bewirkte keine relevante Beeinflussung der IL-8-Synthese. Die proinflammatorischen Zytokine und unter ihnen insbesondere das IL-6 und TNF- α spielen eine wichtige krankheitsvermittelnde Rolle bei IMD (Kap. 1.2 und 7.3). Folglich könnte die Reduktion der Synthese dieser pathophysiologisch bedeutsamen und mit der Krankheitsschwere der IMD korrelierenden Zytokine durch Epo den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen. Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich daher mit einem potentiellen therapeutischen Einsatz von Epo bei Erkrankungen durch Meningokokken. Dabei wird zunächst kurz auf die neuroprotektiven und kardioprotektiven Eigenschaften von Epo und auf deren mögliche Bedeutung bei IMD eingegangen. Anschließend erfolgt ein Blick auf die bisherige Datenlage des experimentellen Einsatzes von Epo im Sepsismodell. Danach werden einzelne praktische Aspekte wie die Art der Verabreichung, die Dosierung und mögliche Nebenwirkungen und Wechselwirkungen mit Glukokortikoiden angesprochen.

Erst vor gut zehn Jahren wurde erkannt, dass die Aufgaben von Epo sich nicht auf die Hämatopoese beschränken. Nach Entdeckung von Epo und seinem Rezeptor (Epo-R) im Gehirn und Liquor (Liu. et al. 1994, Masuda et al. 1994, Juul et al. 1997) folgten zahlreiche experimentelle Belege für die neuroprotektiven Eigenschaften Epos (Kap. 1.3.1). Während sich der Großteil der bisherigen Forschung in diesem Bereich auf hypoxisch-ischämische oder traumatische Schädigungen konzentriert, gibt es über die Wirkung von Epo bei infektiösen Erkrankungen kaum Daten. Epo erfüllt durch seine antiinflammatorischen und neuroprotektiven Eigenschaften die theoretischen Voraussetzungen, sowohl den akuten Verlauf einer Meningokokkenerkrankung als auch neurologische Beeinträchtigungen nach IMD günstig beeinflussen zu können. Auf den vorangegangenen Seiten wurden insbesondere die Rolle der Zytokine und auf deren Hemmung abzielende Therapieversuche bei der Sepsis thematisiert. Ein weit häufigeres Erscheinungsbild der IMD als die Sepsis ist allerdings die Meningitis. Sie findet sich, isoliert oder als Mischform zusammen mit einer Sepsis auftretend, in fast drei Viertel aller invasiven Erkrankungsfälle durch

Meningokokken (Kaplan et al. 2006, RKI 2010). Überlebende einer Meningitis leiden häufig ihr Leben lang unter neurologischen Folgeschäden der Erkrankung (Kap. 1.1.2).

Bei der Meningitis treten die Meningokokken auf den Subarachnoidalraum konzentriert auf und verursachen intrakranial eine akute inflammatorische Reaktion (Brandtzaeg et al. 1992, Waage et al. 1993). Die Invasion von Bakterien in den Liquor wird vom angeborenen Immunsystem mit einer Aktivierung ansässiger immunkompetenter Zellen (z.B. Mikroglia), der Einwanderung von Leukozyten und der Bildung von Zytokinen beantwortet. Auch im ZNS sind es die TL-Rezeptoren, die der Erkennung von Bakterien dienen und darüber zur Bildung proinflammatorischer Zytokine führen (Gerber und Nau 2010, Koedel et al. 2010, Lehnardt 2010). Letztere erfolgt im ZNS u.a. durch Mikroglia, Astrozyten und eingewanderte mononukleäre Zellen (Wang und Shuaib 2002). Agonisten der an der immunologischen Erkennung von Meningokokken beteiligten Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR9 können im ZNS unter anderem über die Bildung proinflammatorischer Zytokine zu neuronalen Schädigungen und Zelltod durch Apoptose führen (Lehnardt et al. 2003, Iliiev et al. 2004, Hoffmann et al. 2007). Hua et al. (2007) zeigten, dass eine Ischämie-bedingte Aktivierung von TLR4 zu den neuronalen Schädigungen im Hippocampus beiträgt. Schädigungen der Hippocampusformation durch neuronale Apoptose sind auch eine charakteristische Folge bakterieller Meningitiden und können den hohen Anteil kognitiver Defizite bei Überlebenden mit erklären. Im Rahmen der Meningitis kann zudem ein Hirnödem mit Einklemmung und ausgedehnten nekrotischen Läsionen auftreten. Dieses stellt eine häufige Ursache tödlicher Verläufe bzw. bleibender, schwerer neurologischer Schädigungen der Meningitis dar. Für sekundäre hypoxisch-ischämische Schädigungen bei der bakteriellen Meningitis werden neben dem Hirnödem auch eine Vaskulitis und eine gestörte zerebrale Autoregulation verantwortlich gemacht (Nau und Brück 2002, Gerber und Nau 2010). Das Gehirn stellt damit ein höchst gefährdetes Organ bei der durch Meningokokken verursachten Meningitis dar, das daneben aber auch bei einer Sepsis ohne Meningitis geschädigt werden kann (Sharshar et al. 2005).

Epo hat sich bei verschiedenen Schädigungsformen als neuroprotektiv erwiesen (Kap. 1.3). Es wirkt antiinflammatorisch und führte in den hier durchgeführten Untersuchungen zu einer deutlichen Reduktion der durch Meningokokken induzierten proinflammatorischen Zytokinsynthese. Gemeinsam mit seinen antiapoptotischen und weiteren zum Gewebeschutz beitragenden Eigenschaften könnte Epo damit den oben beschriebenen Schädigungsmechanismen im ZNS bei der Meningitis entgegenwirken. Zusätzlich weisen die Ergebnisse von Gunnarson et al. (2009) auf eine Beteiligung an der Wasserhomöostase im Gehirn und eine Senkung des Risikos für ein Hirnödem durch Epo hin.

Nach Entdeckung der neuroprotektiven Effekte wurden 2003 erste Studien veröffentlicht, die auf schützende Effekte auf das Herz durch Epo hinwiesen (Cai et al. 2003, Calvillo et al. 2003, Moon et al. 2003, Parsa et al. 2003). In den darauf folgenden Jahren wurden die kardioprotektiven Eigenschaften in zahlreichen experimentellen Studien insbesondere an hypoxisch-ischämisch geschädigten Herzen bestätigt (Lipšic et al. 2006a, Riksen et al. 2008), in denen Epo unter anderem eine Reduktion der Infarktgröße bewirkte (Parsa et al. 2003, Tamarelle et al. 2009, Treguer et al. 2010). Nach den vielversprechenden experimentellen Ergebnissen erfolgte bereits die Umsetzung in erste klinische Studien, die sich auf den Einsatz Epos nach akuten Myokardinfarkten konzentrieren (Lipšic et al. 2006b, Ferrario et al. 2009, Liem et al. 2009, Ozawa et al. 2010, Suh et al. 2010). Als Mechanismen der Kardioprotektion werden die antiapoptotischen und antiinflammatorischen Eigenschaften von Epo sowie eine Modulation der Neovaskularisation und des Remodellings angesehen (Riksen et al. 2008). Die genannten Mechanismen machen eine kardioprotektive Wirkung von Epo auch im Rahmen anderer Krankheitsentitäten denkbar. Die bei IMD auftretenden myokardialen Funktionsstörungen sind mindestens in Teilen Folge der durch Meningokokken induzierten ausgeprägten proinflammatorischen Zytokinsynthese. Die besondere Rolle des IL-6 hierbei wurde in Kapitel 7.3 dargelegt. Die antiinflammatorische, in der vorliegenden Studie gezeigte hemmende Wirkung von Epo auf die durch Meningokokken induzierte IL-6-Synthese könnte somit zum Schutz des Herzens bei der Meningokokkensepsis beitragen.

In ersten tierexperimentellen Studien zur Wirkung von Epo bei Endotoxämie und im Sepsismodell bewirkte Epo schützende Effekte auf verschiedenste Organsysteme (Koroglu et al. 2006, Kao et al. 2007, Le Minh et al. 2007, Mitra et al. 2007, Aoshiba et al. 2009, Shang et al. 2009a). Aoshiba et al. (2009) beobachteten an Mäusen nach LPS-Injektion eine Reduktion der Mortalität durch Epo. Epo führt bei Mäusen im experimentellen Sepsismodell nach Zökalligatur und -punktion zu einer verlängerten Überlebensdauer sowie zu einer Verbesserung der muskulären Mikrozirkulation und des zellulären Energiestoffwechsels (Kao et al. 2007, Aoshiba et al. 2009). Auch diese positiven Effekte werden u.a. auf die antiapoptotische Wirkung und die Reduktion der Konzentration proinflammatorischer Zytokine zurückgeführt (Le Minh et al. 2007, Aoshiba et al. 2009, Shang et al. 2009b).

Gemeinsam mit der hier *ex vivo* gezeigten Reduktion der durch Meningokokken induzierten IL-6- und TNF- α -Bildung stimmen die bekannten neuroprotektiven und kardioprotektiven Eigenschaften hoffnungsvoll, mit Epo eine wirkungsvolle Substanz für die adjuvante IMD-Therapie zur Verfügung zu haben. Für die sinnvolle Anwendung und Zulassung eines Medikaments sind neben einer nachgewiesenen Wirksamkeit aber auch die Unbedenklichkeit (Sicherheit) und ein günstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis erforderlich (Arzneimittelgesetz, Stand 2009). Zugleich ist bei der Suche nach unterstützenden Therapeutika für die IMD zu berücksichtigen, dass das Haupterkrankungs-

alter in den ersten Lebensjahren liegt. Klinische Studien gerade in dieser Altersgruppe sind schwierig durchzuführen und unterliegen besonders strengen Richtlinien, so dass nur wenige Arzneimittel für das Kindesalter erprobt und zugelassen sind. Dieses hat zur Folge, dass die Anwendung von Medikamenten außerhalb ihrer häufig nur für das Erwachsenenalter zugelassenen Indikation Teil des pädiatrischen Alltags ist (Off-Label-Use) und dabei am häufigsten die Neugeborenen und Säuglinge betrifft (Lehmann et al. 2009, Lindell-Osuagwu et al. 2009, Mühlbauer et al. 2009). Im Hinblick auf die für die IMD-Therapie relevante Frage der sicheren Anwendbarkeit schon ab dem Säuglingsalter bietet Epo den großen Vorteil, dass es sich nicht um eine neue und unbekannte Substanz handelt. Vielmehr ist Epo bereits in allen Altersgruppen, bis hin zu den Neu- und Frühgeborenen, für die nebenwirkungsarme und sichere Behandlung von Anämien zugelassen (Kap. 1.3.2). Erste klinische Studien beschäftigten sich mit einer möglichen Erweiterung des therapeutischen Spektrums von Epo zur Verbesserung des neurologischen Outcomes bei hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie (Zhu et al. 2009, Elmahdy et al. 2010) und zur Prävention typischer Komplikationen der Frühgeburtlichkeit (Fauchère et al. 2008, Juul et al. 2008).

Die Verabreichung von Epo erfolgt in der Regel subkutan oder intravenös. Als Applikationsform bei IMD wäre die intravenöse Gabe vorzuziehen, um schnellstmöglich die maximale Verfügbarkeit im Blutkreislauf zu gewährleisten. Allerdings sind bei der Meningitis das ZNS und der Liquorraum als angestrebte Wirkorte durch die Blut-Hirn-Schranke vom Blutkreislauf getrennt. Soll systemisch verabreichtes Epo protektiv auf das zentrale Nervensystem einwirken, so muss es als Grundvoraussetzung die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Die ersten Studien, die die neuroprotektiven Effekte Epos untersuchten, verabreichten das Epo direkt intraventrikulär (Sadamoto et al. 1998, Sakanaka et al. 1998) und ließen die Frage der Überwindbarkeit der Blut-Hirn-Schranke damit zunächst offen. Zwei Jahre später wurde von Brines et al. (2000) erstmalig gezeigt, dass peripher verabreichtes Epo die Blut-Hirn-Schranke passiert. Intravenös verabreichtes Epo gelangt sowohl unter pathologischen Bedingungen als auch bei intakter Blut-Hirn-Schranke, vermutlich über einen aktiven Transportmechanismus, in den Liquorraum (Ehrenreich et al. 2002 und 2004, Brines und Cerami 2005). Die Möglichkeit der peripheren Verabreichung als Voraussetzung für einen im Alltag praktikablen Einsatz von Epo zur Neuroprotektion bei IMD ist somit gegeben. Daneben könnte eine intranasale Applikation unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke eine attraktive Alternative darstellen, um Epo bei einer Meningitis einfach und schnell im ZNS zur Verfügung zu stellen (Hanson und Frey 2008, García Rodríguez und Sosa Teste 2009).

Die für die IMD-Therapie interessanten Wirkungen von Epo erfordern höhere Dosierungen als die hämatopoetischen Effekte. Tierexperimentelle Studien zur Neuroprotektion durch Epo verwenden daher meist hohe Dosen bis 5000 IE/kg (Strunk et al. 2004, McPherson und Juul 2010). Während Kinder mit Anämien bzw. Frühgeborene zur Vorbeugung von Anämien Epo in einer Größen-

ordnung von etwa 150 bis 250 IE/kg 3x wöchentlich erhalten (Witt und Zoubek 2007, FachInfo-Service), verwenden klinische Studien mit nicht-hämatopoetischen Fragestellungen bei Säuglingen und Kindern meist Dosierungen um 500 bis 3000 IE/kg täglich über 3 oder mehr Tage (Fauchère et al. 2008, Juul et al. 2008, Elmahdy et al. 2010, ClinicalTrials.gov). McPherson und Juul (2010) verglichen Literaturangaben zur Plasmakonzentration von Epo bei Ratten und Säuglingen. Dabei fanden sie bei Ratten nach einmaliger Injektion einer bekanntermaßen neuroprotektiv wirkenden Dosis von 5000 IE/kg vergleichbare Epo-Konzentrationen wie bei Säuglingen nach Gabe von 500 oder 1000 IE/kg. Sie schlussfolgerten daraus, dass 500 bis 1000 IE/kg Epo eine geeignete Dosis zur Neuroprotektion bei Säuglingen darstellen (McPherson und Juul 2010). Für die in dieser Studie durchgeführten *ex vivo*-Untersuchungen wurde dem Erfordernis höherer Konzentrationen für nicht-hämatopoetische Wirkungen entsprochen, indem die mit Nährmedium auf ein Gesamtvolumen von 1500 µl verdünnten Ansätze mit 100 bzw. 500 IE Epo versetzt wurden (Strunk et al. 2008). Hierbei zeigte sich ein dosisabhängiger Unterschied mit einer deutlich wirksamen Reduktion proinflammatorischer Zytokine nur bei der höheren Dosierung. Für eine mögliche erfolgreiche therapeutische Nutzung von Epo bei IMD wird der Einsatz der richtigen Dosierung von entscheidender Bedeutung sein. Eine zu niedrige Dosierung kann wirkungslos bleiben oder gar wie von Wu et al. (2010) an Ratten und von Hojmann et al. (2009) an Menschen beobachtet, einen zusätzlichen Anstieg LPS-induzierter proinflammatorischer Zytokine bewirken und so möglicherweise schädigend wirken. Eine über das Erforderliche hinausgehende Dosis wiederum erbringt keinen zusätzlichen Nutzen (Kellert et al. 2007), kann aber das Risiko von Nebenwirkungen erhöhen.

Insgesamt zeichnet sich Epo durch ein günstiges Nebenwirkungsprofil in allen Altersgruppen aus (Kap. 1.3.2). Allerdings entstammen die meisten Kenntnisse über Art und Häufigkeit von Nebenwirkungen den Erfahrungen mit Epo aus der Anämiebehandlung mit entsprechend niedrigeren Dosierungen. Die hochdosierte Gabe von Epo bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen erwies sich in ersten klinischen Studien aber ebenfalls als sicher (Fauchère et al. 2008, Juul et al. 2008, Elmahdy et al. 2010). Auch bei Erwachsenen zeigte die hochdosierte Therapie in Pilotstudien zur gewebeprotektiven Wirkung eine gute Verträglichkeit (Ehrenreich et al. 2002, Ferrario et al. 2009, Martinez et al. 2010). Obwohl keine Daten zur hochdosierten Therapie für die Altersgruppe der Säuglinge und Kleinkinder vorliegen, lassen die Erfahrungen in anderen Altersgruppen auch bei ihnen mit einer guten Verträglichkeit rechnen. Allerdings sollte eine Anwendung gerade bei der Meningokokkensepsis mit besonderer Vorsicht erfolgen, da diese mit einer gestörten Mikrozirkulation und einer Aktivierung der intravasalen Gerinnung einhergehen kann (Pathan et al. 2003), so dass Interaktionen mit prothrombotischen Nebenwirkungen von Epo denkbar sind. Mindestens ein Teil der Nebenwirkungen von Epo sind auf die gesteigerte Hämatopoese zurückzuführen. In den vergangenen Jahren entwickelte Varianten von Epo ohne hämatopoetische Aktivität könnten zukünftig eine elegante Möglichkeit für einen noch nebenwirkungsärmeren

gewebeprotektiven Einsatz bieten (Kap. 1.3.2). Hermann (2009) gibt jedoch zu bedenken, dass das „klassische“ Epo u.a. auch gefäßstabilisierende Effekte hat, Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke vermindert und die Angiogenese fördert und vermutlich auch über diese Eigenschaften gewebe-schützend wirkt, die aber bei den genannten Epo-Varianten fehlen könnten. Allerdings wurden für einige dieser Varianten vergleichbar gute neuroprotektive Wirkungen nachgewiesen wie für Epo selbst (Sirén et al. 2009).

Die aktuelle Therapie der bakteriellen Meningitis beinhaltet neben der schnellstmöglichen antibiotischen Behandlung häufig auch die Gabe des Glukokortikoids Dexamethason (Kap. 1.1.3). Bei der Erythropoese interagiert Dexamethason mit Epo und antagonisiert Effekte von Epo auf die Zellreifung (Stellacci et al. 2009). Dagegen erbrachte im Modell einer experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis eine kombinierte Gabe von Epo und einem Glukokortikoid (Methylprednisolon) ein funktionell besseres Ergebnis als die Monotherapie mit einer der Substanzen (Diem et al. 2005). Beim Krankheitsmodell der Autoimmunenzephalomyelitis kommt dem Funktionsverlust der Nervenzellfortsätze eine besondere Rolle zu (Trepel 1999). Die Monotherapie mit Epo bewirkte aber keinen Schutz der Axone. Im Hinblick auf den Schutz der neuronalen Zellkörper zeigte sich Epo der Kombinationstherapie jedoch überlegen (Diem et al. 2005). Gorio et al. (2005) beobachteten bei experimentellen Rückenmarksverletzungen, dass die positiven Effekte von Epo auf die motorische Funktion durch eine kombinierte Gabe mit Methylprednisolon neutralisiert wurden. Für eine klinische Studie mit Epo bei IMD sollte daher berücksichtigt werden, dass es bei einer gleichzeitigen Gabe mit Glukokortikoiden möglicherweise zu Wechselwirkungen mit einer Neutralisierung erwünschter Wirkungen von Epo kommen könnte.

Ein sich grundsätzlich stellendes Problem bei der Therapie der IMD ist der häufig sehr schnelle Verlauf der Erkrankung. Dieser hat zur Folge, dass die Patienten beim Eintreffen im Krankenhaus häufig bereits schwerstkrank sind, so dass es zum Zeitpunkt des Therapiebeginns womöglich bereits zu irreparablen Schädigungen des Organismus gekommen ist. Tatsächlich basieren die meisten der experimentell gewonnenen Erkenntnisse über Epos gewebeprotective Effekte auf Versuchsaufbauten, in denen Epo vor bzw. kurz nach einer Schädigung verabreicht wurde. Auch in der hier vorgestellten Arbeit wurden die Vollblutansätze vor Zugabe der Meningokokken mit Epo inkubiert, um die grundsätzliche Fähigkeit von Epo zur Beeinflussung der Zytokinbildung zu untersuchen. Brines et al. (2000) zeigten nach hypoxisch-ischämischer Schädigung eine deutliche Abnahme der neuroprotektiven Wirkung von Epo bei Gabe nach sechs Stunden im Vergleich zur Gabe nach drei Stunden und ein Ausbleiben der Wirkung bei Verabreichung nach neun Stunden. Spreer et al. (2007) verabreichten Epo im Tiermodell einer *E.coli*-Meningitis gemeinsam mit einem Antibiotikum erst 12 Stunden nach Beginn der Erkrankung, um sich den Bedingungen einer realen Behandlungssituation anzunähern, und konnten keine neuroprotektiven Effekte von Epo feststellen.

Der Verlauf einer Infektion unterscheidet sich von Patient zu Patient, so dass die Angabe eines genauen Zeitfensters für eine sinnvolle Gabe von Epo nicht möglich ist. Wie auch die antibiotische Therapie der IMD müsste die Gabe von Epo schnellstmöglich erfolgen.

Aus den beschriebenen Kenntnissen über die nicht-hämatopoetischen Eigenschaften von Epo, den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen zur Hemmung der durch Meningokokken angeregten Bildung proinflammatorischer Zytokine in Monozyten sowie den bisherigen Erfahrungen mit Epo als sicherem Medikament in allen Altersgruppen folgt die Hypothese, dass es sich bei Epo um eine vielversprechende, auch im Säuglings- und Kleinkindalter gut geeignete Substanz für die unterstützende Therapie der IMD handelt. Unter Berücksichtigung der in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Aspekte hinsichtlich Dosierung, Nebenwirkungen und Wechselwirkungen ist daher eine klinische Studie wünschenswert, die diese Hypothese überprüft und hoffentlich bald dazu führen wird, die unzureichenden Therapieerfolge der IMD zu verbessern.

8 Zusammenfassung

Aufgrund der anhaltend hohen Letalität und (Langzeit-)Morbidity invasiver Erkrankungen durch Meningokokken insbesondere bei zuvor gesunden Säuglingen und Kleinkindern werden zusätzliche Therapiemöglichkeiten dringend benötigt. Die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α spielen bei Meningokokkenerkrankungen pathophysiologisch eine wichtige Rolle. Ihre Konzentration korreliert mit der Erkrankungsschwere. Eine Modulation der angeborenen Immunantwort durch Beeinflussung der Zytokinsynthese könnte einen wirkungsvollen therapeutischen Ansatz darstellen. Die vorliegende Arbeit analysierte die altersabhängige Bildung der genannten Zytokine nach Stimulation mit Meningokokken und Lipopolysaccharid (LPS) sowie deren Beeinflussung durch Epo nach Stimulation mit Meningokokken. Der Anteil zytokinpositiver Monozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Untersuchungen wurden *ex vivo* mit Vollblut immunologisch gesunder Probanden durchgeführt. Die Probanden setzten sich aus 20 reifen Neugeborenen, 29 Kindern im Alter bis drei Jahren und 20 Erwachsenen zusammen.

Die am häufigsten von Meningokokkenerkrankungen betroffene Altersgruppe der Kinder zeigte in den durchgeführten Untersuchungen einige Besonderheiten. Anders als die Erwachsenen präsentierten sie eine stärkere TNF- α -Bildung nach Stimulation mit Meningokokken als nach Stimulation mit LPS. Im Vergleich der Altersgruppen fand sich der höchste Anteil IL-6- und TNF- α -positiver Monozyten bei den Kindern. Am deutlichsten zeigte sich dieses bei der TNF- α -Synthese nach Stimulation mit Meningokokken. Eine ausreichend hohe Dosis Epo bewirkte in allen Altersgruppen eine Reduktion der IL-6- und TNF- α -Bildung nach Meningokokkenstimulation.

Ein Zusammenhang zwischen der besonders ausgeprägten Zytokinbildung im Kindesalter und dem Inzidenzgipfel in eben diesem Alter ist vorstellbar. Die hemmende Wirkung von Epo auf die durch Meningokokken induzierte IL-6- und TNF- α -Synthese macht einen positiven Einfluss auf den Verlauf von Meningokokkenerkrankungen denkbar. Zusätzlich zu der hier *ex vivo* nachgewiesenen zytokinhemmenden Wirkung besitzt Epo u.a. neuroprotektive und kardioprotektive Eigenschaften, die sich bei Meningokokkenerkrankungen ebenfalls günstig auswirken könnten. Zudem handelt es sich bei Epo um ein für andere Indikationen auch im Säuglings- und Kindesalter bereits sicher angewendetes Medikament. Zusammengenommen folgt hieraus die Hypothese, dass Epo ein geeigneter Kandidat zur unterstützenden Therapie von Meningokokkenerkrankungen ist. Eine klinische Studie zur Überprüfung dieser Hypothese ist nun wünschenswert, um so hoffentlich bald ein wirksames Mittel zur Senkung der hohen Morbidity und Letalität von Erkrankungen durch Meningokokken zur Verfügung zu haben.

I Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Altersverteilung der Probanden im Kindesalter	12
Abb. 2a	Durchflusszytometrische Bestimmung der Population der Monozyten (Beispielabbildung)	22
Abb. 2b	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils zytokinpositiver Monozyten (Beispielabbildung)	23
Abb. 3	IL-6-Bildung: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B	25
Abb. 4	IL-8-Bildung: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B	27
Abb. 5	TNF- α -Bildung: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B	28
Abb. 6	TNF- α -Bildung bei Kindern: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B	29
Abb. 7	TNF- α -Bildung bei Säuglingen und Kleinkindern: Vergleich der Stimulation mit LPS, Meningokokken der Serogruppe A und Meningokokken der Serogruppe B	30
Abb. 8	IL-6-Bildung: Vergleich zwischen Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen	31
Abb. 9	IL-6-Bildung: Vergleich zwischen Säuglingen, Kleinkindern und Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A	32
Abb. 10	IL-8-Bildung: Vergleich zwischen Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen	33
Abb. 11	IL-8-Bildung: Vergleich zwischen Neugeborenen, Säuglingen, Kleinkindern und Erwachsenen nach Stimulation mit LPS	34
Abb. 12	TNF- α -Bildung: Vergleich zwischen Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen	35
Abb. 13	TNF- α -Bildung: Vergleich zwischen Kindern und Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken der Serogruppe A	36
Abb. 14a	Neugeborene: Serogruppe A und Epo	38
Abb. 14b	Neugeborene: Serogruppe B und Epo	38
Abb. 15	Einfluss von Epo auf die IL-6-Bildung bei Neugeborenen nach Stimulation mit Meningokokken	39
Abb. 16	Einfluss von Epo auf die TNF- α -Bildung bei Neugeborenen nach Stimulation mit Meningokokken	40

Abb. 17a	Kinder: Serogruppe A und Epo	41
Abb. 17b	Kinder: Serogruppe B und Epo	41
Abb. 18	Einfluss von Epo auf die IL-6-Bildung bei Kindern nach Stimulation mit Meningokokken	42
Abb. 19	Einfluss von Epo auf die IL-8-Bildung bei Kindern nach Stimulation mit Meningokokken	43
Abb. 20	Einfluss von Epo auf die TNF- α -Bildung bei Kindern nach Stimulation mit Meningokokken	44
Abb. 21a	Erwachsene: Serogruppe A und Epo	45
Abb. 21b	Erwachsene: Serogruppe B und Epo	45
Abb. 22	Einfluss von Epo auf die IL-6-Bildung bei Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken	46
Abb. 23	Einfluss von Epo auf die IL-8-Bildung bei Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken	47
Abb. 24	Einfluss von Epo auf die TNF- α -Bildung bei Erwachsenen nach Stimulation mit Meningokokken	48
Tabelle 1	Reagenzien	17
Tabelle 2a	Fluoreszenzmarkierung der Antikörper (I)	18
Tabelle 2b	Fluoreszenzmarkierung der Antikörper (II)	19
Tabelle 3	Übersicht Epo und Stimulation	20
Tabelle 4	Übersicht FACS-Röhrchen (pro Zytokin)	21

II Literaturverzeichnis

Adams DH, Lloyd AR (1997) Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 349: 490-495

Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P (2002) Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 952: 128-134

Aoshiha K, Onizawa S, Tsuji T, Nagai A (2009) Therapeutic effects of erythropoietin in murine models of endotoxin shock. *Crit Care Med* 37: 889-898

de Araujo EG, da Silva GM, dos Santos AA (2009) Neuronal cell survival: the role of interleukins. *Ann N Y Acad Sci* 1153: 57-64

Arcasoy MO (2008) The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 141: 14-31

Arzneimittelgesetz (Stand 2009), http://www.gesetze-im-internet.de/amg_1976/BJNR024480976.html (Tag des letzten Zugriffs 08.09.2010)

Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E (1996) Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med* 128: 594-600

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84: 1045-1049

Banisadr G, Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM (2005) Chemokines and brain functions. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 387-399

Bedford H, de Louvois J, Halket S, Peckham C, Hurley R, Harvey D (2001) Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. *BMJ* 323: 533-536

van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K (2007) Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD004405

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr, for the Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344: 699-709

Beutler B, Milsark IW, Cerami AC (1985) Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229: 869-871

Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen Ø, Fredriksen JH, Halstensen A, Holten E, Lindbak AK, Nøkleby H, Rosenqvist E, Solberg LK, Closs O, Eng J, Frøholm LO, Lystad A, Bakketeig LS, Hareide B (1991) Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 338: 1093-1096

- Black S, Klein NP, Shah J, Bedell L, Karsten A, Dull PM (2010) Immunogenicity and tolerability of a quadrivalent meningococcal glycoconjugate vaccine in children 2-10 years of age. *Vaccine* 28: 657-663
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 41-52
- Borrow R, Joseph H, Andrews N, Acuna M, Longworth E, Martin S, Peake N, Rahim R, Richmond P, Kaczmarek E, Miller E (2000) Reduced antibody response to revaccination with meningococcal serogroup A polysaccharide vaccine in adults. *Vaccine* 19: 1129-1132
- Boucek MM, Boerth RC, Artman M, Graham TP Jr, Boucek RJ Jr (1984) Myocardial dysfunction in children with acute meningococemia. *J Pediatr* 105: 538-542
- Boutriaux D, Poolman J, Borrow R, Findlow J, Domingo JD, Puig-Barbera J, Baldó JM, Planelles V, Jubert A, Colomer J, Gil A, Levie K, Kervyn AD, Weynants V, Dominguez F, Barberá R, Sotolongo F (2007) Immunogenicity and safety of three doses of a bivalent (B:4:P1.19,15 and B:4:P1.7-2,4) meningococcal outer membrane vesicle vaccine in healthy adolescents. *Clin Vaccine Immunol* 14: 65-73
- Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214: 149-160
- Brandtzaeg P, Øvstebø R, Kierulf P (1992) Compartmentalization of lipopolysaccharide production correlates with clinical presentation in meningococcal disease. *J Infect Dis* 166: 650-652
- Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D (1989) Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 169: 1977-1991
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10526-10531
- Brines M, Cerami A (2005) Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 6: 484-494
- Brouwer MC, de Gans J, Heckenberg SGB, Zwinderman AH, van der Poll T, van de Beek D (2009) Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9: 31-44
- Brouwer MC, Read RC, van de Beek D (2010) Host genetics and outcome in meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 10: 262-274
- Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ (2010) The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol* 8: 8-14
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL (2003) Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108: 79-85
- Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, Caputi AP, Buemi M (2000) Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 401: 349-356

Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M (2003) Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4802-4806

Campbell H, Borrow R, Salisbury D, Miller E (2009) Meningococcal C conjugate vaccine: the experience in England and Wales. *Vaccine* 27S: B20-B29

Caugant DA, Maiden MCJ (2009) Meningococcal carriage and disease – Population biology and evolution. *Vaccine* 27S: B64-B70

Celik M, Gökmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakç S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagioglu E, Cerami A, Brines M (2002) Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurological disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2258-2263

Chai Z, Gatti S, Toniatti C, Poli V, Bartfai T (1996) Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 β : a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med* 183: 311-316

Chang J, Girgis L (2007) Clinical use of anti-TNF- α biological agents – a guide for GPs. *Aust Fam Physician* 36: 1035-1038

Chang YS, Mu D, Wendland M, Sheldon RA, Vexler ZS, McQuillen PS, Ferriero DM (2005) Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatr Res* 58: 106-111

Chattopadhyay A, Choudhury TD, Bandyopadhyay D, Datta AG (2000) Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochem Pharmacol* 59: 419-425

Chen D, Assad-Kottner C, Orrego C, Torre-Amione G (2008) Cytokines and acute heart failure. *Crit Care Med* 36: S9-S16

Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT, Noguchi CT (2007) Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem* 282: 25875-25883

Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R (2000) Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Endocrinol Metab* 279: E1242-E1248

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK (2000) IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1: 510-514

Claus H, Maiden MCJ, Wilson DJ, McCarthy ND, Jolley KA, Urwin R, Hessler F, Frosch M, Vogel U (2005) Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis* 191: 1263-1271

ClinicalTrials.gov, <http://clinicaltrials.gov/> (Tag des letzten Zugriffs: 19.04.2010)

Cross AS, Opal SM (1995) Endotoxin's role in Gram-negative bacterial infection. *Curr Opin Infect Dis* 8: 156-163

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson T, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL, for the International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee (2008) Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 36: 296-327

Demers EJ, McPherson RJ, Juul SE (2005) Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 58: 297-301

Derkx B, Wittes J, McCloskey R, and the European Pediatric Meningococcal Septic Shock Trial Study Group (1999) Randomized, placebo-controlled trial of HA-1A, a human monoclonal antibody to endotoxin, in children with meningococcal septic shock. *Clin Infect Dis* 28: 770-777

van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Bartelink AKM, van Dalen R, Sauerwein RW, van der Meer JWM (1995) Correlation between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections. *J Infect Dis* 172: 433-439

van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JWM (2000) Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 13: 144-166

Deverman BE, Patterson PH (2009) Cytokines and CNS development. *Neuron* 64: 61-78

Diem R, Sättler MB, Merkler D, Demmer I, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bähr M (2005) Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain* 128: 375-385

Dienz O, Eaton SM, Bond JP, Neveu W, Moquin D, Noubade R, Briso EM, Charland C, Leonard WJ, Ciliberto G, Teuscher C, Haynes L, Rincon M (2009) The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 206: 69-78

Digicaylioglu M, Lipton SA (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades. *Nature* 412: 641-647

Dinarello CA (2004) Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res* 10: 201-222

van Duin D, Shaw AC (2007) Toll-like receptors in older adults. *J Am Geriatr Soc* 55: 1438-1444

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rütther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL (2002) Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 8: 495-505

Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Béhé M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Brück W, Rütther E, Cerami A, Becker W, Sirén AL (2004) Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9: 42-54

Ehrenreich H, Fischer B, Norra C, Schellenberger F, Stender N, Stiefel M, Sirén AL, Paulus W, Nave KA, Gold R, Bartels C (2007a) Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain* 130: 2577-2588

Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, Wilms S, Heinz G, Erdag S, Jahn H, Degner D, Ritzen M, Mohr A, Wagner M, Schneider U, Bohn M, Huber M, Czernik A, Pollmächer T, Maier W, Sirén AL, Klosterkötter J, Falkai P, Rüter E, Aldenhoff JB, Krampe H (2007b) Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry* 12: 206-220

Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jähnig P, Herrmann M, Knauth M, Bähr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C, for the EPO Stroke Trial Group (2009) Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 40: e647-e656

Elmahdy H, El-Mashad AR, El-Bahrawy H, El-Gohary T, El-Barbary A, Aly H (2010) Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. *Pediatrics* 125: e1135-e1142

Epo-study.de, http://www.epo-study.de/index_eng.html (Tag des letzten Zugriffs 22.09.2010)

Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LØ, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6741-6746

Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW (1995) Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 85: 1341-1347

EU-IBIS (2007) Invasive *Neisseria meningitidis* in Europe 2006. http://www.euibis.org/documents/2006_meningo.pdf (Tag des letzten Zugriffs 14.09.2010)

FachInfo-Service <http://www.fachinfo.de/> (Tag des letzten Zugriffs 17.09.2010)

Fauchère JC, Dame C, Vontheim R, Koller B, Arri S, Wolf M, Bucher HU (2008) An approach to using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *Pediatrics* 122: 375-382

Feavers IM und Pizza M (2009) Meningococcal protein antigens and vaccines. *Vaccine* 27S: B42-B50

Ferrario M, Arbustini E, Massa M, Rosti V, Marziliano N, Raineri C, Campanelli R, Bertoletti A, De Ferrari GM, Klersy C, Angoli L, Bramucci E, Marinoni B, Ferlini M, Moretti E, Raisaro A, Repetto A, Schwartz PJ, Tavazzi L (2009) High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: A pilot, randomised, placebo-controlled study. *Int J Cardiol* (Epub ahead of print)

Finne J, Leinonen M, Mäkelä PH (1983) Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis – Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 322: 355-357

Gadient RA, Otten UH (1997) Interleukin-6 (IL-6) – a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* 52: 379-390

- Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calò M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F (2004) Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 53: 2509-2517
- García Rodríguez JC, Sosa Teste I (2009) The nasal route as a potential pathway for delivery of erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke in humans. *ScientificWorldJournal* 9: 970-981
- Gardner P (2006) Prevention of meningococcal disease. *N Engl J Med* 355: 1466-1473
- Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H (1987) Interferon β_2 /B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7251-7255
- Genc K, Genc S, Baskin H, Semin I (2006) Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes. *Physiol Res* 55: 33-38
- Gerber J, Nau R (2010) Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol* 23: 312-318
- Goldstein B, Nadel S, Peters M, Barton R, Machado F, Levy H, Haney DJ, Utterback B, Williams MD, Giroir BP (2006) ENHANCE: Results of a global open-label trial of drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 7: 200-211
- Gonzalez FF, McQuillen P, Mu D, Chang Y, Wendland M, Vexler Z, Ferriero DM (2007) Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci* 29: 321-330
- Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M (2002) Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9450-9455
- Gorio A, Madaschi L, Di Stefano B, Carelli S, Di Giulio AM, De Biasi S, Coleman T, Cerami A, Brines M (2005) Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16379-16384
- Grau GE, Maennel DN (1997) TNF inhibition and sepsis – sounding a cautionary note. *Nat Med* 3: 1193-1195
- Greenwood BM (2007) Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *N Engl J Med* 357: 2507-2509
- Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, Brismar H, Brines M, Cerami A, Andersson U, Zelenina M, Aperia A (2009) Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Sci U S A* 106: 1602-1607
- Hackett SJ, Thomson APJ, Hart CA (2001) Cytokines, chemokines and other effector molecules involved in meningococcal disease. *J Med Microbiol* 50: 847-859
- Hackett SJ, Guiver M, Marsh J, Sills JA, Thomson APJ, Kaczmarek EB, Hart CA (2002) Meningococcal bacterial DNA load at presentation correlates with disease severity. *Arch Dis Child* 86: 44-46

- Halket S, de Louvois J, Holt DE, Harvey D (2003) Long term follow up after meningitis in infancy: behaviour of teenagers. *Arch Dis Child* 88: 395-398
- Hanson LR, Frey WH 2nd (2008) Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci* 9 (Suppl 3): S5
- Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO (2003) A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am J Pathol* 163: 993-1000
- Harrison LH (2008) A multivalent conjugate vaccine for prevention of meningococcal disease in infants. *JAMA* 299: 217-219
- Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME (2009) Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine* 27S: B51-B63
- Härtel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Müller-Steinhardt M, Schultz C (2005) Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol* 142: 446-453
- Havens PL, Garland JS, Brook MM, Dewitz BA, Stremski ES, Troshynski TJ (1989) Trends in mortality in children hospitalized with meningococcal infections, 1957 to 1987. *Pediatr Infect Dis J* 8: 8-11
- Hermann DM (2009) Enhancing the delivery of erythropoietin and its variants into the ischemic brain. *ScientificWorldJournal* 9: 967-969
- Hoffmann O, Braun JS, Becker D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Lehnardt S, Weber JR (2007) TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage. *J Immunol* 178: 6476-6481
- Hojmann P, Taudorf S, Lundby C, Pedersen BK (2009) Erythropoietin augments the cytokine response to acute endotoxin-induced inflammation in humans. *Cytokine* 45: 154-157
- Holst J, Martin D, Arnold R, Campa Huergo C, Oster P, O'Hallahan J, Rosenqvist E (2009) Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 27S: B3-B12
- Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T (2007) Erythropoietin (EPO) – EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci* 80: 893-900
- Hua F, Ma J, Ha T, Xia Y, Kelley J, Williams DL, Kao RL, Browder IW, Schweitzer JB, Kalbfleisch JH, Li C (2007) Activation of toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuroimmunol* 190: 101-111
- Hunter JD, Doddi M (2010) Sepsis and the heart. *Br J Anaesth* 104: 3-11
- Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004) Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). *FASEB J* 18: 412-414
- Ingalls RR, Lien E, Golenbock DT (2001) Membrane-associated proteins of a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through toll-like receptor 2. *Infect Immun* 69: 2230-2236

- J5 Study Group (1992) Treatment of severe infectious purpura in children with human plasma from donors immunized with *Escherichia coli* J5: a prospective double-blind study. *J Infect Dis* 165: 695-701
- Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216
- Jelkmann W (1992) Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72: 449-489
- Jelkmann W (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 43: 649-659
- Jelkmann W (2007) Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 78: 183-205
- John CM, Liu M, Jarvis GA (2009) Profiles of structural heterogeneity in native lipooligosaccharides of *Neisseria* and cytokine induction. *J Lipid Res* 50: 424-438
- Juul SE, Harcum J, Li Y, Christensen RD (1997) Erythropoietin is present in the cerebrospinal fluid of neonates. *J Pediatr* 130: 428-430
- Juul SE, Stallings SA, Christensen RD (1999) Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury. *Pediatr Res* 46: 543-547
- Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA, Ledbetter KJ, Gleason CA, Mayock DE (2008) A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics* 122: 383-391
- Kang YH, Lee CH, Monroy RL, Dwivedi RS, Odeyale C, Newball HH (1992) Uptake, distribution and fate of bacterial lipopolysaccharides in monocytes and macrophages: an ultrastructural and functional correlation. *Electron Microsc Rev* 5: 381-419
- Kao R, Xenocostas A, Rui T, Yu P, Huang W, Rose J, Martin CM (2007) Erythropoietin improves skeletal muscle microcirculation and tissue bioenergetics in a mouse sepsis model. *Crit Care* 11: R58
- Kaplan SL, Schutze GE, Leake JAD, Barson WJ, Halasa NB, Byington CL, Woods CR, Tan TQ, Hoffman JA, Wald ER, Edwards KM, Mason EO Jr (2006) Multicenter surveillance of invasive meningococcal infections in children. *Pediatrics* 118: e979-e984
- Kellert BA, McPherson RJ, Juul SE (2007) A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* 61: 451-455
- Kinugawa K, Takahashi T, Kohmoto O, Yao A, Aoyagi T, Momomura S, Hirata Y, Serizawa T (1994) Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on $[Ca^{2+}]_i$ and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ Res* 75: 285-295
- Kirsch EA, Barton RP, Kitchen L, Giroir BP (1996) Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr Infect Dis* 15: 967-979
- Kishimoto T (2006) Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 8 (Suppl 2): S2
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86: 1243-1254

- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM (1992) Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798-1801
- Koedel U, Klein M, Pfister HW (2010) New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 23: 217-223
- Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368: 339-342
- Kopf M, Herren S, Wiles MV, Pepys MB, Kosco-Vilbois MH (1998) Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med* 188: 1895-1906
- Koroglu TF, Yilmaz O, Ozer E, Baskin H, Gokmen N, Kumral A, Duman M, Ozkan H (2006) Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced splenic and thymic apoptosis in rats. *Physiol Res* 55: 309-316
- Kotiranta-Ainamo A, Rautonen J, Rautonen N (2004) Imbalanced cytokine secretion in newborns. *Biol Neonate* 85: 55-60
- Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD (2000) Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 26: S124-S128
- Krishnagopalan S, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A (2002) Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Curr Opin Crit Care* 8: 376-388
- Kruglov AA, Kuchmiy A, Grivennikov SI, Tumanov AV, Kuprash DV, Nedospasov SA (2008) Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 231-244
- Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, Gokmen N, Duman N, Ozkan H (2005) Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 87: 15-18
- Kumral A, Genc S, Ozer E, Yilmaz O, Gokmen N, Koroglu TF, Duman N, Genc K, Ozkan H (2006) Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biol Neonate* 89: 205-210
- Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yilmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H (2007) Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology* 92: 269-278
- Kvalsvig AJ, Unsworth DJ (2003) The immunopathogenesis of meningococcal disease. *J Clin Pathol* 56: 417-422
- Laing KJ, Secombes CJ (2004) Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28: 443-460
- Lehmann B, Mentzer D, Fischer T, Mallinckrodt-Pape K (2009) Klinische Prüfung an Kindern im Spannungsfeld zwischen wissenschaftlichen Anforderungen, der Sicherstellung der korrekten Behandlung und ethischen Aspekten. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 52: 410-416

- Lehnardt S (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58: 253-263
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8514-8519
- Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M (2004) Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 305: 239-242
- Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B (2007) Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin- α in acute liver failure of mice. *Am J Pathol* 170:1954-1963
- Levin M, Quint PA, Goldstein B, Barton P, Bradley JS, Shemie SD, Yeh T, Kim SS, Cafaro DP, Scannon PJ, Giroir BP, and the rBPI₂₁ Meningococcal Sepsis Study Group (2000) Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI₂₁) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. *Lancet* 356: 961-967
- Levy O (2007) Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 7: 379-390
- Levy C, Taha MK, Weil Olivier C, Quinet B, Lecuyer A, Alonso JM, Aujard Y, Bingen E, Groupe des pédiatres et microbiologistes de l'Observatoire National des Méningites, Cohen R (2010) Association of meningococcal phenotypes and genotypes with clinical characteristics and mortality of meningitis in children. *Pediatr Infect Dis* 29: 618-623
- Li W, Maeda Y, Yuan RR, Elkabes S, Cook S, Dowling P (2004) Beneficial effect of erythropoietin on experimental allergic encephalomyelitis. *Ann Neurol* 56: 767-777
- Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (2006) Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 71: 684-694
- Liem A, van de Woestijne AP, Bruijns E, Roeters van Lennep HWO, de Boo JAJ, van Halteren HK, van Es TP, Jukema JW, van der Laarse A, Zwinderman AH, van Veldhuisen DJ (2009) Effect of EPO administration on myocardial infarct size in patients with non-STE acute coronary syndromes; results from a pilot study. *Int J Cardiol* 131: 285-287
- Lindell-Osuagwu L, Korhonen MJ, Saano S, Helin-Tanninen M, Naaranlahti T, Kokki H (2009) Off-label and unlicensed drug prescribing in three paediatric wards in Finland and review of the international literature. *J Clin Pharm Ther* 34: 277-287
- Lipšić E, Schoemaker RG, van der Meer P, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH (2006a) Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside. *J Am Coll Cardiol* 48: 2161-2167
- Lipšić E, van der Meer P, Voors AA, Westenbrink BD, van den Heuvel AFM, de Boer HC, van Zonneveld AJ, Schoemaker RG, van Gilst WH, Zijlstra F, van Veldhuisen DJ (2006b) A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther* 20: 135-141

- Liu ZY, Chin K, Noguchi CT (1994) Tissue specific expression of human erythropoietin receptor in transgenic mice. *Dev Biol* 166: 159-169
- de Louvois J, Halket S, Harvey D (2007) Effect of meningitis in infancy on school-leaving examination results. *Arch Dis Child* 92: 959-962
- Luster AD (1998) Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338: 436-445
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2004) Durchflusscytometrie. In: Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: *Der Experimentator: Immunologie*. 1. Aufl., 76-101, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München
- MacDonald NE, Halperin SA, Law BJ, Forrest B, Danzig LE, Granoff DM (1998) Induction of immunologic memory by conjugated vs plain meningococcal C polysaccharide vaccine in toddlers: a randomized controlled trial. *JAMA* 280: 1685-1689
- Mache CJ, Roschitz B, Ring E (2007) Erythropoetin in der pädiatrischen Nephrologie. *Monatsschr Kinderheilkd* 155: 1137-1142
- MacLennan J, Obaro S, Deeks J, Williams D, Pais L, Carlone G, Moxon R, Greenwood B (1999) Immune response to revaccination with meningococcal A and C polysaccharides in Gambian children following repeated immunization during early childhood. *Vaccine* 17: 3086-3093
- Maiden MCJ, Stuart JM, for The UK Meningococcal Carriage Group (2002) Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. *Lancet* 359: 1829-1830
- Maier RF, Obladen M, Müller-Hansen I, Kattner E, Merz U, Arlettaz R, Groneck P, Hammer H, Kössel H, Verellen G, Stock GJ, Lacaze-Masmonteil T, Claris O, Wagner M, Matis J, Gilberg F, on behalf of the European Multicenter Erythropoietin Beta Study Group (2002) Early treatment with erythropoietin β ameliorates anemia and reduces transfusion requirements in infants with birth weights below 1000 g. *J Pediatr* 141: 8-15
- Maino VC, Picker LJ (1998) Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry* 34: 207-215
- Makwana N, Baines PB (2005) Myocardial dysfunction in meningococcal septic shock. *Curr Opin Crit Care* 11: 418-423.
- Martich GD, Danner RL, Ceska M, Suffredini AF (1991) Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. *J Exp Med* 173: 1021-1024
- Martinez F, Kamar N, Pallet N, Lang P, Durrbach A, Lebranchu Y, Adem A, Barbier S, Cassuto-Viguier, Glowaki F, Le Meur Y, Rostaing L, Legendre C, Hermine O, Choukroun G, for the NeoPDGF Study Investigators (2010) High dose epoetin beta in the first weeks following renal transplantation and delayed graft function: Results of the Neo-PDGF Study. *Am J Transplant* 10: 1695-1700
- März P, Herget T, Lang E, Otten U, Rose-John S (1997) Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 9: 2765-2773

- Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R (1994) A novel site of erythropoietin production – oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 269: 19488-19493
- Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ (1988) Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest* 81: 1925-1937
- McPherson RJ, Juul SE (2010) Erythropoietin for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Curr Opin Pediatr* 22: 139-145
- van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG (2005) Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 46: 125-133
- Mercier JC, Beaufils F, Hartmann JF, Azéma D (1988) Hemodynamic patterns of meningococcal shock in children. *Crit Care Med* 16: 27-33
- Miller E, Salisbury D, Ramsay M (2001) Planning, registration, and implementation of an immunisation campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a success story. *Vaccine* 20: S58-S67
- Mirlashari MR, Lyberg T (2003) Expression and involvement of Toll-like receptors (TLR)2, TLR4, and CD14 in monocyte TNF- α production induced by lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit* 9: BR316-324
- Mitani H, Katayama N, Araki H, Ohishi K, Kobayashi K, Suzuki H, Nishii K, Masuya M, Yasukawa K, Minami N, Shiku H (2000) Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br J Haematol* 109: 288-295
- Mitra A, Bansal S, Wang W, Falk S, Zolty E, Schrier RW (2007) Erythropoietin ameliorates renal dysfunction during endotoxaemia. *Nephrol Dial Transplant* 22: 2349-2353
- Mogensen TH (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22: 240-273
- Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Østergaard L (2006) Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* 80: 267-277
- Mohamed MA, Cunningham-Rundles S, Dean CR, Hammad TA, Nesin M (2007) Levels of pro-inflammatory cytokines produced from cord blood *in-vitro* are pathogen dependent and increased in comparison to adult controls. *Cytokine* 39: 171-177
- Møller ASW, Bjerre A, Brusletto B, Joø GB, Brandtzaeg P, Kierulf P (2005) Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis* 191: 768-775
- Mongelluzzo J, Mohamad Z, Ten Have TR, Shah SS (2008) Corticosteroids and mortality in children with bacterial meningitis. *JAMA* 299: 2048-2055
- Monsalve F, Rucabado L, Salvador A, Bonastre J, Cuñat J, Ruano M (1984) Meningococcal depression in septic shock caused by meningococcal infection. *Crit Care Med* 12: 1021-1023

- Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI (2003) Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11612-11617
- Mühlbauer B, Janhsen K, Pichler J, Schoettler P (2009) Off-label use of prescription drugs in childhood and adolescence – an analysis of prescription patterns in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 106: 25-31
- Munford RS (2008) Sensing gram-negative bacterial lipopolysaccharides: a human disease determinant? *Infect Immun* 76: 454-465
- Nassif X, Mathison JC, Wolfson E, Koziol JA, Ulevitch RJ, So M (1992) Tumor necrosis factor alpha antibody protects against lethal meningococcaemia. *Mol Microbiol* 6: 591-597
- Nau R, Brück W (2002) Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25: 38-45
- O'Hallahan J, McNicholas A, Galloway Y, O'Leary E, Roseveare C (2009) Delivering a safe and effective strain-specific vaccine to control an epidemic of group B meningococcal disease. *N Z Med J* 122: 48-59
- Opal SM, Glück T (2003) Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 31: S57-S64
- Øvstebø R, Brandtzaeg P, Brusletto B, Haug KBF, Lande K, Høiby EA, Kierulf P (2004) Use of robotized DNA isolation and real-time PCR to quantify and identify close correlation between levels of *Neisseria meningitidis* DNA and lipopolysaccharides in plasma and cerebrospinal fluid from patients with systemic meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 42: 2980-2987
- Ozawa T, Toba K, Suzuki H, Kato K, Iso Y, Akutsu Y, Kobayashi Y, Takeyama Y, Kobayashi N, Yoshimura N, Akazawa K, Aizawa Y; EPO/AMI-1 Pilot Study Researchers (2010) Single-dose intravenous administration of recombinant human erythropoietin is a promising treatment for patients with acute myocardial infarction – randomized controlled pilot trial of EPO/AMI-1 study. *Circ J* 74: 1415-1423
- Pala P, Hussell T, Openshaw PJM (2000) Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 243: 107-124
- Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113: 153-162
- Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ (2003) A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 112: 999-1007
- Pathan N, Sandiford C, Harding SE, Levin M (2002) Characterization of a myocardial depressant factor in meningococcal septicemia. *Crit Care Med* 30: 2191-2198
- Pathan N, Faust SN, Levin M (2003) Pathophysiology of meningococcal meningitis and septicaemia. *Arch Dis Child* 88: 601-607
- Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, McCabe C, Welch SB, Whitney A, O'Gara P, Nadel S, Relman DA, Harding SE, Levin M (2004) Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet* 363: 203-209

- Peltola H, Roine I, Fernández J, Zavala I, González Ayala S, González Mata A, Arbo A, Bologna R, Miño G, Goyo J, López E, Dourado de Andrade S, Sarna S (2007) Adjuvant glycerol and/or dexamethasone to improve the outcomes of childhood bacterial meningitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 45: 1277-1286
- Peltola H, Roine I (2009) Improving the outcomes in children with bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 22: 250-255
- Peltola H, Roine I, Fernández J, González Mata A, Zavala I, Gonzalez Ayala S, Arbo A, Bologna R, Goyo J, López E, Miño G, Dourado de Andrade S, Sarna S, Jauhainen T (2010) Hearing impairment in childhood bacterial meningitis is little relieved by dexamethasone or glycerol. *Pediatrics* 125: e1-e8
- Philbin VJ, Levy O (2009) Developmental biology of the innate immune response: implications for neonatal and infant vaccine development. *Pediatr Res* 65: 98R-105R
- Plant L, Sundqvist J, Zughaier S, Lökvist L, Stephens DS, Jonsson AB (2006) Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 74: 1360-1367
- Pollard AJ, Nadel S, Ninis N, Faust SN, Levin M (2007) Emergency management of meningococcal disease: eight years on. *Arch Dis Child* 92: 283-286
- Pridmore AC, Wyllie DH, Abdillahi F, Steeghs L, van der Ley P, Dower SK, Read RC (2001) A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via Toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. *J Infect Dis* 183: 89-96
- Prins JM, Lauw FN, Derkx BHF, Speelman P, Kuijper EJ, Dankert J (1998) Endotoxin release and cytokine production in acute and chronic meningococcaemia. *Clin Exp Immunol* 114: 215-219
- Ramsay ME, Andrews N, Kaczmarski EB, Miller E (2001) Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet* 357: 195-196
- Ramsay ME, Andrews NJ, Trotter CL, Kaczmarski EB, Miller E (2003) Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. *BMJ* 326: 365-366
- Ransohoff RM (2009) Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity* 31: 711-721
- Razzouk BI, Hord JD, Hockenberry M, Hinds PS, Feusner J, Williams D, Rackoff WR (2006) Double-blind, placebo-controlled study of quality of life, hematologic end points, and safety of weekly epoetin alfa in children with cancer receiving myelosuppressive chemotherapy. *J Clin Oncol* 24: 3583-3589
- Riksen NP, Hausenloy DJ, Yellon DM (2008) Erythropoietin: ready for prime-time cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci* 29: 258-267
- Riordan FAI, Marzouk O, Thomson APJ, Sills JA, Hart CA (1996) Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in meningococcal disease. *Arch Dis Child* 75: 453-454
- RKI (Robert Koch-Institut) (2006): Begründung der STIKO-Empfehlungen zur Impfung gegen Pneumokokken und Meningokokken vom Juli 2006. *Epid Bull* 2006; 31: 255-267

RKI (Robert Koch-Institut) (2009a) Zur Situation bei ausgewählten Infektionskrankheiten in Deutschland: Invasive Meningokokken-Erkrankungen im Jahr 2008. *Epid Bull* 45: 463-470

RKI (Robert Koch-Institut) (2009b) Invasive Meningokokken-Erkrankungen: Retrospektive Erhebung von Verdachtsmeldungen nach §6 Abs. 1 IfSG. *Epid Bull* 8: 69-75

RKI (Robert Koch-Institut) (2010): RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte: Meningokokken-Erkrankungen.

http://www.rki.de/clin_160/nn_196878/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Mbl_Meningokokken.html (Tag des letzten Zugriffs 14.09.2010)

Robinson K, Neal KR, Howard C, Stockton J, Atkinson K, Scarth E, Moran J, Robins A, Todd I, Kaczmarek E, Gray S, Muscat I, Slack R, Ala'Aldeen DAA (2002) Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by meningococcal carriage. *Infect Immun* 70: 1301-1309

Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90: 909-928

Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM (2001) Meningococcal disease. *N Engl J Med* 344(18): 1378-1388

Rote Liste® Online <http://www.rote-liste.de/Online> (Tag des letzten Zugriffs: 19.04.2010)

Rothwell NJ (1999) Annual review prize lecture: Cytokines – killers in the brain? *J Physiol* 514: 3-17

Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, Abel ED, Xenocostas A, Kvietys PR (2005) Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res* 65: 719-727

Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R (1998) Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 26-32

Sadarangani M, Pollard AJ (2010) Serogroup B meningococcal vaccines – an unfinished story. *Lancet Infect Dis* 10: 112-124

Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R (1998) *In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4635-4640

Salyer JL, Bohnsack JF, Knape WA, Shigeoka AO, Ashwood ER, Hill HR (1990) Mechanisms of tumor necrosis factor- α alteration of PMN adhesion and migration. *Am J Pathol* 136: 831-841

Sandhu S, Feiring B, Oster P, Helland OS, Bakke HSW, Næss LM, Aase A, Aaberge IS, Kristoffersen AC, Rydland KM, Tilman S, Nøkleby H, Rosenqvist E (2007) Immunogenicity and safety of a combination of two serogroup B meningococcal outer membrane vesicle vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1062-1069

Santhanam AVR, Smith LA, Nath KA, Katusic ZS (2006) *In vivo* stimulatory effect of erythropoietin on endothelial nitric oxide synthase in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H781-H786

Schroten H, Adam R, Noack R, Rüggeberg J, Schaad UB, Szenborn L, Tenenbaum T (2009) Meningitis. In: Scholz H, Belohradsky BH, Bialek R, Heininger U, Kreth HW, Roos R: *DGPI Handbuch, Infektionen bei Kindern und Jugendlichen*. 5. Aufl., 720-729, Thieme, Stuttgart

- Schultz C, Rott C, Temming P, von Puttkammer J, Bucsky P (2002a) Influence of specimen age and use of different negative controls in determination of intracytoplasmic levels of cytokines after whole-blood culture assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 295-298
- Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Möller JC, Bucsky P (2002b) Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res* 51: 317-322
- Schultz C, Temming P, Bucsky P, Göpel W, Strunk T, Härtel C (2004) Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol* 135: 130-136
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249: 1429-1431
- Sexton K, Lennon D, Oster P, Aaberge I, Martin D, Reid S, Wong S, O'Hallahan J (2004) Proceedings of the Meningococcal Vaccine Strategy World Health Organization satellite meeting, 10 March 2004, Auckland, New Zealand. *N Z Med J* 117: 1026
- Shalaby MR, Waage A, Aarden L, Espevik T (1989) Endotoxin, tumor necrosis factor- α and interleukin 1 induce interleukin 6 production *in vivo*. *Clin Immunol Immunopathol* 53: 488-498
- Shang Y, Li X, Prasad PV, Xu S, Yao S, Liu D, Yuan S, Feng D (2009a) Erythropoietin attenuates lung injury in lipopolysaccharide treated rats. *J Surg Res* 155: 104-110
- Shang Y, Jiang YX, Xu SP, Wu Y, Wu ZY, Yuan SY, Yao SL (2009b) Reduction of pulmonary inflammatory response by erythropoietin in a rat model of endotoxaemia. *Chin Med J* 122: 834-838
- Sharma M (2010) Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Crit Rev Biotechnol* 30: 1-22
- Sharshar T, Hopkinson NS, Orlikowski D, Annane D (2005) Science review: The brain in sepsis – culprit and victim. *Crit Care* 9: 37-44
- Sherry B, Cerami A (1988) Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol* 107: 1269-1277
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777-1782
- Siberry GK, McMillan JA (2008) Corticosteroids for bacterial meningitis. *N Engl J Med* 358: 1400
- Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H (2001a) Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 101: 271-276
- Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P (2001b) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4044-4049
- Sirén AL, Faßhauer T, Bartels C, Ehrenreich H (2009) Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics* 6: 108-127
- Sjölander H, Mogensen TH, Kilian M, Jonsson AB, Paludan SR (2008) Important role for Toll-like receptor 9 in host defense against meningococcal sepsis. *Infect Immun* 76: 5421-5428

- Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M, Beutler B (2003) Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6075-6080
- Snape MD, Perrett KP, Ford KJ, John TM, Pace D, Yu LM, Langley JM, McNeil S, Dull PM, Ceddia F, Anemona A, Halperin SA, Dobson S, Pollard AJ (2008) Immunogenicity of a tetravalent meningococcal glycoconjugate vaccine in infants – a randomized controlled trial. *JAMA* 299: 173-184
- de Souza AL, Seguro AC (2008) Two centuries of meningococcal infection: from Vieusseux to the cellular and molecular basis of disease. *J Med Microbiol* 57: 1313-1321
- Spreer A, Gerber J, Hanssen M, Nau R (2007) No neuroprotective effect of erythropoietin under clinical treatment conditions in a rabbit model of *Escherichia coli* meningitis. *Pediatr Res* 62: 680-683
- Sprong T, Stikkelbroeck N, van der Ley P, Steeghs L, van Alphen L, Klein N, Netea MG, van der Meer JWM, van Deuren M (2001) Contributions of *Neisseria meningitidis* LPS and non-LPS to proinflammatory cytokine response. *J Leukoc Biol* 70: 283-288
- Sprong T, Møller ASW, Bjerre A, Wedege E, Kierulf P, van der Meer JWM, Brandtzaeg P, van Deuren M, Mollnes TE (2004a) Complement activation and complement-dependent inflammation by *Neisseria meningitidis* are independent of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 72: 3344-3349
- Sprong T, Netea MG, van der Ley P, Verver-Jansen TJG, Jacobs LEH, Stalenhoef A, van der Meer JWM, van Deuren M (2004b) Human lipoproteins have divergent neutralizing effects on *E. coli* LPS, *N. meningitidis* LPS, and complete Gram-negative bacteria. *J Lipid Res* 45: 742-749
- Stellacci E, Di Noia A, Di Baldassarre A, Migliaccio G, Battistini A, Migliaccio AR (2009) Interaction between the glucocorticoid and erythropoietin receptors in human erythroid cells. *Exp Hematol* 37: 559-572
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P (2007) Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 369: 2196-2210
- Sterneck E, Kaplan DR, Johnson PF (1996) Interleukin-6 induces expression of peripherin and cooperates with Trk receptor signaling to promote neuronal differentiation in PC12 cells. *J Neurochem* 67: 1365-1374
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan SY, Rocznik S, Shanafelt AB (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270: 27348-27357
- Strober W, James SP (1988) The interleukins. *Pediatr Res* 24: 549-557
- Strunk T, Härtel C, Schultz C (2004) Does erythropoietin protect the preterm brain? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89: F364-F366
- Strunk T, Härtel C, Temming P, Matzke N, Zimmer J, Schultz C (2008) Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes. *Acta Paediatr* 97: 16-20
- Suh JW, Chung WY, Kim YS, Kim KI, Jeon EJ, Cho YS, Youn TJ, Chae IH, Kim CH, Choi DJ (2010) The effect of intravenous administration of erythropoietin on the infarct size in primary percutaneous coronary intervention. *Int J Cardiol* (Epub ahead of print)

- Sun Y, Calvert JW, Zhang JH (2005) Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 36: 1672-1678
- Tamareille S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croué A, Henrion D, Furber A, Prunier F (2009) Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H2035-H2043
- Tatad AMF, Nesin M, Peoples J, Cheung S, Lin H, Sison C, Perlman J, Cunningham-Rundles S (2008) Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes. *Neonatology* 94: 8-15
- Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL (1990) Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol* 144: 2609-2613
- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ 3rd, Zentella A, Albert JD, Shires GT, Cerami A (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234: 470-474
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330: 662-664
- Tracey KJ, Cerami A (1993) Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* 21: S415-S422
- Treguer F, Donal E, Tamareille S, Ghaboura N, Derumeaux G, Furber A, Prunier F (2010) Speckle tracking imaging improves *in vivo* assessment of EPO-induced myocardial salvage early after ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1679-H1686
- Trepel M (1999) Grundlagen, Begriffe und Definitionen. In: *Neuroanatomie – Struktur und Funktion*. 2., überarbeitete Aufl., 1-18, Urban & Fischer, München, Jena
- Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST (2006) A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* 26: 1269-1274
- Uronen H, Williams AJ, Dixon G, Andersen SR, Van Der Ley P, Van Deuren M, Callard RE, Klein N (2000) Gram-negative bacteria induce proinflammatory cytokine production by monocytes in the absence of lipopolysaccharide (LPS). *Clin Exp Immunol* 122: 312-315
- Vermont CL, Hazelzet JA, de Kleijn ED, van den Dobbelaars GPJM, de Groot R (2006) CC and CXC chemokine levels in children with meningococcal sepsis accurately predict mortality and disease severity. *Crit Care* 10: R33
- Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P (2003) Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 189: 971-975

- Vincent JL, Bernard GR, Beale R, Doig C, Putensen C, Dhainaut JF, Artigas A, Fumagalli R, Macias W, Wright T, Wong K, Sundin DP, Turlo MA, Janes J, for the ENHANCE Study Group (2005) Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial ENHANCE: Further evidence for survival and safety and implications for early treatment. *Crit Care Med* 33: 2266-2277
- Waage A, Halstensen A, Espevik T (1987) Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 329: 355-357
- Waage A, Halstensen A, Espevik T, Brandtzæg P (1993) Compartmentalization of TNF and IL-6 in meningitis and septic shock. *Mediators Inflamm* 2: 23-25
- Wang CX, Shuaib A (2002) Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 67: 161-172
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004a) Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35: 1732-1737
- Wang X, Zhu C, Wang X, Gerwien JG, Schratzenholz A, Sandberg M, Leist M, Blomgren K (2004b) The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem* 91: 900-910
- Witt V, Zoubek A (2007) Erythropoietin in der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie. *Monatsschr Kinderheilkd* 155: 1150-1158
- Wong S, Lennon D, Jackson C, Stewart J, Reid S, Crengle S, Tilman S, Aaberge I, O'Hallahan J, Oster P, Mulholland K, Martin D (2007) New Zealand epidemic strain meningococcal B outer membrane vesicle vaccine in children aged 16-24 months. *Pediatr Infect Dis J* 26: 345-350
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433
- Wu WT, Hu TM, Lin NT, Subeq YM, Lee RP, Hsu BG (2010) Low-dose erythropoietin aggravates endotoxin-induced organ damage in conscious rats. *Cytokine* 49: 155-162
- Xing L, Remick DG (2003) Relative cytokine and cytokine inhibitor production by mononuclear cells and neutrophils. *Shock* 20: 10-16
- Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K (1992) Tumor necrosis factor α and interferon γ synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF- κ B-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem* 267: 22506-22511
- Yerkovich ST, Wikström ME, Suriyaarachchi D, Prescott SL, Upham JW, Holt PG (2007) Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. *Pediatr Res* 62: 547-552
- Yu XY, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT (2002) Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 129: 505-516

Zenz W, Zoehrer B, Levin M, Fanconi S, Hatzis TD, Knight G, Müllner M, Faust SN, for the International Paediatric Meningococcal Thrombolysis Study Group (2004) Use of recombinant tissue plasminogen activator in children with meningococcal purpura fulminans: A retrospective study. *Crit Care Med* 32: 1777-1780

Zhang Y, Gaekwad J, Wolfert MA, Boons GJ (2008) Innate immune response of synthetic lipid A derivatives of *Neisseria meningitidis*. *Chemistry* 14: 558-569

Zhu C, Kang W, Xu F, Cheng X, Zhang Z, Jia L, Ji L, Guo X, Xiong H, Simbruner G, Blomgren K, Wang X (2009) Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 124: e218-e226

Zoubek A (2007) Erythropoetin im Kindesalter. *Monatsschr Kinderheilkd* 155: 1129-1130

Zughaier SM, Tzeng YL, Zimmer SM, Datta A, Carlson RW, Stephens DS (2004) *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/Toll-like receptor 4 pathway. *Infect Immun* 72: 371-380

Zughaier SM, Lindner B, Howe J, Garidel P, Koch MHJ, Brandenburg K, Stephens DS (2007) Physicochemical characterization and biological activity of lipooligosaccharides and lipid A from *Neisseria meningitidis*. *J Endotoxin Res* 13: 343-357

III Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christian Schultz danke ich für die Überlassung des Themas, die überaus geduldige Unterstützung meiner Arbeit sowie wertvolle konstruktive Anregungen und Gespräche.

Mein Dank für unersetzliche fachliche Anleitung und Hilfe im Labor sowie für viele unterhaltsame Arbeitsstunden auf engstem Raum richtet sich an Frau Jessica Richter, Frau Christiane Staabs und Frau Anja Sewe.

Für die gute Zusammenarbeit bei der oftmals schwierigen Gewinnung des Probenmaterials bin ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Kreißsaals und der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin und ganz besonders Herrn PD Dr. Christoph Härtel zu großem Dank verpflichtet. Ebenso danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin für die zuverlässige Kooperation.

Für die Bereitstellung der Meningokokken danke ich Herrn Prof. Dr. Jan Rupp vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, Thomas und allen Freunden, die mich während der Arbeit unterstützt haben. Besonders erwähnt sein sollen an dieser Stelle Horst und Peter Panski.

IV Lebenslauf und Veröffentlichungen

Name	Janna Maria Zimmer
Geburtsdatum	12.09.1979
Geburtsort	Henstedt-Ulzburg
1986-1990	Grundschule Falkenberg, Norderstedt
1990-1999	Gymnasium Harksheide, Norderstedt
1997	Gymnasium Mikkelin Lyseon Lukio, Mikkeli/Finnland
1999-2000	Freiwilliges Soziales Jahr in der Asklepios Nordseeklinik, Westerland/Sylt
2000-2002	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
2002	Ärztliche Vorprüfung
2002-2007	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 2004	Doktorandin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UKSH, Campus Lübeck; Experimenteller Teil der Arbeit von 2004-2006
2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2008-2009	Assistenzärztin am Kinderhospital Osnabrück



Veröffentlichungen:

Strunk T, Härtel C, Temming P, Matzke N, Zimmer J, Schultz C (2008) Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes. *Acta Paediatr* 97: 16-20

Schultz C, Zimmer J, Härtel C, Rupp J, Temming P, Strunk T (2008) Attenuation of monocyte proinflammatory cytokine responses to *Neisseria meningitidis* in children by erythropoietin. *Clin Exp Immunol* 154: 187-191