

Aus dem Zentrum für Neurologie Tübingen
Neurologische Klinik und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung
Abteilung Allgemeine Neurologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Weller

**Bedeutung von Erythropoietin für Neuroprotektion und
Neuroregeneration in läsierten adulten Neuronen im ZNS**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Caroline Juliette Happold
aus
Stuttgart**

2007

Dekan

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter

Professor Dr. S. Isenmann

2. Berichterstatter

Professor Dr. U. Lauer

3. Berichterstatter

Professor Dr. S. Schwab

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Kretz, A., Kügler, S., Happold, C., Bähr, M., Isenmann, S.: "Excess Bcl-XL increases the intrinsic growth potential of adult CNS neurons *in vitro*."
Mol Cell Neurosci (2004), 26(1): 63-74.

Kretz, A., Happold, C.J., Marticke, J.K., Isenmann, S.: "Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation."
Mol Cell Neurosci (2005), 29(4):569-79.

Abstract:

Kretz, A., Kügler, S., Happold, C., Bähr, M., Isenmann, S.: "Axonal regeneration in adult CNS neurons is promoted by Bcl-X_L."
Thieme Verlag (2003); The Neurosciences from Basic Research to Therapy.

Poster:

29th Göttingen Neurobiology Conference and 5th Meeting of the German Neuroscience Society 2003

Kretz, A., Kügler, S., Happold, C., Bähr, M., Isenmann, S.: "Bcl-X_L promotes axonal regeneration in adult CNS neurons *in vitro*."

*Die Neugier steht immer am Anfang
eines Problemes, das gelöst werden
will.*

Galileo Galilei

**Meiner lieben Familie
und den engsten Freunden**

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
DIAGRAMMVERZEICHNIS	7
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	9
1. EINLEITUNG	11
1.1 Anti-Apoptose und Regeneration	11
1.1.1 Therapeutische Aspekte	14
1.1.2 Ansatz der vorliegenden Untersuchung	15
1.2 Erythropoietin (EPO) im adulten ZNS	16
1.3 Wege der Signaltransduktion	20
1.3.1 MAPK-Signalweg	20
1.3.2 Jak/STAT-Signalweg	23
1.3.3 PI3K-Signalweg	26
1.4 Bcl-X_L im adulten ZNS	28
2.1 Versuchstiere	30
2.1.1 Quetschläsion (crush) des optischen Nerven (ON)	30
2.1.2 Durchtrennung („Axotomie“) des optischen Nerven (ON) und retrograde Vektorapplikation	30
2.1.3 Intravitreale Zytokin-Injektion	31
2.1.4 Retrograde Markierung retinaler Ganglienzellen	32
2.1.5 Explantation und Kultivierung retinalen Gewebes	33
2.2 Immunhistochemie	35
2.2.1 Auswertung des neuronalen Wachstums	36
2.2.2 Auswertung des mittleren Überlebens der läsierten RGZs	36
2.3 Zytokin und Inhibitoren	37
2.4 Adenovirales Vektorsystem zur Überexpression von Bcl-X_L	38
2.5 Proteinnachweis	39
2.5.1 Lysatgewinnung	39
2.5.2 Western Blot	40
2.6 Statistik	41
2.7 Materialien und Geräte	42
2.7.1 Verwendete Reagenzien	42
2.7.2 Herstellung wichtiger Puffer und Medien	42
2.7.3 Geräte und Verbrauchsmaterial	44

3. ERGEBNISSE	46
3.1 Stimulation neuronalen Wachstums durch Erythropoietin	46
3.1.1 Erythropoietin: Gabe in Kultur fördert konzentrationsabhängig axonales Wachstum	46
3.1.2 Erythropoietin: Behandlung <i>in vivo</i> fördert axonales Wachstum	50
3.2 Erythropoietin: Gabe in Kultur ist neuroprotektiv	54
3.3 Signaltransduktion Erythropoietin-vermittelter Neuroregeneration	56
3.3.1 Regulation von Transkriptionsfaktoren und Zielgenen	56
3.3.2 Auswirkung der Inhibition von Transduktionskaskaden	60
3.4 Ad.Bcl-X_L stimuliert neuronales Wachstum in vivo	66
3.5 Ad.Bcl-X_L führt zu keiner signifikanten Zellrettung retinaler Ganglienzellen in vivo	67
4. DISKUSSION	70
4.1 Regenerationsfördernde und anti-apoptotische EPO-Effekte	70
4.1.1 Regeneratives Potential von Erythropoietin	70
4.1.2 Anti-apoptotisches Potential von Erythropoietin	71
4.1.3 Regeneratives Potential von Bcl-X _L	72
4.1.4 Anti-apoptotisches Potential von Bcl-X _L	73
4.1.5 Vergleich der regenerativen Effekte von Erythropoietin und Bcl-X _L	74
4.2 Signalvermittlung neuroprotektiver und regenerationsfördernder EPO-Effekte	75
4.2.1 Regulation EPO-vermittelter Neuroregeneration; Inhibitorversuche	75
4.2.2 Regulation EPO-vermittelter Neuroregeneration; Western Blots	77
4.3 Rolle von Bcl-X_L für die Erythropoietin-vermittelte Neuroregeneration	78
4.4 Rolle von STAT3 für die Erythropoietin-vermittelte Neuroregeneration	80
4.5 Grenzen, Alternativen, Ausblick	82
ZUSAMMENFASSUNG	85
LITERATUR	87
ERKLÄRUNG ZUR PROMOTIONSORDNUNG	100
DANKSAGUNG	103
LEBENS LAUF	105

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1	Explantation und Kultivierung retinalen Gewebes	S. 35
Abb. 2	Konzentrationsabhängiges Neuritenwachstum nach EPO-Gabe <i>in vitro</i>	
Abb. 2a	Kontrollretina	S. 52
Abb. 2b	nach Gabe von 100 IE EPO	S. 52
Abb. 2c	nach Gabe von 1000 IE EPO	S. 52
Abb. 3	Konzentrationsabhängiges Neuritenwachstum nach EPO-Gabe <i>in vivo</i>	
Abb. 3a	Kontrollretina	S. 53
Abb. 3b	nach intraoculärer EPO-Injektion	S. 53
Abb. 4	Dil-Färbung retinaler Ganglienzellen; EPO-Expression	S. 56
Abb. 5	Ergebnisse der Western Blot Analysen	
Abb. 5a	STAT1, STAT3, STAT5 Western Blots	S. 58
Abb. 5b	p44/42 MAPK Western Blot	S. 59
Abb. 5c	Bcl-X _L Western Blot	S. 59
Abb. 6	Neuritenwachstum nach Bcl-X _L -Gabe <i>in vivo</i>	S. 66
Abb. 7	Dil-Färbung retinaler Ganglienzellen; Bcl-X _L -Expression	S. 69

Diagrammverzeichnis:

Diag. 1	Stimulation neuronalen Wachstums durch EPO <i>in vitro</i>	
Diag. 1a	Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen	S. 48
Diag. 1b	Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen	S. 48
Diag. 2	Stimulation neuronalen Wachstums durch EPO <i>in vivo</i>	
Diag. 2a	Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen	S. 51
Diag. 2b	Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen	S. 51
Diag. 3	Anzahl überlebender RGZ nach Läsion mit/ohne EPO	S. 55
Diag. 4	Inhibition EPO-induzierter Neuritogenese durch AG490	
Diag. 4a	Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen	S. 60
Diag. 4b	Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen	S. 61
Diag. 5	Inhibition EPO-induzierter Neuritogenese durch LY294002 (25µmol/ml)	
Diag. 5a	Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen	S. 62
Diag. 5b	Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen	S. 63

Diag. 6	Inhibition EPO-induzierter Neuritogenese durch LY294002 (50µmol/ml)	
Diag. 6a	Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen	S. 64
Diag. 6b	Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen	S. 64
Diag. 7	Keine Inhibition EPO-induzierter Neuritogenese durch zVAD	
Diag. 7a	Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen	S. 65
Diag. 7b	Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen	S. 65
Diag. 8	Stimulation neuronalen Wachstums durch Bcl-X _L <i>in vivo</i>	
Diag. 8a	Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen	S. 67
Diag. 8b	Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen	S. 67
Diag. 9	Anzahl überlebender RGZ nach Läsion mit/ohne Bcl-X _L	S. 68

Verzeichnis der Abkürzungen

Ad.	Adenovirus
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
Apaf	<i>Apoptosis protease activating factor</i>
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma/leucemia</i>
BCR/ABL	<i>Breakpoint cluster region/Abelson</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BRS	Blut-Retina-Schranke
Caspase	<i>Cysteiny l aspartate-specific protease</i>
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
CrmA	<i>Cytokine response modifier A</i>
d.h.	das heißt
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3',-tetramethyl- indocarbocyanin-perchlorat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleid acid</i>
ED	Encephalomyelitis disseminata
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietin-Rezeptor
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
GAP-43	<i>Growth associated protein 43</i>
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HTLV	<i>Human T-cell leucemia virus</i>
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon

IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
Jak-2	<i>Janus-kinase 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KD	kilo Dalton
MAG	<i>myelin-associated glycoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK/MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK/MEKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
ON	Optischer Nerv
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PIAS	<i>Protein inhibitors of activated STATs</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
RGZ	Retinale Ganglienzelle
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RSK	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
SD	<i>Sprague-Dawley</i>
Serpin	Serin Proteinase Inhibitor
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>Signal transduction and activator of transcription</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Anti-Apoptose und Regeneration

Obgleich adulte Nervenzellen zu den langlebigsten Zellen im adulten Organismus der Säugetiere gehören, sterben viele Neurone physiologisch schon im Verlauf der Entwicklung ab. Des Weiteren ist der neuronale Untergang ein Hauptmerkmal neurodegenerativer Erkrankungen. Der neuronale Zelltod während der Entwicklung und bei degenerativen Erkrankungen weist morphologisch und biochemisch ähnliche Merkmale auf und wird als „Apoptose“ oder programmierter Zelltod bezeichnet. Im Gegensatz zu mitotisch aktivem Wechselgewebe können postmitotische Neurone nach Schädigung oder Zelltod nicht ersetzt werden.

Die Apoptose definiert sich morphologisch durch Zellschrumpfung und Chromatinkondensation, Destabilisierung der Zellmembran und daraus resultierende Zellausstülpungen, die sich abschnüren (*blebbing*). Besonderes biochemisches Merkmal stellt die „oligonukleosomale Degradation“, eine durch eine zelleigene Endonuklease verursachte DNA-Zerstörung, dar. Im Gegensatz dazu ist die Nekrose, der genetisch nicht programmierte Zelltod, durch den Zusammenbruch des Transmembranpotentials charakterisiert, der einen Na^+ - und Ca^{2+} - Einstrom und ein daraus resultierendes Anschwellen der Zelle zur Folge hat. Darüberhinaus beobachtet man bei der Nekrose eine inflammatorische Reaktion im umliegenden Gewebe, die bei der Apoptose nicht typisch ist.

Eine genetische Grundlage der Apoptose wurde erstmals Anfang der neunziger Jahre diskutiert, als im Nematoden *Caenorhabditis elegans* apoptose-regulierende *ced*-Gene entdeckt wurden (Horvitz et al., 1994). Für die pro- und anti-apoptotischen CED-Proteine wurden dann nach und nach analoge Proteine in Säugern identifiziert: Mitglieder der Bcl-2-Familie und Caspasen.

Hatte man lange Zeit angenommen, daß die Ursache für das Eintreten von neuronalem Zelltod einzig im Entzug neurotropher Faktoren liege, ergaben sich hier nun weitere Erklärungen zu intrazellulären Mechanismen der

Apoptoseinduktion. In einem Kulturmodell sympathischer Neurone war gezeigt worden, daß nach Entzug des neurotrophen Faktors NGF (*nerve growth factor*) erst RNA und Protein synthetisiert werden mußten, ehe die Zellen in Apoptose übergingen (Martin et al., 1988). Dies legte den Schluß nahe, daß Neurotrophine über verschiedene Signalwege ein endogenes Zelltodprogramm unterdrücken oder antagonisieren, und daß dieses auf molekularer Ebene über *ced*-Gen-Homologe, d.h. Caspasen und pro- und anti-apoptotische Proteine aus der Bcl-2-Familie, reguliert wird.

Allerdings zeigte sich auch, daß nicht nur Neurotrophine die Apoptose steuern, sondern daß es unterschiedliche Zelltod-auslösende Mechanismen gibt. Führen physiologische Apoptose im heranreifenden Gehirn und pathologische Apoptose im adulten Gehirn letztlich zum selben Ergebnis, so sind doch die auslösenden Faktoren verschiedene. Neurotrophinentzug spielt eine große Rolle bei apoptotischen Vorgängen in der Entwicklung, aber eher eine untergeordnete bei neurodegenerativen Erkrankungen im ausgereiften Gehirn. Insbesondere bei ischämisch bedingtem Zelluntergang scheinen diverse Faktoren wie oxidativer Stress durch Radikale, Exzitotoxizität und proinflammatorische Zytokine eine Rolle zu spielen.

Für das oben genannte NGF wurde im Gehirn eine Apoptosehemmung über rezeptorgebundene PI3-Kinase- und konsekutive STAT-Aktivierung gezeigt (Nuñez & Pesó, 1998). Vergleichbare Signalwege fand man im hämatopoietischen System für Erythropoietin (EPO) und andere hämatopoietische Faktoren, die über gleichzeitige Aktivierung von Jak/STAT und p42/44 MAPK zellproliferativ wirken, wohingegen das Zellüberleben am ehesten mit der Aktivierung von PI3-Kinase/AKT, p42/44 MAPK und Jak/STAT korreliert (Ratajczak et al., 2001). Dies und neue Erkenntnisse über EPO im Gehirn lassen eine mögliche Induktion anti-apoptotischer Vorgänge über eine derartige Signalkaskade auch im ZNS (zentrales Nervensystem) vermuten.

Als zweiter Punkt im Verständnis neurologischer Erkrankung stellt sich die Frage nach der Regenerationsfähigkeit neuronaler Zellen. Bisher galten Nervenzellen des ZNS, im Gegensatz zu peripheren Nerven, als nicht regenerationsfähig. Genaue Gründe für dieses Defizit sind bis heute noch

wenig bekannt; Jahrzehnte galt das Dogma von Ramon Y Cajal (1928), Neurone des ZNS seien nicht in der Lage, zu regenerieren. Erstmals 1981 gelang der Beweis, dass Regeneration von Nervenfasern grundsätzlich auch im ZNS von adulten Säugern möglich ist: Segmente peripherer Nerven wurden in verletztes Rückenmarksgewebe von Tieren implantiert und regten die lokalen ZNS-Axone zum erneuten Auswachsen an (David & Aguayo, 1981). Gleichzeitig bewies dieses Experiment jedoch, welche Rolle lokale Faktoren für die Neuroregeneration spielen. Hatte man viele Jahre postuliert, dass die im Rahmen einer Schädigung auftretende Glianarbe eine rein physikalische Barriere darstellt, und so ein erneutes Aussprossen der Axone inhibiert, waren nun Inhibitoren im Sinne von wachstumshemmenden Molekülen zu diskutieren. So wurden im Lauf der Jahre unter anderem NOGO-A, OMgp oder MAG (*myelin-associated glycoprotein*), von Oligodendrozyten produzierte Wachstumsinhibitoren, identifiziert (Schnell & Schwab., 1990), und in zahlreichen Arbeiten konnte durch Ausschaltung dieser hemmenden Substanzen, z.B. durch Antikörper, eine regenerative Wirkung an Axonen des ZNS nachgewiesen werden. Auch in Astrozyten werden Inhibitoren axonalen Auswachsens exprimiert, unter anderem CSPGs (*chondroitin sulfate proteoglycans*), deren Expression nach ZNS-Läsion deutlich zunimmt (Davies et al., 1998). Somit ist durch zahlreiche Untersuchungen gezeigt worden, dass ein Potential der Regeneration auch im ZNS gegeben ist, sofern ein permissives Umgebungsmilieu geschaffen wird.

Neben diesen extrinsischen Faktoren besteht aber auch Milieu-unabhängig die Möglichkeit einer Modulation des Wachstumspotentials durch intrinsische Faktoren, so z.B. durch Induktion von zelleigenen Wachstumsgenen oder mittels aktivierter Enzyme, die Wachstum und gerichtetes Aussprossen von Neuronen steuern können. Diese intrinsischen Regulatoren sind jedoch bisher, auch mangels geeigneter Zellkulturmodelle, wenig erforscht worden.

1.1.1 Therapeutische Aspekte

Die Aufklärung der Apoptose-regulierenden und der regenerativen Mechanismen hat Konsequenzen für das Verständnis der Pathophysiologie vieler neurologischer Krankheiten. So könnte man die Entstehung von Autoimmunerkrankungen ebenso wie unkontrolliertes Tumorwachstum über eine verminderte Apoptoserate erklären, während eine gesteigerte Apoptose bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer (Wellington & Hayden, 2000) und M. Parkinson (Tatton et al., 2003) auftritt. Auch bei Gewebszerstörung, z.B. durch Ischämie oder traumatische ZNS-Läsionen, spielen neben nekrotischen Prozessen apoptotische Vorgänge eine Rolle.

Ein Ziel der Therapie bei degenerativen Erkrankungen ist eine Hemmung dieser gesteigerten Apoptose, somit ein Verhindern neuronalen Absterbens, und in zweiter Instanz eine Aktivierung der Regenerationsfähigkeit. Ein Ziel der experimentellen Forschung ist es somit, Wege zu finden, die ein therapeutisches Eingreifen auf molekularer Ebene zur Regulierung von Apoptose und Neuroregeneration ermöglichen. Mehrere Ansätze wurden diesbezüglich schon unternommen. Am Auge konnte das Einbringen des Neurotrophins GDNF den sekundären Zelltod von RGZ nach Läsion des optischen Nerven reduzieren (Klöcker et al., 1997). Durch die kurze Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren stellt diese Form der Neuroprotektion keinen optimalen klinischen Ansatz dar. Mit der Entwicklung viraler Vektoren als Applikationsmediatoren zum Zwecke des gezielten Gentransfers eröffneten sich Anfang der neunziger Jahre neue Perspektiven auf molekularer Ebene. Gezielte Genexpression neuroprotektiver Faktoren, z.B. mittels adenoviraler Vektoren, ermöglicht einen Schutz vor fortschreitendem apoptotischem Zelltod. Speziell an der geschädigten Retina führte die Überexpression von Neurotrophinen wie BDNF, GDNF und CNTF oder die Expression von Caspaseinhibitoren wie CrmA und XIAP zu einer Reduktion der Ganglienzelldegeneration (Isenmann et al., 1998; Kügler et al., 1999; Isenmann et al., 1999; Straten et al., 2002).

Nach der Reduktion der Degeneration ist die axonale Regeneration von Nervenzellen eine weitere Voraussetzung für eine funktionelle Erholung. Ein

bekanntes Zielmolekül auf diesem Gebiet ist das auf Oligodendrozyten exprimierte Nogo, ein Inhibitor neuronalen Wachstums, dessen antagonistisches Peptid NEP 1-40 das axonale Wachstum von kortikospinalen Neuronen deutlich verstärkte (GrandPre et al., 2002). Allerdings konnte dieses neuronale Auswachsen nur in jungen Tieren induziert werden, wohingegen es in adulten Tieren durch Inhibition von Nogo zu keiner signifikanten Regeneration kam (Teng et al., 2004). Ebenso konnte durch Antikörper gegen Myelin-assoziierte Wachstumsinhibitoren im ZNS ein axonales Auswachsen in geschädigten Nervenbahnen induziert werden (Schnell & Schwab, 1990). Die Expression von Wachstums-assoziierten Proteinen konnte an der Retina durch BDNF-Applikation verstärkt werden, führte jedoch zu keiner Verbesserung einer axonalen Regeneration über eine längere Strecke (Klöcker et al., 2000; Klöcker et al., 2001). Außerdem erfordert das Einbringen von Wachstums-induzierenden oder Wachstums-Faktor-stimulierenden Faktoren meist ein Vehikel in Form eines viralen Vektors. Hierdurch kann es zu Immunreaktionen, Problemen bezüglich der Spezifität der Fremdgenexpression, bei Genom-integrierenden Vektorsystemen zu Insertionsmutagenese sowie zu Vektorreplikation und Rekombination bei aufwendigen Viruspräparationen kommen, und die potentiell mit Gentransfer verbundene Risiken schränken den klinischen Einsatz dieser Vektoren ein.

Hieraus resultiert die Notwendigkeit zur Entwicklung optimierter Strategien, die effektive Neuroprotektion unter Kriterien höchster Sicherheit gewährleisten. Das Ziel wäre es, ein systemisch verabreichbares (und somit wenig invasives), lokal wirksames und systemisch nebenwirkungsarmes Agens zu identifizieren, das nicht nur neuroprotektiv ist, sondern zusätzlich noch regenerationsfördernd auf Nervenzellen wirkt.

1.1.2 Ansatz der vorliegenden Untersuchung

Hier wurde der Einfluß des hämatopoietischen Faktors Erythropoietin (EPO) auf das Überleben und das regenerative Potential neuronaler Zellen nach Applikation *in vivo* und *in vitro* untersucht. Als Grundlage diente ein

Zellkulturmodell für retinales Gewebe (Kretz et al., 2004a), anhand dessen bereits Zellrettung und Regeneration für das Genprodukt Bcl-X_L untersucht worden waren (Kretz et al., 2004b). In Weiterführung hierdurch gewonnener Erkenntnisse wurden mögliche Signalkaskaden, die Impulse für Überleben und Wachstum triggern könnten, untersucht.

Die Versuchsmodelle sind hierfür in der Arbeitsgruppe bereits länger etabliert und bestens charakterisiert (Isenmann et al., 1997; Straten et al., 2002; Isenmann et al., 2003; Kretz et al., 2004a). Der ON bietet sich als Bestandteil des ZNS für ein Traumamodell insbesondere durch seine leicht zugängliche Lage an; außerdem können nach Schädigung überlebende RGZ präzise quantifiziert und somit auch gradueller Zelltod erfasst werden. Die Schädigung des ON erfolgte durch intraorbitale Durchtrennung des ON („Axotomie“). Bei diesen Tieren erfolgte die Therapie im Anschluß durch Vektorapplikation. Eine zweite Art der Läsion stellte die mechanische Crush-Läsion dar. Derart geschädigte ON wurden nachfolgend durch intravitreale Zytokinapplikation behandelt.

Ziel war es, im ZNS zu untersuchen, ob EPO nicht nur protektiv auf geschädigte Neurone wirkt, sondern auch einen regenerativen Effekt ausübt, und dies nach Applikation zu Zeitpunkten, die weit nach dem der eigentlichen traumatischen Läsion liegen, da eine Latenz zwischen Schädigung und Therapie der klinischen Wirklichkeit entspricht; diese Ergebnisse sollten dann denen für Bcl-X_L gegenübergestellt werden.

1.2 Erythropoietin (EPO) im adulten ZNS

Das hämatopoietische Zytokin Erythropoietin (EPO), ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kD besteht aus 165 Aminosäuren und 4 Kohlenhydratketten. Es ist in erster Linie bekannt als primär regulierendes Hormon der Hypoxie-induzierten Erythropoiese, mit dem Ziel vermehrter Produktion Sauerstoff-transportierender roter Blutkörperchen nach Sauerstoffmangel. Seit seiner Klonierung 1985 wird es in klinischer Anwendung erfolgreich bei Anämien eingesetzt, so zum Beispiel bei chronischem

Nierenleiden, HIV-assoziiertes Anämie, oder Tumoranämien (Eckardt, 2001) sowie nach therapeutischer Myelosuppression. Lange Zeit wurde angenommen, daß EPO zur Adaptation an ein hypoxisches Milieu ausschließlich in der adulten Niere bzw. der fetalen Leber produziert wird (Ebert & Bunn, 1999). Molekular kann dies z.B. durch Dimerisierung von HIF-1 α mit ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), durch Induktion über den EPO-Gen-Enhancer Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) und dessen Bindung an den EPO-Promoter, erfolgen.

Als 1992 der Nachweis erbracht wurde, daß EPO nicht nur in Niere und Leber, sondern auch in weiteren Organen (Gehirn, Hoden und Milz) vorkommt (Tan et al., 1992), warf dieses ganz neue Überlegungen auf. Sowohl im Gehirn als auch im Hoden existiert eine physiologische Barriere zwischen Blut und Gewebe. Wenn nun EPO mRNA lokal produziert wird, läßt das auf eine spezifische physiologische Funktion direkt vor Ort schließen, was wiederum ein Interesse an der Rolle von EPO als Zytokin im Gehirn aufkommen läßt. Im Anschluß an diese Entdeckung folgten genauere Untersuchungen zu EPO-Bindungsstellen im Gehirn (Digicaylioglu et al., 1995), und EPO mRNA konnte nach Biopsie auch aus humanem Kortex und Hippocampus isoliert werden (Marti et al., 1996). Genauere Analysen der einzelnen Zelltypen ergaben schließlich, daß EPO im Gehirn vor allem von Astrozyten produziert wird, nicht aber von Mikroglia (Marti et al., 1996).

Analog zum hämatopoietischen System, in dem EPO nur nach Bindung an einen spezifischen EPO-Rezeptor (EPO-R) wirkt, wurde auch im ZNS nach einem entsprechenden Rezeptor gesucht. In neuronalen Zelllinien konnte ein 66 kD großer EPO-R nachgewiesen werden (Masuda et al., 1993), und die korrespondierende mRNA in hippokampalen und kortikalen Neuronenkulturen detektiert werden (Morishita et al., 1997). Dieser EPO-R gehört zur Zytokinrezeptorfamilie (Ihle, 1995) und wird nach Homodimerisierung aktiviert. In kapillären Endothelzellen des Gehirns entdeckte man weiterhin, daß im ZNS sogar zwei verschiedene Formen des EPO-R exprimiert werden, eine gewebständige und eine lösliche Form (Yamaji et al., 1996). Interessanterweise stellte sich heraus, daß in der Retina - im Gegensatz zum

Gehirn, wo EPO von Astrozyten und EPO-R von Neuronen produziert wird - EPO auch von Neuronen gebildet wird. EPO-R wurde darüber hinaus auch auf Müllerzellen nachgewiesen, die in der Retina zum Teil Astrozytenfunktionen übernehmen (Junk et al., 2002).

Erste Untersuchungen zur Rolle von EPO im ZNS konzentrierten sich auf ischämische Hirnschäden, was in Anbetracht der bekannten systemischen Funktion des Zytokins naheliegend erscheint. In ersten Tiermodellen wurde jeweils mindestens 8 Stunden vor Induktion einer Ischämie intraventrikulär EPO injiziert. Es zeigte sich, daß dadurch das Ausmaß der ischämischen Infarzierung deutlich verringert werden konnte (Marti et al., 2000). Darüber hinaus erwies sich EPO als neuroprotektiv in verschiedenen anderen Läsionsmodellen: So konnte schon relativ früh ein EPO-vermittelter protektiver Effekt auf kultivierte Neurone gegen Glutamatoxizität nachgewiesen werden (Morishita et al., 1997), später fanden sich neuroprotektive Wirkungen auch in Modellen von mechanischen Traumata (Brines et al., 2000) in Gehirn und im Rückenmark, in neuroinflammatorischen sowie neurodegenerativen Tiermodellen für ED (encephalomyelitis disseminata) und M. Parkinson (Genc et al., 2001). Zudem ließen sich anti-apoptotische Mechanismen gegen Ca^{2+} -vermittelte Transmitterfreisetzung und oxidativen Streß nachweisen (Sakanaka et al., 1998). Durch den Einsatz von löslichem anti-EPO-R konnte gezeigt werden, daß die protektiven Effekte tatsächlich EPO-vermittelt sind, wurden doch sämtliche anti-apoptotischen Mechanismen durch das Abfangen von EPO mittels löslichem EPO-R oder durch anti-EPO-Antikörper inhibiert (Junk et al., 2002).

Ein größeres Hindernis stellte jedoch anfangs die invasive Methode der Zytokinapplikation intraventrikulär dar, da angenommen wurde, daß systemisch appliziertes EPO aufgrund seiner durch Glykosylierung bedingten Größe nicht in der Lage ist, die intakte Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu passieren, sondern nur im Falle einer Dysfunktion derselben eventuell auch EPO-R im ZNS zu erreichen vermag (Marti et al., 1997). Allerdings hatten Experimente zuvor schon gezeigt, daß auch größere Moleküle wie IGF-1 und -2, Leptin oder Transferrin über spezifische Rezeptoren und Transzytose an Kapillaren die

Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Duffy et al., 1988). Letzlich brachte eine gezielte Untersuchung von Brines et al. den Nachweis, daß intraperitoneal (i.p.) verabreichtes biotinyliertes rekombinantes humanes Erythropoietin (rhu-EPO) über kapillär lokalisierte EPO-R auch die intakte BHS passiert und in Richtung von Neuronen ins Hirnparenchym transportiert wird (Brines et al., 2000). Zusätzlich zeigte diese Arbeit, daß auch Zytokinapplikation bis 3h *nach* Ischämie-Induktion noch protektive Effekte erbringen kann. Diese beiden Befunde erweiterten das potenzielle Spektrum des klinischen Einsatzes von EPO.

Offen blieb lange Zeit jedoch die Frage nach einem möglichen neuroregenerativen Potential für EPO. Erste Versuche auf diesem Gebiet führte eine Arbeitsgruppe in Kiel durch, die den regenerativen Effekt von EPO und VEGF auf in Kultur genommene RGZ von axotomierten postnatalen (P11) Ratten untersuchte (Böcker-Meffert et al., 2002). Darin zeigte sich, daß EPO-applikation *in vitro* nach 3 Tagen in Kultur ein Neuritenwachstum induzieren kann, und somit auch gewisse regenerative Wirkungen auf geschädigte Nervenzellen ausübt. Für adulte Neurone hingegen liegen keine Untersuchungen vor, und nach vorherrschender Meinung gelten adulte Nervenzellen als kaum regenerationsfähig (Ramon y Cajal, 1928). Vom klinischen Aspekt her wäre jedoch genau das interessant: Neuroregeneration in adulten Nervenzellen. Bisher sind die intrinsischen Prozesse bei axonaler Regeneration im ZNS *in vivo* kaum untersucht, was auch an den erschwerten Bedingung hierfür, u.a. durch die bestehende Gliabarriere, liegen mag. In unserer Arbeitsgruppe wurde hierfür erst kürzlich ein standardisiertes Modell entwickelt (Kretz et al., 2004a), das es ermöglicht, die intrinsische Regenerationskapazität adulter ZNS-Neurone in Abwesenheit von Oligodendrozyten und Astroglie zu untersuchen.

1.3 Wege der Signaltransduktion

Signalwege, über die anti-apoptotische oder regenerative Impulse von EPO geleitet werden, sind noch nicht eindeutig bestimmt. Für MAPK (mitogen-activated protein kinase) wurde eine gesteigerte Aktivität nach EPO-Stimulation in PC 12 Zellen (Phäochromozytomzellen) der Ratte nachgewiesen (Koshimura et al., 1999); eine neuere Arbeit zeigt in RGZ eine verminderte Degeneration der geschädigten Zellen nach EPO-Gabe, ebenfalls über den MAPK-Signalweg gesteuert (Kilic et al., 2005). Andere Studien zeigten eine durch Tyrosinphosphorylierung induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (signal transducer and activator of transcription) nach Verbindung von EPO-R mit JAK2, einem Mitglied der Janus-Proteinkinasen. Eine darauf folgende Hochregulierung des anti-apoptotischen Bcl-X_L durch STAT5 konnte in hämatopoietischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Silva et al., 1999). Darüber hinaus wurden auch STAT- und MAPK- unabhängige Wege der EPO-vermittelten Neuroprotektion postuliert, die unter anderem eine Beteiligung von PI3K (phosphoinositide-3 kinase) nahe legen, unabhängig von Bcl-X_L (Ruscher et al., 2002; Weishaupt et al., 2004). Korrelierend mit der unbekanntem Wirkung von EPO auf die Axonregeneration im adulten ZNS, sind Schritte der Signaltransduktion unter EPO-vermittelter Regeneration bisher kaum untersucht.

1.3.1 MAPK-Signalweg

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind im Verlauf der Evolution konservierte Enzyme, welche Signale von Oberflächenrezeptoren der Zelle mit deren regulatorischen Zielstrukturen im Zellinneren verbinden. Die MAPK-*superfamily* gliedert sich in drei Untergruppen, die kaskadenartig hintereinandergeschaltet sind: die der MAPK kinase kinase (MAPKKK oder MEKK), die der MAPK kinase (MAPKK oder MEK) und MAPK selbst, die die anderen Gruppen über Phosphorylierung reguliert (Chang & Karin, 2001). Aus diesen Untergruppen entstehen verschiedene Signalwege zur Weiterleitung

extrazellulärer Stimuli: die p42/44 MAPK Kaskade (oder auch *extracellular signal-regulated kinase*, ERK-1/2), die vornehmlich das Zellwachstum und die Ausdifferenzierung reguliert; im Gegenzug dazu die p38 Kaskade und die *c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase* (JNK/SAPK) Kaskade, welche in Antwort auf Streßstimuli aktiviert werden und mit Apoptose-Induktion verknüpft sind (Chang & Karin, 2001).

In Säugern spielen die MAPK-Signalwege eine bedeutende Rolle für die Regulierung wichtiger zellulärer Prozesse wie Genexpression, Zellproliferation, Zellüberleben und Zelluntergang. P38 MAPK wurde als ein Mediator der Chemotaxis in Leukozyten identifiziert (Cara et al., 2001); für hämatopoietische Zelllinien ist eine essentielle Rolle des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges zur Regulation von Proliferation und Apoptose-Schutz durch Zytokine, unter anderem EPO, bereits mehrfach beschrieben worden (Hoyle et al., 2000). Für das ZNS im Speziellen konnte gezeigt werden, daß Mitglieder der MAPK-Familie im embryonalen/postnatalen Nervensystem stark vertreten sind, und dort u.a. die über Tyrosinkinase-Rezeptoren-vermittelte Zelldifferenzierung regulieren (Biggs et al., 1994), anti-apoptotische Signale vermitteln (Lallemend et al., 2003) oder über p42/44 das Auswachsen von Neuriten in einem Modell an embryonalen retinalen Zellen im Huhn induzieren (Perron & Bixby, 1999). Auch im adulten Gehirn ist eine Funktion der MAPK-Signalwege zur Regulation der Folgen neuronaler Schädigungen, z.B. zerebraler Ischämien (Jiang et al., 2003), degenerativer Erkrankungen wie M. Alzheimer oder progressiver supranukleärer Paralyse (Ferrer et al., 2001), oder nach traumatischer Hirnläsion (Dash et al., 2002) nachgewiesen worden.

Die MAPK wurde ursprünglich beschrieben als eine 42 kD Insulin-stimulierbare Protein Kinase (ERK2), die das zytoskeletale Protein MAP-2 phosphoryliert (Ray & Sturgill, 1987); fünf Jahre später fand man eine zusätzliche 44 kD Isoform, die ERK1 genannt wurde (Boulton & Cobb, 1991). Weitere Studien im Laufe der Jahre brachten Klarheit über die Induktions- und Regulationsmechanismen dieser p44/42-Signalkaskade. So ist nun bekannt, daß die MAPKs über Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten durch MEK bzw MEKK aktiviert werden (Wu et al., 1992); neuere Untersuchungen

ergaben, daß auch andere Enzyme, z.B. RIP2, eine mit dem TNF-Rezeptor-Komplex assoziierte Serin-Threonin-Kinase, den p44/42 MAPK-Signalweg aktivieren können (Navas et al., 1999). Die MEKKs wiederum werden über Phosphorylierung durch Mitglieder der Raf-Familie, Serin-Threonin-Proteinkinasen, aktiviert, die als MAPK-kinase-kinase (MAPKKK) wirken; dazu gehören Raf-1, A-Raf und B-Raf (Bosch et al., 1997), deren N-terminales Ende, z.B. nach Stimulation von Plasma-Membran-Rezeptoren durch diverse Wachstumsfaktoren, mit dem Proto-Onkogen *Ras* in der Plasma-Membran interagiert (Marais et al., 1997). Bemerkenswerterweise hat eine p44/42-MAPK-Aktivierung aber nicht immer einen anti-apoptotischen Effekt zur Folge. In den meisten Fällen ist unter MAPK-Aktivierung eine Anhebung des Schwellenwertes für Apoptose und somit eine verminderte Zelltodrate beobachtet worden. Diese wird zum Teil über Phosphorylierung von p90 *ribosomal protein S6 kinase* (RSK) und konsekutiver Phosphorylierung von Bad, einem pro-apoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie, welcher in phosphoryliertem Zustand nicht mehr zum Mitochondrion translozieren und pro-apoptotische Heterodimere mit Bcl-X_L bilden kann, vermittelt (Bonni et al., 1999). Andererseits wurde in anderen Modellen beschrieben, daß eine Inhibition von MEK, dem *upstream*-Mediator von p44/42-MAPK, zu einer Apoptose-Reduktion in SK-N-SH-Zellen führt, also eine ursprünglich pro-apoptotische Signalvermittlung über die Inhibition von MAPK verhindert wurde (Guise et al., 2001). Darüber hinaus wurden Modelle beschrieben, in denen durch eine Blockade des MAPK-Signalweges kein Effekt auf den programmierten Zelltod ausgeübt werden konnte (Kim et al., 2001). Am Beispiel der traumatischen Hirnläsion mit konsekutivem Anstieg der MAPK-Phosphorylierung zeigte sich darüber hinaus, daß eine Hemmung der p44/42-Kaskade, wenn auch ohne wesentlichen Einfluß auf das Überleben neuronaler Zellen, eine Änderung der Zellmorphologie bewirkt, und daß die Ausprägung klinischer Symptome wie retrograde Amnesie, Hippokampus-vermittelte Gedächtnisleistungen und motorische Defizite durch MAPK-Inhibitoren aggraviert werden kann (Dash et al., 2002).

Somit rückt bei der Suche nach Mediatoren sowohl der Anti-Apoptose wie auch der neuronalen Differenzierung die p44/42-Signalkaskade am stärksten in den

Fokus; zusätzlich von Interesse wäre die Untersuchung einer Beteiligung weiterer Bcl-2-Familienmitglieder, wie gerade die des anti-apoptotischen Bcl-X_L, die neben dem bekannterweise involvierten Bad möglicherweise von MAPK angesteuerte downstream-Effektoren in der Vermittlung Zelltod-regulierender Signale darstellen könnten.

1.3.2 Jak/STAT-Signalweg

Die Janus kinase/*signal transducer and activator of transcription* (Jak/STAT)-Kaskade ist ein Signalweg zur Weiterleitung extrazellulärer Informationen über Transmembranrezeptoren direkt zu den Zielpromotoren im Zellkern, und zur Regulierung der Transkription ohne Zuhilfenahme eines *second messengers*. Von den STAT-Proteinen sind in Säugern sieben Gene bekannt: *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT4*, *STAT5A*, *STAT5B* und *STAT6*, die sich durch ihre Aminosäuresequenz und ihr gewebespezifisches Vorkommen unterscheiden und unterschiedliche Funktionen haben (Schindler & Darnell, 1995). Die STAT-Proteine liegen ohne spezifische Rezeptor-Stimulation im Zytoplasma in inaktiver Form vor. Nach Rezeptor-Ligand-Bindung werden die STATs durch spezifische Bindung zwischen den STAT Src-Homologie-2 (SH2) Domänen und Phosphotyrosinresten des Rezeptors an die intrazelluläre Rezeptordomäne rekrutiert, ein wichtiger Schritt in der STAT-Aktivierung. Im Gegensatz zu Rezeptoren für Wachstumsfaktoren besitzen die meisten STAT-aktivierenden Zytokinrezeptoren keine Tyrosinkinaseaktivität. Diese wird stattdessen von rezeptorassoziierten, zytoplasmatischen Proteinen der Familie der Janus Kinasen (JAK) geliefert (Leonard, 2001). In Säugern existieren 4 verschiedene JAK-Proteine, JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2. Diese binden spezifisch an intrazelluläre Domänen von Zytokinrezeptoren und katalysieren dadurch eine Autophosphorylierung wie auch eine Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste am Rezeptor, woraus eine Homo- oder Heterodimerisierung der STATs resultiert. Diese STAT-Dimere werden dann vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert und können dort an die DNA binden, wodurch sie an ihrem Zielpromoter die Transkriptionsrate stark erhöhen können. Nur in wenigen

Fällen wurden Beispiele beschrieben, in denen STATs die Transkription an ihrem Zielpromoter inhibieren (Ivanov et al., 2001). Gesichert scheint hingegen, daß STATs im Rahmen eines komplexeren Regulationssystems zu sehen sind; so werden sie von verschiedenen Proteinkinasen, wie z.B. den MAPKs, an Serinresten phosphoryliert, wodurch über weitere Signalwege der Zelle die Reaktion auf den Ursprungsstimulus potenziert werden kann (Decker & Kovarik, 2000). Eine Hemmung des JAK/STAT-Signalweges wird allgemein über Rezeptorabbau in endozytischen Vesikeln oder spezifischer über die Dephosphorylierung der STAT-Dimere im Nukleus erreicht (Myers et al., 2001). Alternativ können sogenannte „*protein inhibitors of activated STATs*“, (PIAS), an phosphorylierte STAT Dimere binden und dadurch das Andocken an die DNA verhindern (Shuai, 2000). Die JAKs haben eigene Inhibitoren, die *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) Proteine, die im Sinne eines klassischen Feedback-Mechanismus von denselben Zytokinen aktiviert werden, die auch die STATs aktivieren (Krebs & Hilton, 2001).

Unterteilt werden die STAT-Signalwege in drei Gruppen: den Typ I Interferonweg (IFN α/β), der über STAT1 und STAT2 vermittelt; der Typ II IFN (IFN γ) Signalweg, der klassischerweise über Homodimerisierung von STAT1 vermittelt; drittens der STAT3 Signalweg, der durch verschiedene Zytokine oder Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann, häufig bei hämatologischen Tumoren induziert wird, und bekannt ist für anti-apoptotische und wachstumsfördernde Effekte (Akira, 2000).

Genauere Untersuchungen der verschiedenen STATs ergaben für STAT2, STAT4 und STAT6 nur eine eingeschränkte Rolle in der Zellaktion. Im Gegensatz dazu werden STAT1, STAT3 und STAT5 von einer großen Anzahl verschiedener Liganden aktiviert, weshalb sie zur Untersuchung der Zellregulation in Bezug auf Proliferation und Überleben von größerem Interesse sind.

STAT1 scheint in erster Linie für Wachstumsinhibition und Apoptose verantwortlich zu sein. Versuche mit STAT1 *knock-out*-Mäusen ergaben, daß diese Tiere keine adäquate Abwehr gegen virale und bakterielle Erreger haben – die Interferonsignalkaskade, die über STAT1 läuft, ist gestört (Meraz et al.,

1996). Interessanterweise stellte sich im weiteren heraus, daß STAT1-defiziente Mäuse viel eher Tumoren entwickeln (Kaplan et al., 1998). Diese mangelnde Tumorkontrolle mag u.a. dadurch zu erklären sein, daß Wachstumsstop und Apoptose von STAT1 nicht mehr vermittelt werden können.

STAT5 fördert das Zellwachstum nach Aktivierung durch diverse Zytokine, wobei neben Interleukinen und Wachstumshormonen auch hämatopoietische Faktoren wie Erythropoietin Signalaktivatoren sein können (Quelle et al., 1996). STAT3 ist ebenfalls ubiquitär in vielen Geweben vertreten und wird ebenso von verschiedenen Liganden aktiviert, insbesondere von EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) und auch CNTF (ciliary neurotrophic factor) (Kirsch et al., 2003). Auch für STAT3 wurde eine Rolle in der Tumorgenese postuliert, da in vielen Tumorzelllinien der Grad an phosphoryliertem, also aktivem STAT3-Protein stark und dauerhaft erhöht ist, im Gegensatz zu normalen Zellen, in denen die STAT-Phosphorylierung nur einen vorübergehenden Zustand darstellt (Weber-Nordt et al., 1996). Übereinstimmend zeigte sich in *knock-out*-Versuchen eine Letalität von *stat³*-Mäusen schon im frühen Embryonalstadium, bedingt durch ein vermindertes Zellwachstum der Trophoblasten, was ebenfalls für eine wichtige Rolle von STAT3 bei der Zellproliferation spricht (Takeda et al., 1997).

Da mit CNTF als Ligand an STAT3-aktivierenden Rezeptoren ein Wegweiser in das Nervensystem gegeben war, wurde die Funktion von STAT3 im ZNS genauer untersucht: STAT3 als Mediator der Zellrettung wird nicht nur nach Behandlung primärer ZNS-Kulturen mit antiapoptotischem CNTF aktiviert (Rajan et al., 1996), sondern auch direkt nach Kortexläsion adulter Ratten in reaktiven Astrozyten. Außerdem wurde eine Aktivierung auch in auswachsenden Axonen (Xia et al., 2002) beobachtet. Auch in der Retina bewirkten intravitreale CNTF-Injektionen ebenso wie mechanische Traumata einen Anstieg des Levels an phosphoryliertem STAT3 in Ganglienzellen und in Müller Glia Zellen im Sinne einer anti-apoptotischen Regulierung (Peterson et al., 2000). Insgesamt erscheint STAT3 als das wesentliche STAT-Familienmitglied zur Übertragung neuroprotektiver Signale im Nervensystem.

1.3.3 PI3K-Signalweg

Für den Phospho-Inositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg wurde eine Funktion als Mediator anti-apoptotischer Signale zum ersten Mal 1995 diskutiert, als in einer Studie von Yao und Cooper gezeigt werden konnte, daß in PC12 Zellen durch Inhibition von PI3K NGF-vermitteltes Zellüberleben aufgehoben wird (Yao & Cooper, 1995). PI3K ist ein Enzym mit 4 bekannten Unterformen (α , β , γ , δ), die über Phosphorylierung von Membranproteinen *second messengers* generieren, und so über intrazelluläre Kaskaden diverse Prozesse wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Überleben, in der Zelle regulieren. Rekrutiert wird die PI3K zum einen durch Liganden-vermittelte Transmembranrezeptor-Aktivierung wie den *Insulin-like growth factor I* Rezeptor oder Integrine (Clark und Brugge, 1995), aber auch direkt nach Interaktion mit dem Ras-Protoonkogen (Rodriguez-Viciano et al., 1994); andererseits kann Akt, ein zentraler *Downstreameffektor* der PI3K, über Phosphorylierung Raf-1 inaktivieren, und so den MAPK-Signalweg hemmen (Rommel et al., 1999). Es besteht also in jedem Fall eine Verbindung zwischen dem MAPK-Signalweg und dem PI3K/Akt Signalweg. An der Plasmamembran katalysiert PI3K dann den Transfer von Phosphat an in der Membran lokalisierten Phosphoinositide; diese Lipide wirken dann als Mediatoren in Signalkaskaden der Zelle. Im Laufe der Zeit konnte die wichtige Funktion von PI3K bei der Vermittlung Wachstumsfaktor-vermittelten Zellüberlebens noch in diversen anderen Zellreihen demonstriert werden, so z.B. in hämatopoietischen Zellen oder Neuronen (Scheid et al., 1995). Ebenso fördert PI3K das Zellüberleben auch dann, wenn keine externen anti-apoptotischen Stimuli vorhanden sind, oder wenn die Zelle toxischen Einflüssen ausgesetzt ist (Kulik et al., 1997; Crowder & Freeman, 1998). Zusätzliche Belege für ein anti-apoptotisches Wirken von PI3K-Signalwegen wurden im Zusammenhang mit dem PTEN *tumor suppressor* erbracht; PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) ist eine Lipidphosphatase, die PI3K-generierte Phosphatidylinositide dephosphoryliert (Myers et al., 1998). *PTEN*^{-/-} Mäuse zeigen erhöhte Werte für 3'phosphorylierte Phospholipide, und sterben noch embryonal mangels Apoptoseinduktion (Stambolic et al., 1998), was eine

bedeutende Funktion der PI3K bei der Vermittlung zellrettender Signale bestätigt.

PI3K vermittelt Signale an diverse apoptose-inhibierende molekulare Zielstrukturen in der Zelle weiter, so z.B. verschiedene Tyrosinkinasen und Serin/Threonin-Proteinkinasen, darunter c-Akt (Rameh & Cantley, 1999). Akt-Proteine enthalten eine zentrale Kinase-Domäne, die spezifisch Serin- oder Threoninreste erkennt (Bellacosa et al., 1991), ebenso wie eine *pleckstrin homology (PH) domain* am Amino-Ende, an der PI3K-generierte Phospholipide direkt binden, und somit die Translokation von Akt aus dem Zytoplasma in die innere Plasmamembran bewirken (Burgering & Coffey, 1995). Dadurch gelangt Akt in die Reichweite von Kinasen, die wiederum Akt selbst phosphorylieren und aktivieren (Kohn et al., 1996).

Einer der Wege, über den PI3K/Akt-Aktivierung anti-apoptotisch wirkt, ist die Inaktivierung von Bad, einem pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie, über dessen Phosphorylierung. Bad interagiert direkt mit anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern, wie dem Bcl-X_L, indem es bei Überexpression in dephosphoryliertem Zustand mit diesen assoziiert und heterodimere Komplexe bildet, was Zelltod bewirkt (Ottillie et al., 1997). Akt kann Bad an Ser-136 phosphorylieren, dadurch eine Dissoziation von Bad und Bcl-X_L bewirken, und so die Inaktivierung von Bad über 14-3-3-Proteine bewirken, also anti-apoptotisch in die Zellregulierung eingreifen (Muslin et al., 1996). Da andere Studien jedoch ergeben haben, daß zur Zellrettung nicht immer eine Akt-vermittelte Phosphorylierung von Bad vorliegen muß (Campos et al., 2003), kann man auch andere Wege der Zellrettung über PI3K/Akt diskutieren. Eventuell spielen auch andere Mitglieder der Bcl-2 Familie eine Rolle bei der Umsetzung PI3K-vermittelter anti-apoptotischer Signale.

In der Retina ist der PI3K/Akt-Signalweg als Mediatorkaskade neuroprotektiver Effekte bereits beschrieben worden (Nakazawa et al., 2003) – eine genauere Identifizierung der molekularen Zielstrukturen, über die sie vermittelt werden, ist jedoch hier noch nicht erfolgt.

1.4 Bcl-X_L im adulten ZNS

Mit der Entdeckung des Bcl-2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2*) (Tsujimoto et al., 1985) wurde eine neue Gruppe von Onkogenen gefunden, die nicht nur für proliferative Funktionen zuständig ist, sondern ebenso zum Schutz vor programmiertem Zelltod. Bcl-2 wurde auf der Basis von Versuchen zu B-Zell-Leukämien zum ersten Mal beschrieben; in 85% der untersuchten Patienten fand man eine Aktivierung des *bcl*-Genes nach t(14;18) Chromosomentranslokation bei Non-Hodgkin-Lymphom-Erkrankungen (Tsujimoto et al., 1985). Es zeigte sich, daß Bcl-2 das Zellüberleben fördert, indem es die Resistenz der Zelle gegenüber pro-apoptotischen Einflüssen, wie Entzug von Wachstumsfaktoren, γ -Strahlung oder zytotoxischen Lymphokinen wie den TNF (*tumor necrosis factor*), steigert (Nunez et al., 1990). Bcl-2 und Bcl-X_L sind Homologe von CED-9, einem Apoptose-inhibierenden Regulator aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Steller, 1995). Inzwischen sind noch weitere Mitglieder der Bcl-2-Familie im Säuger, sowie virale Homologe, identifiziert worden, von denen ein Teil pro-apoptotisch, der andere anti-apoptotisch wirkt. Zu den wichtigsten Vertretern der anti-apoptotischen Gruppe zählen Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w; bei der Gruppe der pro-apoptotischen Proteine sind insbesondere Bax, Bcl-X_S und Bad zu nennen (Boise et al., 1993; Oltvai et al., 1993). Die Bcl-2-Homologe unterscheiden bzw. ähneln sich vor allem in ihren BH (*Bcl-2 homology*) Domänen; allen gemein ist die BH3 Domäne, wohingegen die BH4 Domäne am N-Terminus von ausschließlich anti-apoptotischen Bcl-Proteinen vorgefunden wird. Durch diese Sequenzhomologie können Bcl-Proteine Homo- oder Heterodimere bilden und dadurch – abhängig von der relativen Menge der Proteine – eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung pro- bzw. anti-Apoptose in der Zelle bewirken (Korsmeyer et al., 1993). Bcl-2, Bcl-X_L und Bax sind an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Krajewski et al., 1993; Zha et al., 1996), sowie zum Teil auch an der Nukleushülle und dem endoplasmatischen Retikulum. Unter physiologischen Bedingungen können Bax und andere pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder Ionenkanäle bilden, insbesondere Cl⁻-Kanäle, wohingegen

die anti-apoptotischen Bcl-2 und Bcl-X_L bevorzugt K⁺-Kanäle bilden, und dies auch nur im sauren Milieu. Aus diesem Grund schlußfolgert man, daß unter physiologischen Bedingungen insbesondere die pro-apoptotischen Proteine die Zellaktivität regulieren, und Bcl-2 und Bcl-X_L diese dadurch antagonisieren können, daß sie Heterodimere mit ihnen bilden.

Bcl-X_L wirkt auch anti-apoptotisch über Bindung von Caspasen, eine Familie von hauptsächlich pro-apoptotischen Cysteinproteasen. Es bindet an Caspase-1, Caspase-8 direkt (Chinnaiyan et al., 1997), kann aber auch mit Apaf-1, dem zellulären Homologen von CED-4, und Caspase-9 einen Komplex, das sogenannte Apoptosom, bilden (Hu et al., 1998). Dadurch kann das Auslösen einer Caspase-9-vermittelten Apoptose-Kaskade, wie z.B. nach Ausschüttung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium, verhindert werden. Für die Funktion des Bcl-X_L scheint insbesondere dessen dreidimensionale Struktur wichtig zu sein (Muchmore et al., 1996). Es enthält zudem einen Abschnitt (*loop-region*), der in den pro-apoptotischen Bcl-Proteinen nicht zu finden ist und regulierend auf die anti-apoptotische Funktion des Bcl-X_L einwirkt (Chang et al., 1997).

Im Nervensystem wird Bcl-2 während der Embryonalentwicklung von vielen Neuronen stark exprimiert (LeBrun et al., 1993), im adulten ZNS jedoch nur gering (Merry et al., 1994). Zusätzlich zeigen Versuche an adulten Tieren, bei denen das *bcl-2*-Gen ausgeschaltet wurde, daß Bcl-2 für den Erhalt des gesunden ZNS nicht von Bedeutung ist (Boise et al., 1993). In der Retina ist der Erhalt der überlebenden RGZ nach Läsion des ON von Bcl-2 unabhängig (Dietz et al., 2001). Im Gegensatz dazu erscheint dem Bcl-X_L eine wichtige Rolle beim Erhalt neuronaler Lebensfähigkeit zuzukommen (Gonzalez-Garcia et al., 1995). Insbesondere unter hypoxischen Bedingungen wird es durch NF-κB (*nuclear factor κB*) hochreguliert (Glasgow et al., 2001), und diverse Ischämieversuche wiesen erhöhte Transkriptionsraten für Bcl-X_L auf (Isenmann et al., 1998; Wiessner et al., 1999). Insbesondere in der adulten Retina scheint ein Übergewicht an Bcl-X_L-Expression vorzuliegen, wobei Bcl-X_L nahezu 16x stärker als Bcl-2 exprimiert wird (Levin et al., 1997), weswegen sich die Untersuchungen im Gehirn wie auch insbesondere in der Retina, auf das vor allem in adulten Zellen exprimierte Bcl-X_L konzentrieren.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Verwendet wurden adulte, weibliche SD-Ratten (*Sprague-Dawley*, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von acht bis neun Wochen mit einem Körpergewicht zwischen 200 g und 250 g. Die Narkose erfolgte durch intraperitoneale Applikation einer 7 % Chloralhydratlösung (in PBS; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in einer Dosierung von 0,42 g/kg Körpergewicht. Zum Versuchsende wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Überdosis von 30 % Chloralhydrat getötet. Pro Versuchsreihe wurden für jede Grundbedingung mindestens 3 Tiere untersucht. Alle Tierversuche entsprachen den gesetzlichen Vorschriften und waren durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

2.1.1 Quetschläsion (crush) des optischen Nerven (ON)

Um eine definierte Läsion am optischen Nerven zu setzen, wurde das Tier narkotisiert, der Bulbus mit einer gebogenen Rundklemme (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) leicht luxiert, und der Sehnerv 2-3 mm hinter dem hinteren Augenpol mit derselben Klemme für 10 sec gequetscht. Anschließend wurde der Augenfundus gespiegelt, um die retinale Durchblutung zu kontrollieren. Tiere mit permanenter Ischämie wurden von den Versuchen ausgeschlossen. Die Explantation der Retinae erfolgte zwischen Tag 9-10 nach Läsion. Es wurden jeweils beide ON gecrusht.

2.1.2 Durchtrennung („Axotomie“) des optischen Nerven (ON) und retrograde Vektorapplikation

Zur offenen Durchtrennung des ON wurde nach Rasur des Schädels die Haut mit einem 1 cm langen mediosagittalen Schnitt auf Höhe der Orbita eröffnet. Das Dach der rechten Orbita wurde eröffnet und die Glandula lacrimalis

subtotal reseziert. Die oberen Augenmuskeln wurden mit einem Spreizer beiseitegehalten, der Bulbus leicht nach außen luxiert, und der N. opticus dargestellt. Zur Freilegung des Nerven wurde die umgebende Durascheide durch einen 2 mm langen Längsschnitt eröffnet; dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, die in der Durascheide in mehreren Ästen verlaufende A. centralis retinae nicht zu verletzen. Nach leichter Luxation des optischen Nerven mit einem kleinen Haken wurde dieser 2-3 mm nach Austritt aus dem Bulbus mit einer Mikroschere (FST) quer durchtrennt.

Zur Behandlung mit Ad.Syn.Bcl-X_L wurde ein Schwämmchen (Gel foam; Pharmacia & Upjohn AG, Dübendorf, Deutschland) in den Zwischenraum zwischen proximalem und distalem Nervenstumpf platziert, das mit 2 µl Vektorlösung getränkt worden war (Vektortiter $2,8 \times 10^7$ pfu/µl). Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Spreizer entfernt, die Wunde wurde vernäht und gesäubert; das virusgetränkte Gel foam wurde zwischen den Axonstümpfen *in situ* belassen. Auch hier wurde anschließend der Augenhintergrund funduskopiert, um eine Verletzung der A. centralis retinae mit nachfolgender Ischämie auszuschließen. Die retinale Explantation erfolgte ebenfalls zwischen Tag 9-10 nach Axotomie.

2.1.3 Intravitreale Zytokin-Injektion

Für die *in vivo*-Behandlung der Tiere mit Erythropoietin wurden direkt nach Crush-Läsion, sowie konsekutiv jeweils zu Tag 3, 6 und 9 nach Läsion, je 2 µl EPO (rhEPO; Recormon 1000 IE/300 µl; Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) in den Glaskörper injiziert. Dazu wurde der Bulbus distal des Limbus mit einer an eine 10 µl Hamilton-Spritze konnektierten, flexiblen 34 gauge Teflon-Nadel punktiert und die Zytokinlösung langsam injiziert. Die retinale Durchblutung wurde fundoskopisch kontrolliert. Eine Verletzung der Linse war zum Ausschluß einer Freisetzung bisher unbekannter neurotropher Substanzen aus Linsenkern und Linsenhülle sorgfältig vermieden worden (Leon et al., 2000). Kataraktentstehung wurde nicht beobachtet. Die retinale Explantation erfolgte zu Tag 10 nach crush.

2.1.4 Retrograde Markierung retinaler Ganglienzellen

Zur selektiven Markierung der retinalen Ganglienzellen (RGZ) wurden je 3,5 μ l des Fluoreszenzfarbstoffes Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3',-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat; Molecular Probes Inc., Oregon, USA) in einer Konzentration von 5 % in Dimethylformamid (DMF) stereotaktisch in beide Colliculi superiores injiziert. Dazu wurde nach Rasur der Schädeloberfläche die Haut mit einem 2 cm langen sagittalen Schnitt eröffnet und die Kalotte freigelegt. Nach einer Aufbohrung der Kalotte wurde die Injektion zu den Koordinaten [2.1 mm ventral der Lambdanaht / 1.5 mm lateral der Sagittalnaht / 3.5 mm Tiefe] stereotaktisch vorgenommen (Paxinos & Watson, 1998). Nach Beendigung des Eingriffes wurde die Wunde vernäht und gesäubert. Der Farbstoff wird retrograd durch axonalen Transport in die RGZ transportiert. Der Anteil der noch angefärbten Zellen nach Operation und Kultur im Medium entspricht der Anzahl der Zellen, die zum Untersuchungszeitpunkt noch vital sind. Phagozytierende Mikroglia, die ebenfalls markiert ist, kann morphologisch durch den ovalen Zellkörper, die Ramifikation sowie durch deren Lage in einer anderen Schicht als der Ganglienzellschicht diskriminiert werden (Isenmann et al., 1998; Schmeer et al., 2002; Straten et al., 2002).

Zur Bestimmung der Zellrettung unter Erythropoietinzugabe in Kultur wurde der rechte ON 3 Tage nach bilateraler Dil-Injektion läsioniert, das linke Auge diente als Kontrolle, d.h. zur Bestimmung der Anzahl der RGZ, die ohne Läsion in Kultur überleben. Nach Explantation zu Tag 10 nach Läsion und Kultivierung wurde einem Teil der Dil-markierten Retinae am dritten Tag in Kultur jeweils EPO in einer Konzentration von 1000 IE/ml zum Medium zugegeben. Eine gleiche Anzahl an markierten und läsionierten Retinae wurden als läsionierte Kontrollen in EPO-freiem Medium kultiviert. Nicht-läsionierte Dil-markierte Kontrollen erhielten ebenfalls keinen EPO-Zusatz zum Medium.

Zur Bestimmung der Zellrettung nach Ad-Bcl-X_L-Behandlung wurden die Tiere 3 Tage nach bilateraler Dil-Injektion rechtsseitig axotomiert; das linke Auge wurde als nicht-axotomierte Kontrolle verwendet, ebenfalls zur Bestimmung der

Anzahl der unläsionierten RGZ, die in Kultur überleben. Die Explantation der Retinae erfolgte zum Tag 10 nach Axotomie. Die Kultivierung der retinalen Streifen erfolgte ohne weitere Zugabe von EPO zum Medium.

2.1.5 Explantation und Kultivierung retinalen Gewebes

Die Retinae wurden zu Tag 9-10 explantiert und in speziellem, Wachstumsfaktor-freiem S-MEM Medium (Bio West, Nuaille, Frankreich; s. Tabelle Anhang 1) unter Zugabe von 10 % FCS (Fetal Calf Serum) kultiviert. Dabei wurde nach dem Protokoll von Kretz et al. (2004a) vorgegangen. Unmittelbar nach Eintritt des Todes durch Überdosierung von 30 % Chloralhydrat wurden die Augen mittels kleiner Schere und chirurgischer Pinzette aus der Orbita entfernt, in steriles PBS übertragen und dann für 5 sec zur Keimabtötung in 70 % Ethanol geschwenkt. Die Freipräparierung der Retina erfolgte im Weiteren in FCS-freiem S-MEM Medium Mittels Binokular unter semisterilen Bedingungen unter einer Sterilbank. Geräte und Instrumente wurden vor jeder Explantation für 20 min UV-bestrahlt; alle Instrumente wurden während der Präparation wiederholt in 70 % Ethanol getaucht und abgeflammt. Zur Eröffnung des Bulbus wurde mit einer Kanüle ein Loch in den Bereich der ora serrata gestochen, und die Kornea von diesem Punkt aus mit einer Mikroschere (FST) kreisförmig aufgeschnitten. Linse und Glaskörper wurden mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Augenbecher herausgelöst. Durch behutsames Abschälen der Retina von der Sklera mit einer Mikropinzette und Ablösung derselben an der Stelle des Sehnervenaustrittes am discus N.optici wurde die Retina freipräpariert; nach kleeblattförmigem Einschnitt zu 4 gleich großen Quadranten (Abb. 1a) wurde sie auf einem in sterilem PBS permeabilisierten Nitrocellulosefilter (45 µm Porengröße; Sartorius, Göttingen) flach ausgebreitet, derselbe auf einem sterilen weißen Rundfilter (Schleicher & Schuell) 3x angesaugt, und der die Retina tragende Filter mit einem „Tissue Chopper“ in 400 µm breite Streifen unterteilt; Dil-gelabelte Retinae zur Auszählung der Ganglienzellen wurden in 800 µm breite Streifen gehackt. Je 2x4 Streifen wurden, retinale Seite nach unten, in vorbehandelte hydrophile

Petri Perm[®] Kulturschalen (5 cm Durchmesser; Viva Science) aufgelegt (Abb. 1b); diese waren über einen Radius von 3-4 cm über 2 Tage mit je 250 µl Poly-L-Lysin (PLL) (1 mg/ml in PBS; Sigma, Taufkirchen, Deutschland), und 1 Tag mit je 250 µl Laminin (20 µg/ml in PBS; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), steril beschichtet worden. Vor der Laminin-Beschichtung wurde überschüssiges PLL abgesaugt und 3x mit sterilem PBS gewaschen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und humider Atmosphäre im Inkubator. Schälchen mit inhomogener, z.B. durch Austrocknung brüchiger Oberfläche, wurden verworfen. Am Tag der Explantation wurden die Petri-Perm[®] Kulturschalen nach Absaugen des Laminins erneut 3x mit sterilem PBS gewaschen. 1 ml FCS-freies S-MEM Medium wurde aufpipettiert, und die Schalen wurden im Inkubator bei 37°C bis zur Gewinnung der Stripes gelagert. Pro Kulturschale wurden 8 zentrale Streifen aufgelegt, jeweils 4 wurden mit kleinen autoklavierten Metallklötzchen beschwert. Nach Positionierung der Streifen wurde darauf geachtet, diese nicht mehr zu bewegen. Abschließend wurde jedes Petri Perm[®] vorsichtig mit je 3 ml auf 37°C angewärmtem S-MEM Medium mit 10 % FCS auf ein Endvolumen von 4 ml aufgefüllt, und es wurden jeweils 4 µl Vitamin C (1 µg/ml; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 4 µl Fungizone (1:1000; Gibco, Karlsruhe, Deutschland) hinzupipettiert. Das so kultivierte retinale Gewebe verblieb 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator. Die Zugabe sämtlicher weiteren Substanzen erfolgte stets zu Tag 3 nach Explantation.

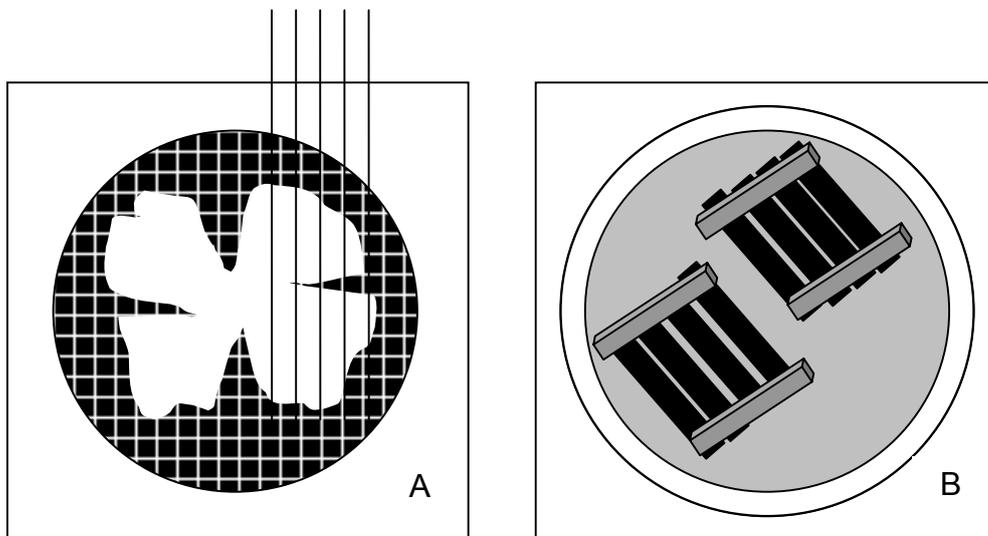


Abbildung 1: Explantation und Kultivierung retinalen Gewebes. 1a) Die kleeblattförmig eingeschnittene Retina wird auf dem Nitrocellulosefilter ausgebreitet und in Streifen geschnitten. 1b) Je 2x4 Streifen werden, durch Klötzchen beschwert, mit der Retina-tragenden Seite nach unten in den beschichteten Kulturschälchen kultiviert.

2.2 Immunhistochemie

Nach 5 Tagen in Kultur wurden die retinatragenden Filterstreifen für 20 min in 4 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) in den Petri Perm[®] Kulturschalen fixiert und anschließend vorsichtig 3x in TBS gewaschen. Pro Schälchen wurden 250 µl einer Lösung eines monoklonalen SMI-31 Antikörpers (Sternberger Monoclonals, USA) gegen phosphoryliertes Neurofilament in einer Verdünnung von 1:250 in TBS für 1h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Abpipettieren des primären Antikörpers und dreimaligem Waschen der Streifen in PBS wurde der geeignete Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488–gekoppeltes *goat-anti-mouse* IgG; Molecular Probes, Göttingen, Deutschland), in einer Verdünnung von 1:250 in 1 % BSA (bovines Serum Albumin) aufgetragen und für 1h bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubiert. Nach Abpipettieren des Sekundärantikörpers und dreimaligem

Waschen in PBS wurden die Metallklötzchen abgenommen, die Petri Perm[®] Membran um die Streifen herum rechteckig mit einem Skalpell ausgeschnitten, und diese – mit den retinalen Filterstreifen nach unten gedreht – auf mit Mowiol bestrichene Objektträger aufgelegt. Dabei wurde stets darauf geachtet, die Streifen nicht zu bewegen.

2.2.1 Auswertung des neuronalen Wachstums

Nach 5 Tagen in Kultur wurden die fixierten und gefärbten Explantate unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss, Jena) mit vorgeschaltetem FITC-Filter (Fluoreszein-Isothiozyanat) beurteilt, und die ausgewachsenen Neuriten unter Nutzung eines Bildanalysesystems (Zeiss Axiovision 3.0) nach Anzahl und Länge ausgewertet. Von jeder Retina wurden je 3-5 Streifen an 3-5 Stellen des maximalen Auswachsens ausgemessen; abgerissene Neuriten ohne Kontakt zur Basis wurden nicht gewertet. Gemessene Verzweigungen eines Neuriten wurden zur Gesamtlänge des Neuriten addiert. Pro Grundbedingung wurden die Werte aus den Berechnungen für die Länge bzw. die Anzahl der Neuriten auf eine Basislänge von 100 μm normiert. Der Mittelwert und die mittlere Standardabweichung für Länge und Anzahl für jede Bedingung wurden mittels Microsoft Excel berechnet.

2.2.2 Auswertung des mittleren Überlebens der läsionierten RGZs

Nach 5 Tagen in Kultur wurden die Streifen fixiert, zusätzlich immunhistochemisch mit SMI-31/Alexa Fluor 488 gefärbt, und die durchschnittliche Dichte der RGZ unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert, Jena) mit Rhodamin-Filter bestimmt. Dazu wurden die Streifen in 3 radiale Bereiche unterteilt: 1/6 (innere Retina), 3/6 (mittlere Retina), 5/6 (äußere Retina). Die überlebenden Ganglienzellen wurden an jeweils mind. 3 Stellen pro Abschnitt von 2 unabhängigen Untersuchern mit Hilfe eines Bildanalysesystems (Zeiss Axiovision 3.0) ausgezählt. Eingewanderte Mikroglia bei geschädigten Retinae waren anhand morphologischer Kriterien (s.o.) gut von Ganglienzellen zu unterscheiden und wurden nicht gewertet. Aus den Einzelwerten der

verschiedenen Stellen eines Abschnittes wurde ein Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet. Zum Vergleich der Retinae wurden die Werte auf eine gemeinsame Grundfläche (μm^2) umgerechnet.

2.3 Zytokin und Inhibitoren

Rekombinantes humanes Erythropoietin (rhEPO, NeoRecormon, Roche, Grenzach-Wyhlen) wurde mit auf 37°C angewärmtem S-MEM Medium vor jedem Versuch frisch verdünnt, und in steigenden Konzentrationen von 10-10000 IE/ml Medium zu Tag 3 nach Explantation den Kulturen zugegeben. 3 Retinapräparationen mit 5 IE EPO, 6 Retinapräparationen mit 10 IE EPO, 6 Retinapräparationen mit 50 IE EPO, 6 Retinapräparationen mit 100 IE EPO, 3 Retinapräparationen mit 1000 IE EPO und 2 Präparationen mit 10 000 IE wurden angefertigt. In jeder Versuchsreihe wurde eine Kulturschale als Kontrolle unbehandelt belassen, um einen adäquaten Vergleichsbasiswert zu jedem einzelnen Versuch zu erhalten und so das Risiko eventueller Abweichungen zwischen verschiedenen Präparationen zu minimieren. Insgesamt 12 unbehandelte Retinae wurden als Kontrollen mitgeführt und ausgewertet.

Nach Abschluß dieser Wachstumsexperimente wurden zur Ergründung des Regenerationsmechanismus drei Inhibitoren verschiedener anti-apoptotischer und potentiell pro-regeneratorischer Regulationswege untersucht:

1. AG 490 (in DMSO; Sigma, Taufkirchen), ein Jak2/STAT3 Inhibitor, wurde in angewärmtem S-MEM Medium auf $100\ \mu\text{l}$ verdünnt und in einer Konzentration von $100\ \mu\text{mol/ml}$ Medium zu Tag 3 nach Explantation dem retinalen Gewebe in Kultur zugegeben. Jeweils einer Präparation wurde ausschließlich AG 490 zupipettiert; in weiteren Präparationen wurde 4h nach AG 490-Zugabe zusätzlich mit 1000 IE EPO stimuliert. Als Positivkontrolle diente jeweils eine Präparation mit 1000 IE EPO (ohne AG 490), eine im Medium unbehandelte Kontrolle, und eine Präparation, die die gleiche Menge reines DMSO, in gleicher Verdünnung wie die AG 490 Lösung enthielt. Hiermit

sollten mögliche Effekte, die allein auf DMSO zurückzuführen wären, ausgeschlossen werden.

2. LY 294002 (2-[4-morpholinyl]-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on) (in DMSO; Sigma, Taufkirchen), ein PI3-Kinase Inhibitor, wurde ebenfalls in angewärmtem S-MEM Medium auf 100 µl verdünnt, und zu Tag 3 nach Explantation in 2 verschiedenen Konzentrationen (25 µmol/ml; 50 µmol/ml Medium) zum Medium zupipettiert; mit Ausnahme der veränderten angepaßten DMSO-Kontroll-Konzentrationen entsprach die LY 294002-Versuchsreihe der AG 490-Versuchsreihe.

3. ZVAD-fmk (in DMSO; Promega, Mannheim), ein Pan-Caspase Inhibitor, wurde, in 100 µl angewärmtem S-MEM Medium verdünnt, in einer Konzentration von 20 µmol/ml Medium den Kulturschalen zugegeben, und gegen eine unbehandelte Kontrolle ausgewertet.

2.4 Adenovirales Vektorsystem zur Überexpression von Bcl-X_L

Der rekombinante adenovirale Vektor Ad.Bcl-X_L wurde von Dr. Sebastian Kügler zur Verfügung gestellt (Kügler et al., 1999). Weitere Präparationen übernahmen freundlicherweise Dr. Ellen Gerhard, Dr. Stephan Hermening und Caroline Herrmann.

Der Vektor wurde nach einem Standardprotokoll (Bett et al., 1994) durch homologe Rekombination in 293-Zellen konstruiert. Dabei wurde das pBHGE3 als *backbone*-Plasmid und pMH4 als *shuttle*-Plasmid verwendet. Als Promotor diente der Neuronen-spezifische Synapsin-Promoter. Die cDNA für Bcl-X_L wurde mittels PCR in das pMH4 eingebaut, und das Ergebnis dieses Vorgangs anschließend durch Sequenzierung kontrolliert. Die Expansion des rekombinanten Virus erfolgte in Suspensionskulturen; durch Zentrifugation in einem Cäsium-Chlorid-Gradienten wurde es aufgereinigt und konzentriert. Mit Hilfe eines Plaque-Assays wurde der Virustiter bestimmt; er betrug nach Verdünnung $1,4 \times 10^7$ pfu/µl. Aufbewahrt wurde das Virus in einer Lösung aus 90 % PBS / 10 % Glycerol bei -80°C. Mit Hilfe von PCR und Primern wurde nach

einem Standardprotokoll (Dion et al., 1996) die Konzentration an replikationskompetentem Wildtyp-Adenovirus bestimmt; diese lag unterhalb des detektierbaren Bereiches. Die Expressionskontrolle erfolgte mittels Western Blot durch Proteinnachweis (Kügler et al., 1999).

2.5 Proteinnachweis

2.5.1 Lysatgewinnung

Zur Proteingewinnung aus Retinae (Kontrollen bzw. verschiedene experimentelle Gruppen) kam folgendes Protokoll zur Anwendung: Direkt nach Tötung der Tiere (Zeitpunkt entsprechend Zeitpunkt der Explantation für Kulturen) wurden die Augen entnommen, die Retinae in PBS herauspräpariert, in je 100 µl Lysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X100, pH 8) pro Retina übertragen, und darin durch mehrfaches Aufziehen in einer 5 ml Spritze homogenisiert. Dabei wurde zunächst eine Kanüle mit der Größe Gr.14, 0,60x30 mm verwendet, danach eine Kanüle mit der Größe Gr.18, 0,45x25mm (Sterican[®], Braun, Meisungen, Deutschland). Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat 10 min bei 4°C mit 13000 rpm abzentrifugiert; der Überstand wurde abgenommen, und nach Portionierung in 5 µl Aliquots bei -20°C tiefgefroren.

Zur Lysatgewinnung nach *in vitro* Behandlung der retinalen Kulturen wurden die Streifen nach dreimaligem Waschen mit PBS aus der Kulturschale zurückgewonnen. Das retinale Gewebe wurde mit feinen Pinzetten von den Filterstreifen gelöst. Jeweils 2 gleich behandelte Retinae wurden in 100µl Lysepuffer übertragen. Das weitere Procedere entsprach dem oben aufgeführten.

2.5.2 Western Blot

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA-Reagenz (Pierce, Rockford, IL) im Verhältnis 50:1 eingesetzt und jeweils 200 µl/well in eine 96well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Erstellung einer Eichkurve erfolgte mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus BSA-Standard. Von jeder Probe wurden 2 µl Retinalysat in 200 µl Reagenz verwendet. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption (Biolinx). Aus den Absorptionswerten wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben errechnet.

Zur Herstellung des 10 %igen Trenngels wurden 5 ml 30 % Acrylamid, 3,75 ml 4xTris-Cl/SDS (1,5 M TrisCl + 0,4 % SDS, pH 8,8), 6,25 ml aqua dest., 50 µl 10 % Ammoniumpersulfat und 10 µl TEMED[®] gemischt. Das darüberliegende Sammelgel setzte sich zusammen aus 0,65 ml 30 % Acrylamid, 1,25 ml 4xTris-Cl/SDS (0,5 M TrisCl + 0,4 % SDS, pH 6,8), 3,05 ml aqua dest., 25 µl Ammoniumpersulfat und 5 µl TEMED[®].

Je Probe wurden 3 µg Protein geladen, das errechnete Volumen auf 10 µl mit H₂O angeglichen und mit 10 µl 2x SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) versehen; der Marker wurde unverdünnt aufgetragen (8-10 µl).

Die Auftrennung der Proteinfractionen erfolgte in einer Elektrophoresekammer über 1h bei 100 Volt in PAGE-Puffer (1,51 % Tris-Base, 7,2 % Glycin, 5 % SDS, 86,29 % H₂O, pH 8,3). Der Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte ebenfalls über 1h bei 100 Volt in Transferpuffer (0,3 % Tris-Base, 1,73 % Glycin, 20 % Methanol, 78,24 % H₂O) zwischen 2 Schichten aus Schwämmen und Filterpapier (Whatman[®]); Schwämme und Filter waren 15 min zuvor zur Vorbereitung in Transferpuffer gelegt worden. Die Membran wurde aus Gründen der Hydrophilie für einige Sekunden in Methanol getaucht, danach für eine Minute in H₂O geschwenkt, und schließlich ebenfalls für 15 min in Transferpuffer gelegt.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran nach dem Blotten 1h in „Slim Fast“ (4 g / 100 ml TBST) geblockt, danach 3x in TBS-T (*Tris buffered saline Tween*) gewaschen und mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Verwendet wurden folgende Primärantikörper: Anti-STAT1 und – 3 polyclonal (1:2 000; New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland), Anti-

Phospho-STAT1 und -3 polyklonal (1:2 000; New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland), Anti-STAT5 und Anti-Phospho-STAT5 polyklonal (1:2 000; Santa Cruz, Heidelberg, Germany), Anti-p44/42 MAP Kinase, polyklonal (1:2 000; New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland), Anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase, polyklonal (1:2 000; New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland), Anti-Bcl-X_{L/S}, polyklonal (1:5 000; Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland).

Am nächsten Morgen wurde die Membran nach 3-maligem Waschen in TBS-T für 1h mit dem Sekundärantikörper (HRP-konjugiertes *anti-rabbit-IgG*, 1:2 000; Dianova, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend erneut 3x in TBS-T gewaschen, und schließlich 5 Minuten mit ECL plus® - Reagenz (Amersham, Arlington Heights, IL) imprägniert, wodurch die Proteinbanden in der Dunkelkammer auf einem Film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK) sichtbar gemacht werden konnten.

2.6 Statistik

Verglichen wurden die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen, sowohl bei der Evaluation des Überlebens retinaler Ganglienzellen als auch bei den Auswertungen der neu ausgewachsenen Neuriten in Kultur, nach Länge wie auch nach Anzahl. Für die Mittelwerte der einzelnen Gruppen wurde die Standardabweichung berechnet. Behandlungsmethoden wurden gegen eine definierte unbehandelte Kontrolle zum einen, und gegen andere Behandlungsmethoden zum anderen, gestellt. Die statistische Signifikanz der Differenzen zwischen den Gruppen wurde mit Hilfe des t-Testes für unabhängige Stichproben, des einfaktoriellen und des multifaktoriellen ANOVA-Testes berechnet. ($p < 0.05$ als Signifikanzniveau; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

2.7 Materialien und Geräte

2.7.1 Verwendete Reagenzien

AG 490	in DMSO; 100µmol/ml M.	(Sigma)
Alexa Fluor 488 AK	1:250 in 1% BSA/PBS	(Molecular Probes Inc.)
BCA-Reagenz	50:1 (Lösung A/B)	(Pierce)
Bcl-X _{L/S} AK	1:5 000	(Santa Cruz)
Chloralhydrat	7 %/30 % in PBS	(Sigma)
Dil-Fluoreszenzfarbstoff	5 % in DMF	(Molecular Probes Inc.)
ECL-plus® Reagenz		(Amersham)
Fungizone	1:1000	(Gibco)
HRP AK	1:2 000	(Dianova)
Laminin	20 µg/ml in PBS	(Becton Dickinson)
LY 294002	in DMSO; 25/50µmol /ml	(Sigma)
Lysin, Poly-L	1 mg/ml in PBS	(Sigma)
p44/42MAPK AK	1:2 000	(New England Biolabs)
Recormon®	1000 IE/300 µl	(Roche)
S-MEM Medium		(Bio West)
SMI-31 AK	1:250 in TBS	(Sternberger Monoclonals)
STAT AK	1:2 000	(New England Biolabs)
Vitamin C	1 µg/ml	(Sigma)
ZVAD-fmk	in DMSO; 20 µmol /ml	(Promega)

2.7.2 Herstellung wichtiger Puffer und Medien

S-MEM-Medium:	S-MEM	100 ml/l	(Bio West)
	Glucose	3 500 mg/l	(Sigma)
	NaHCO ₃	3 700 mg/l	(Sigma)
	HEPES	3 574 mg/l	(Gibco)

	Insulin	5 mg/l		(Sigma)	
	Choleratoxin	0,01 mg/l		(Sigma)	
	Putrescin	8 mg/l		(Sigma)	
	Na ₂ SeO ₃	0,0043 mg/l		(Sigma)	
	BSA (Albumin)	792 mg/l		(Sigma)	
	Linolsäure	1,51 mg/l		(Sigma)	
	Linolensäure	1 mg/l		(Sigma)	
	L-Alanin	3,6 mg/l		(Sigma)	
	L-Asparagin	4 mg/l		(Sigma)	
	L-Aspartat	4 mg/l		(Sigma)	
	L-Glutamat	4,3 mg/l		(Sigma)	
	L-Prolin	8 mg/l		(Sigma)	
	Biotin	0,024 mg/l		(Sigma)	
	Liponsäure	0,12 mg/l		(Sigma)	
	Vit B 12	1,35 mg/l		(Sigma)	
	Spurenelemente	10 µg/l		(Sigma)	
	Pen-Strep (1:100)	10 ml			
	Fungizone (1:1000)	1 ml		(Gibco)	in H ₂ O
PBS:	NaCl	138 mM	8 g/l		
	KCl	2,7 mM	0,2 g/l		
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM	0,2 g/l		
	Na ₂ HPO ₄	8,06 mM	14,3 g/l		in H ₂ O
TBS:	Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	20 mM	2,42 g/l		
	NaCl	138 mM	8 g/l		
	HCl	1 M	3,8 ml/l		in H ₂ O
Moviol:	Moviol	25 g/100 ml PBS		(16h bei 4°C rühren)	
	Glycerin	50 ml		(16h bei 4°C rühren)	
		15min zentrifugieren bei 4 000upm;		pH 8-8,5	

Trenngel:	30 % Acrylamid	5 ml
	4xTris Cl/SDS, pH 8,8	3,75 ml
	Aqua dest.	6,25 ml
	10 % Ammonium persulfate	50µl
	Temed®	10µl
Sammelgel:	30 % Acrylamid	0,65 ml
	4xTris Cl/SDS, pH 6,8	1,25 ml
	Aqua dest.	3,05 ml
	10 % Ammonium persulfate	25µl
	Temed®	5µl

2.7.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Brutschrank, aerob	(Heraeus GmbH)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert	(Zeiss)
Gel foam	(Pharmacia & Upjohn AG)
Heizblock	(neoLab Migge)
Kanülen Gr. 14; 0,60x30mm Sterican®	(Braun)
Gr. 18; 0,45x25mm Sterican®	(Braun)
Kulturschale Petri Perm® 5cm Durchmesser	(Viva Science)
Membranpumpe	(KNF Neuberger)
Mikroschere	(Fine Science Tools)
Mikroskop, binocular	(Zeiss)
Mikroskop, OPMI 1-FR	(Zeiss)
Nadel, Teflon, 34 gauge	(Hamilton)
Nitrozellulosefilter, 45 µm Porengröße	(Sartorius)
PH-Meter	(WTW GmbH)
Rührer	(H+P Labortechnik)
Rundfilter, weiß	(Schleicher & Schuell)
Rundklemme gebogen	(Fine Science Tools)

Spritze (RN, 5µl; 10µl)	(Hamilton)
Stereotaxierahmen	(Stoelting)
Sterilfilter Sterilflip 50 ml	(Millipore)
Tischzentrifuge	(Heraeus GmbH)
Tissue Chopper	(Mc Illwain)
Vortexer	(Scientific Industries)
Waage	(Sartorius GmbH)

3. Ergebnisse

3.1 Stimulation neuronalen Wachstums durch Erythropoietin

Untersucht wurden das neuroregenerative Potential des Zytokins Erythropoietin (EPO) und dessen Einfluß auf die Induktion anti-apoptotischer sowie potentiell wachstumsfördernder Gene; dem gegenübergestellt wurde zum Vergleich die Adeno-Vektor-vermittelte Neuroregeneration nach Überexpression von Bcl-X_L, für welche in unserer Arbeitsgruppe bereits deutliche Effekte beschrieben wurden (Kretz et al., 2004b).

3.1.1 Erythropoietin: Gabe in Kultur fördert konzentrationsabhängig axonales Wachstum

Die Zugabe von EPO in steigender Dosis zum Medium zeigte konzentrationsabhängig eine Induktion des Neuritenwachstums mit einem Maximum bei 1000 IE/ml (Diagramm 1a,b); eine weitere Konzentrationssteigerung auf 10000 IE/ml EPO zeigte keine weitere Wachstumsstimulation (n=2).

Waren bei Gabe von 5 IE EPO/ml noch keine signifikanten Effekte im Vergleich zu den Basiswerten von 587,24 µm/100 µm Basis (Länge) bzw. 1,66/100 µm Basis (Anzahl) zu beobachten, so zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 10IE/ml Medium eine signifikante Stimulation des Neuritenwachstums in Form einer Verdopplung sowohl der Länge als auch der Anzahl neu ausgewachsener Neuriten nach 5 Tagen in Kultur ($p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Läsion ohne Behandlung). Dabei wurde eine durchschnittliche Zunahme des Gesamtlängenwachstums von 587,24 µm/100 µm Basis auf 1248,42 µm/100 µm Basis bzw. eine Stimulation der Anzahl neugebildeter Neuriten von 1,66/100 µm Basis auf 3,46/100 µm Basis erreicht. Jede weitere Konzentrationssteigerung (50 IE; 100 IE; 1000 IE) resultierte in einem weiteren Anstieg der gemessenen Werte sowohl für die Länge als auch für die Anzahl regenerierter Axone. Bei 1000 IE EPO/ml Medium hatten sich die Werte für die

Neuritenlänge mit 4881,59 $\mu\text{m}/100 \mu\text{m}$ Basis auf ein 8,31-faches des Ausgangswertes (intrinsisches regeneratives Potential, definiert im Vergleich zur unbehandelten geschädigten Kontrolle) gesteigert, diejenigen für die Neuritenanzahl mit 4,42/100 μm Basis auf das 2,66-fache. Einzelne Neuriten nahmen dabei eine Einzellänge von bis zu 3 mm an. Die daraus ermittelten Signifikanzen ergaben Werte von $p \leq 0,001$ für die Länge ebenso wie für die Anzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Verstärktes Auswachsen in zentralen gegenüber peripheren Bereichen der Retina konnte nicht festgestellt werden, die Gewebstreifen wiesen prinzipiell ein gleichmäßiges Regenerationsmuster auf.

Selbst bei Steigerung der Konzentrationen auf bis zu 10000 IE EPO/ml Medium wurden keine toxischen Effekte auf das retinale Gewebe beobachtet. Da in Kultur keine BRS (Blut-Retina-Schranke) besteht, kann man davon ausgehen, dass die effektive, an der Zelle wirkende Konzentration weitgehend der applizierten Konzentration entspricht. Morphologisch erschienen die neu generierten Neuriten vital und imponierten durch starke Anfärbung mit einem neurofilamentären Antikörper (Abb.2a,b,c). Der axonale Durchmesser wirkte häufig ebenfalls deutlich kräftiger als bei den unbehandelten Kontrollen, sodaß zusätzlich von einem trophischen Effekt auszugehen ist.

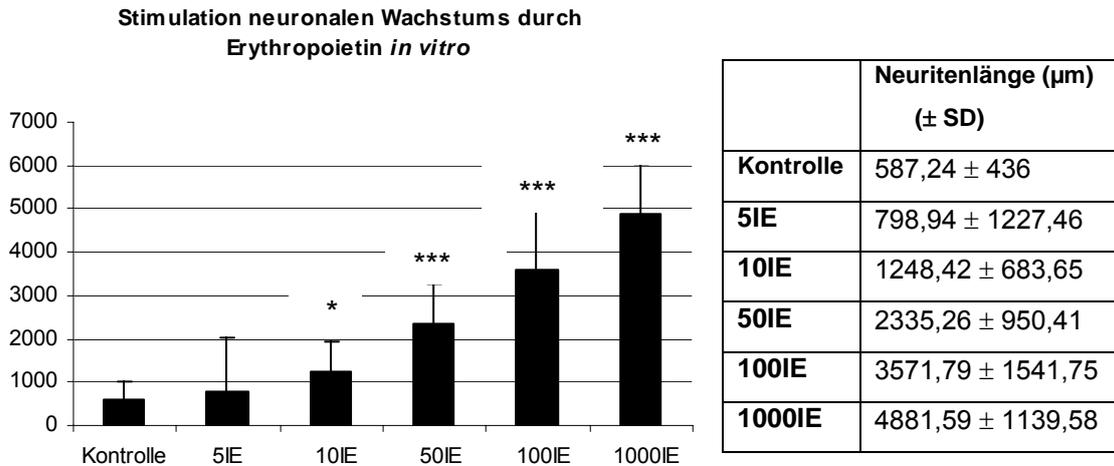


Diagramm 1a): Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen.

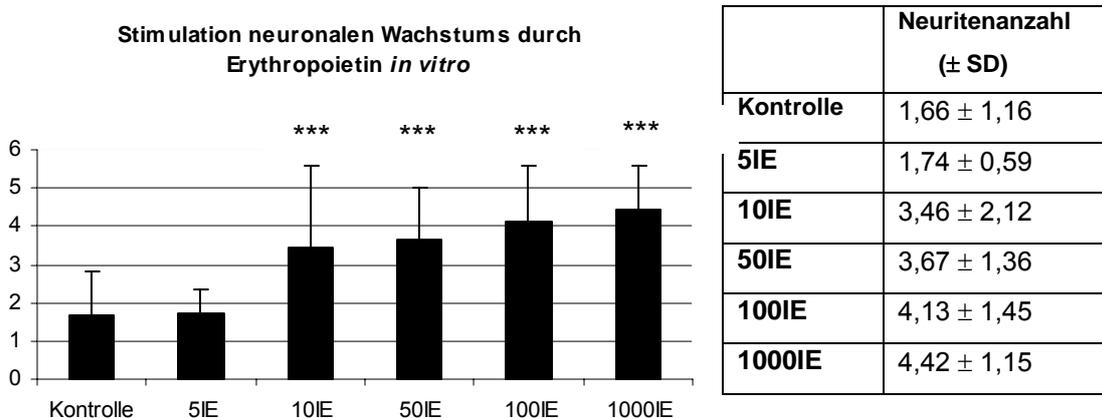


Diagramm 1b): Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen.

Diagramm 1: Die Säulen zeigen die durchschnittliche Gesamtlänge (a) und -Anzahl (b) der neu ausgewachsenen Neuriten pro 100 µm Basis unter aufsteigenden Konzentrationen von Erythropoietinzugabe in Kultur. Die Balken geben die Standardabweichung an. ***, p<0,001.

	10IE EPO	50IE EPO	100IE EPO	1000IE EPO
Kontrolle	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
10IE EPO	-----	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
50IE EPO	$p \leq 0,001$	-----	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
100IE EPO	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	-----	$p \leq 0,001$
1000IE EPO	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	-----

Tabelle 1a): Signifikanzen der Einzelvergleiche zwischen den in den unterschiedlichen Konzentrationen durchschnittlich erzielten Werten (Gesamtlänge auswachsender Neuriten).

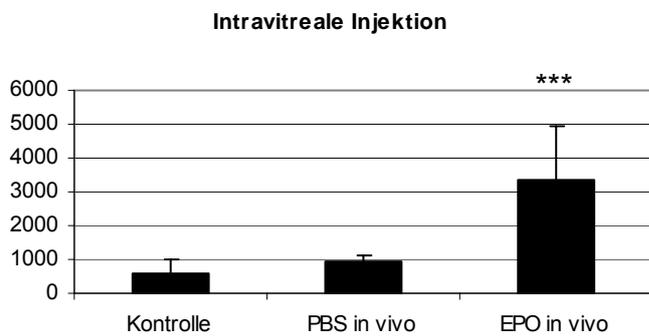
	10IE EPO	50IE EPO	100IE EPO	1000IE EPO
Kontrolle	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
10IE EPO	-----	$p \leq 0,643$	$p \leq 0,148$	$p \leq 0,093$
50IE EPO	$p \leq 0,643$	-----	$p \leq 0,317$	$p \leq 0,187$
100IE EPO	$p \leq 0,148$	$p \leq 0,317$	-----	$p \leq 0,615$
1000IE EPO	$p \leq 0,093$	$p \leq 0,187$	$p \leq 0,615$	-----

Tabelle 1b): Signifikanzen der Einzelvergleiche zwischen den in den unterschiedlichen Konzentrationen durchschnittlich erzielten Werten (Gesamtanzahl auswachsender Neuriten); Signifikanzen nur gegen Kontrollwert.

Tabelle 1: Signifikanzen im Einzelvergleich für a) Neuritenlänge und b) Neuritenanzahl.

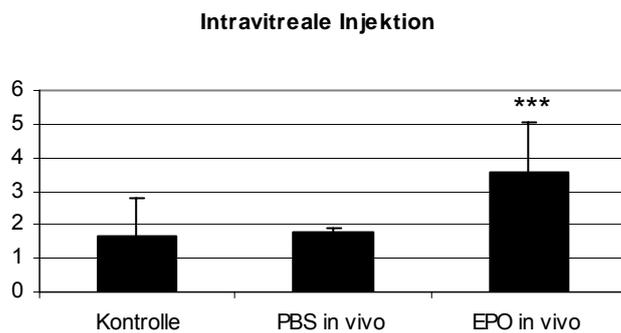
3.1.2 Erythropoietin: Behandlung *in vivo* fördert axonales Wachstum

Behandlung der Retina unmittelbar nach ON-Läsion *in vivo* mit 2 μ l Zytokinlösung/Auge jeden 3. Tag über einen Zeitraum von 10 Tagen zeigte ebenfalls deutlich stimulierende Effekte auf das Wachstum der Neuriten, sowohl in Bezug auf die Länge als auch in Bezug auf deren Anzahl. Ein Volumen von 2 μ l Lösung entspricht dabei 6,66 IE, eine Konzentration, die bei einer verzögerten Applikation am 10. Tag nach Läsion in das Kulturmedium noch keine signifikanten Wachstumssteigerungen der Neuriten bewirkte. Die 4-malige Injektion von 2 μ l Stammlösung erhöhte die Regenerationsfähigkeit der neu generierten Axone um das 5,70-fache in der Länge (3349,65 μ m/100 μ m Basis), und um das 2,16-fache in der Anzahl (3,59/100 μ m Basis); ($p \leq 0,001$) gegenüber einer unbehandelten *gecrushten* Kontrolle (Abb. 3a, b). Die zum Ausschluß einer möglicherweise allein durch die Mikropunktion verursachten endogenen Wachstumsstimulation durchgeführte 4-malige Injektion von PBS an Kontrolltieren bewirkte kein verstärktes Neuritenwachstum in den kultivierten Retinae. Die fundoskopische Kontrolluntersuchung der Retinae zeigte keinen Hinweis auf eine vaskuläre Hyperämie oder Thrombosierung, die aufgrund der hämatopoietischen Eigenschaften von Erythropoietin mit Anstieg der Erythrozytenzahl und des Hämatokrits möglicherweise hätten entstehen können.



	Neuritenlänge (µm) (± SD)
Kontrolle	587,24 ± 436
PBS <i>in vivo</i>	919,71 ± 212,59
EPO <i>in vivo</i>	3349,65 ± 1607,61

Diagramm 2a): Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen.



	Neuritenanzahl (± SD)
Kontrolle	1,66 ± 1,16
PBS <i>in vivo</i>	1,76 ± 0,17
EPO <i>in vivo</i>	3,58 ± 1,46

Diagramm 2b): Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen.

Diagramm 2: Die Säulen zeigen das durchschnittliche Wachstum der Neuriten in Länge (Diag. 2a) und Anzahl (Diag. 2b) /100 µm Basis nach *in vivo* Behandlung mit EPO. ***, p< 0,001.

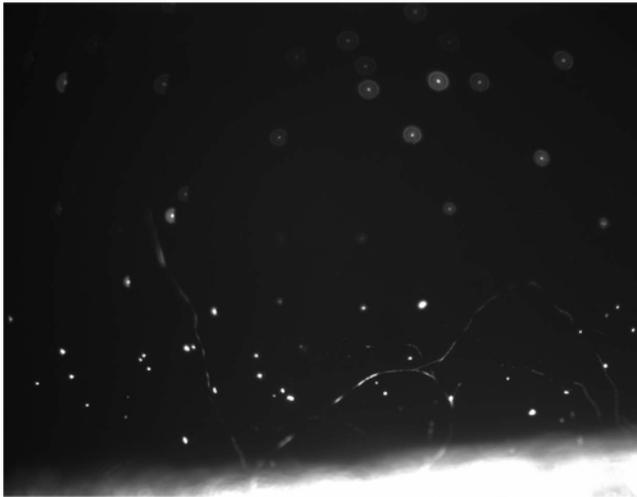


Abb.2a.

Ausschnitt einer unbehandelten Retina nach ON-Läsion. Geringes Auswachsen neuer Neuriten; geringes intrinsisches neuroregeneratives Potential.

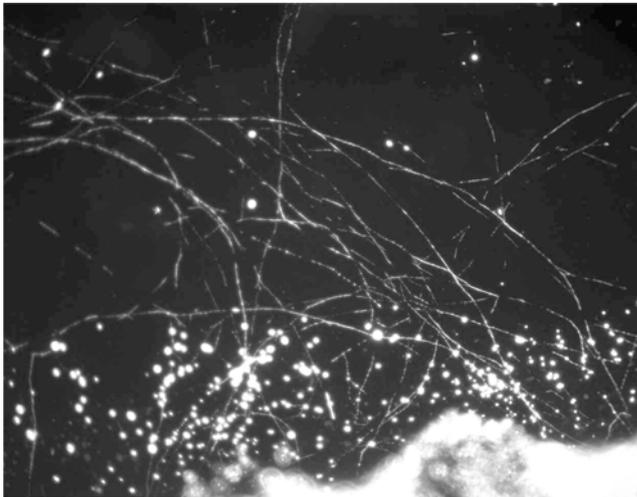


Abb. 2b.

Repräsentativer Ausschnitt einer Retina nach ON-Läsion; Behandlung mit 100 IE EPO in Kultur. Deutliche Zunahme des Längenwachstums der Neuriten, gesteigerte Anzahl, dicker imponierende Fortsätze.

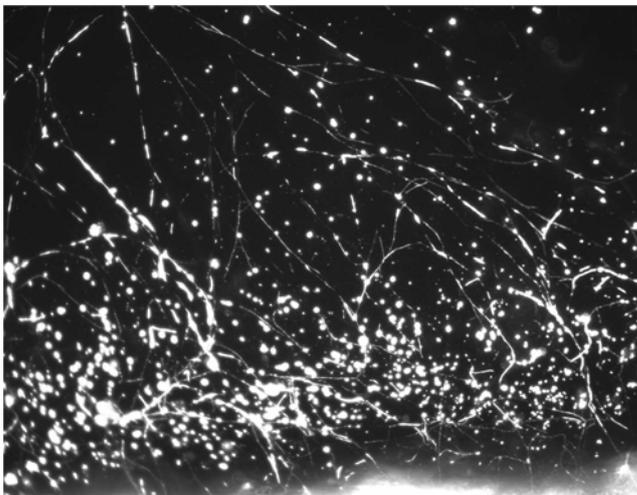


Abb. 2c.

Repräsentativer Ausschnitt einer Retina nach ON-Läsion; Behandlung mit 1000 IE EPO in Kultur. Verstärktes Auswachsen, Steigerung in Länge und Anzahl.

Abbildung 2: Die Bilder 2 a-c zeigen repräsentative Ausschnitte retinaler Kulturstreifen mit konzentrationsabhängigem Neuritenwachstum.

Crush-läsionierter Retina waren am Tag 3 in Kultur 0 IE/ml (a), 100 IE/ml (b) oder 1000 IE/ml (c) EPO zum Medium zupipettiert worden (SMI-31/Alexa Fluor 488 - Färbung; Objektiv 20x).

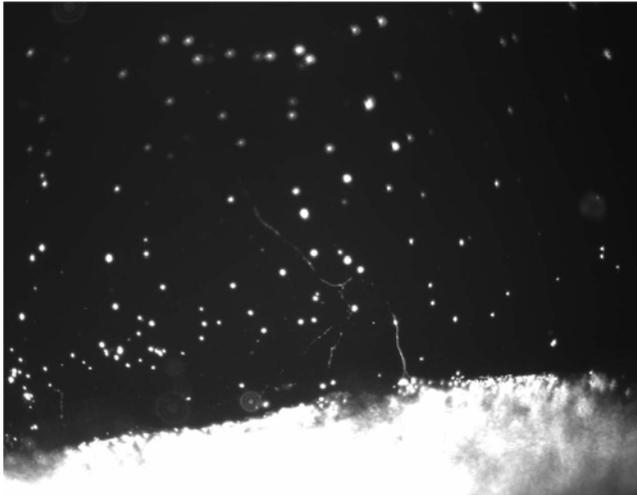


Abb. 3a.
Ausschnitt einer
Retina eines
intravitreal PBS-
injizierten Tieres.
Spärliches
Auswachsen; keine
verstärkte
Regeneration.



Abb. 3b.
Ausschnitt einer
Retina eines
intravitreal EPO-
injizierten Tieres.
Deutliche
regenerative Effekte,
verstärktes
Neuritenwachstum.

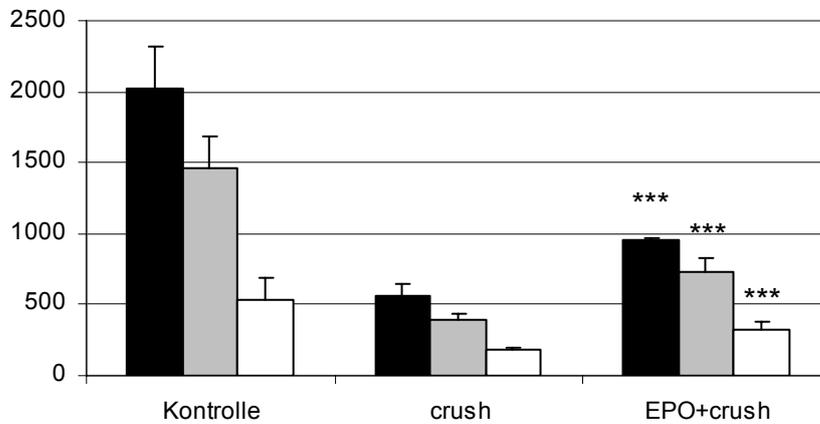
Abbildung 3: Die Bilder 3a und 3b zeigen die Ergebnisse nach wiederholter, intravitrealer Injektion von 2 μ l Zytokinlösung (\cong 6,66 IE) (b) bzw der PBS-Kontroll-Injektion (a) (SMI-31/Alexa Fluor 488 – Färbung; Objektiv 20x).

3.2 Erythropoietin: Gabe in Kultur ist neuroprotektiv

Die Zählung markierter retinaler Ganglienzellen nach Läsion des optischen Nerven durch Crush und anschließender Behandlung durch EPO ergab, daß EPO neben seinem neuroregenerativen Potential auch anti-apoptotische Eigenschaften besitzt, und eine Rolle bei der Zellrettung RGZ zu spielen scheint. Dabei wurden nach einem standardisierten Protokoll (Isenmann et al., 1997; Schmeer et al., 2002) RGZ über alle 4 Quadranten in je 3 Exzentrizitäten quantifiziert, und die mittlere Dichte bestimmt. In allen 3 gemessenen radialen Abschnitten fanden sich nahezu doppelt so viele überlebende retinale Ganglienzellen (Faktor $f=1,69$ bei $r1/6$; $f=1,82$ bei $r3/6$; $f=1,76$ bei $r5/6$) in den EPO-behandelten, im Vergleich zu den unbehandelten Gewebestreifen (Diagramm 3). Die in den ungecrushten Kontrollen ermittelte, physiologische Zelldichte nach retrograder Dil-Markierung stimmte mit durchschnittlich $2028,75 \pm 288,88$ RGZ/mm² sehr gut mit bereits bekannten Zahlen überein (Isenmann et al., 1997; Straten et al., 2002; Schmeer et al., 2002).

Unter allen 3 Bedingungen wurde eine Abnahme der Zellzahl von zentral nach peripher beobachtet, sowohl in Retinae nach Läsion des ON als auch in Retinae, deren ON keine Schädigung erlitten hatte, was einer physiologischen Verteilung entspricht. Nicht gewertet wurde die im Gewebe läsionierter Tiere auftretende Mikroglia, die morphologisch durch ihre Ramifizierung und typische Form der Somata gut von den Ganglienzellen abzugrenzen war (vgl. Material und Methoden, 2.1.4.).

Anzahl RGZ/m² Retina



	R1/6 Anzahl RGZ ± SD	R3/6 Anzahl RGZ ± SD	R5/6 Anzahl RGZ ± SD
Kontrolle	2028,75 ± 288,88	561,62 ± 78,89	948,95 ± 24,65
crush	1457,49 ± 231,07	398,34 ± 39,49	723,52 ± 101,46
EPO+crush	531,14 ± 164,06	183,64 ± 19,67	322,46 ± 57,68

Diagramm 3: Die Säulen stellen die Anzahl durchschnittlich überlebender RGZ pro mm² Retina dar; (Kontrolle = ohne Läsion, ohne Behandlung; crush = nach Läsion, ohne Behandlung; EPO+crush = nach Läsion, EPO-behandelt), gemessen in 3 radialen Abschnitten von innen (r1/6) nach aussen (r5/6). ***, p<0,001.

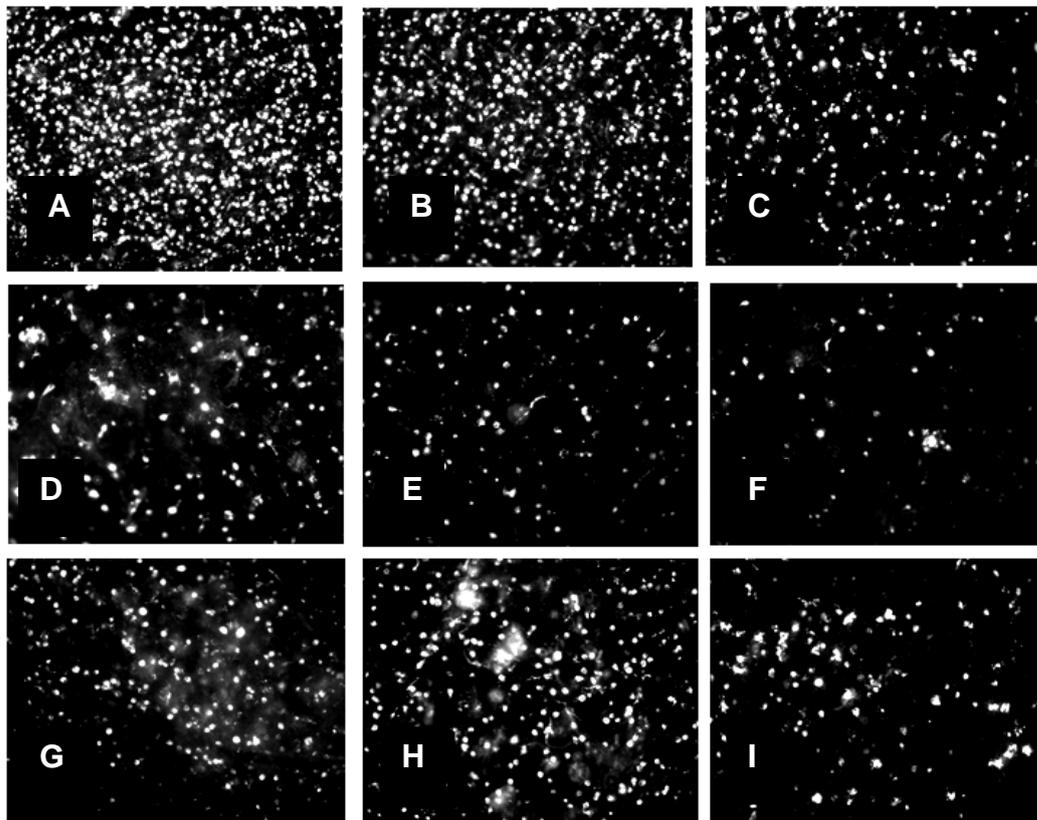


Abbildung 4: Repräsentative Ausschnitte aus den Ganglienzellschichten Dil-gefärbter Retinae; keine Läsion , r1/6, r3/6, r5/6 (A-C) ; nach ON-Läsion, r1/6, r3/6, r5/6 (D-F) ; nach ON-Läsion, EPO-behandelte Retina, r1/6, r3/6, r5/6 (G-I). (Dil-Labeling, zusätzlich SMI-31/Alexa Fluor 488 Färbung; Objektiv 10x).

3.3 Signaltransduktion Erythropoietin-vermittelter Neuroregeneration

3.3.1 Regulation von Transkriptionsfaktoren und Zielgenen

Zur Bestimmung der durch Erythropoietin aktivierten Signaltransduktionskaskaden und Antiapoptose- bzw. Regeneration-vermittelnden Moleküle wurden Expressionsprofile mittels Western Blots in EPO-behandelter und unbehandelter läsionierter Retina erstellt.

3.3.1.1 EPO induziert die Phosphorylierung von STAT3, nicht aber von STAT1 oder STAT5

Um zu klären, welche Rolle die Familie der STATs bzw. im Speziellen die Jak-2/STAT3-Signalkaskade bei der EPO-vermittelten Regeneration spielt, wurden Western Blots gegen STAT1, STAT3 und STAT5 angefertigt.

STAT1 wurde in sämtlichen Kontrollretinae detektiert, und zeigte keinerlei Änderung der Expression nach EPO-Behandlung, weder nach *in vitro*, noch nach *in vivo* Behandlung (Abb.5a, 2. Blot von oben). Für das phosphorylierte STAT1 reduzierte sich darüber hinaus die Expression in Zytokin-behandelten Retinalysaten im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 5a, 1. Blot von oben). Ähnliches galt für STAT5: Es wurde keine entscheidende Veränderung der STAT5 - Expression in den EPO-behandelten Retinalysaten im Vergleich zu den Kontrollen detektiert (Abb. 5a, 1. Blot von unten), und Phospho-STAT5 konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 5a, 2. Blot von unten). Bei der Detektion von STAT3 jedoch konnte eine Induktion der Phosphorylierung selektiv in den EPO-behandelten bzw. in den mit Ad.-Bcl-X_L transduzierten Retinalysaten nachgewiesen werden (Abb. 5a, 3. Blot von unten), jedoch nicht in den Kontrollen; inaktiviertes STAT3 zeigte keine veränderte Expression in behandelten Retinae (Abb. 5a, 3. Blot von oben). Unphosphorylierte STAT-Proteine dienten dabei als Ladekontrolle.

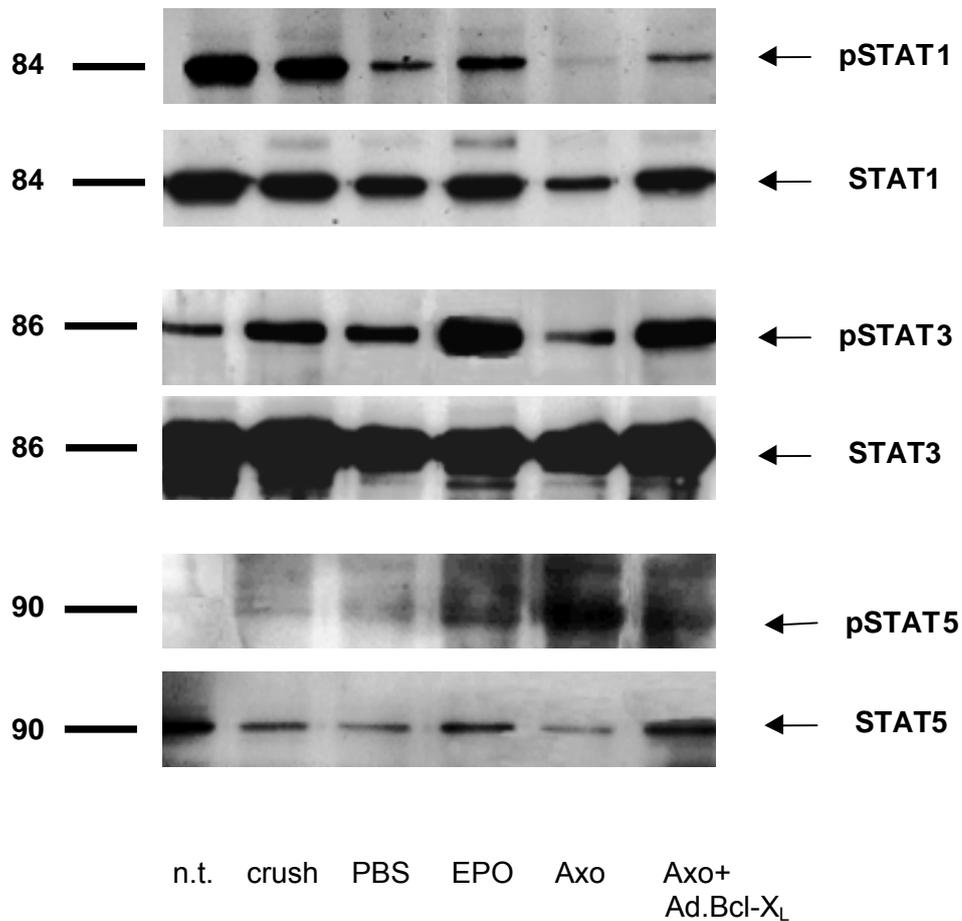


Abb. 5a): STAT-Blots. (Laufhöhe für STAT1/pSTAT1: 84, 91 kDa für beide Isomere; STAT3/pSTAT3: 79, 86 kDa für beide Isomere; STAT5/pSTAT5: 90 kDa).

3.3.1.2 EPO induziert die Phosphorylierung von p44/42-MAPK

Da auch der Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalkaskade eine wichtige Funktion in der Vermittlung regenerativer Impulse zugeschrieben wird, wurden des weiteren Blots für p44/42-MAP Kinase bzw. deren phosphorylierte Formen durchgeführt. Für die unphosphorylierte Form der p44/42-MAPK konnte erneut keine Expressionsänderung in EPO-behandelten Retinae detektiert werden (Abb.5b, untere Zeile); in den Phospho-p44/42-MAPK- Blots hingegen zeigte sich eine

deutliche Hochregulierung von Phospho-p44/42-MAPK, die nur in behandelten Retinae auftrat (Abb.5b, obere Zeile).

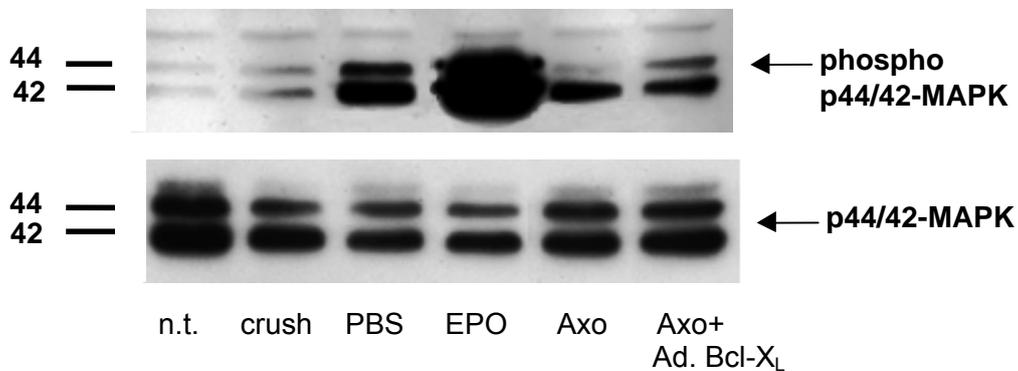


Abb. 5b): MAPK-Blots.

3.3.1.3 EPO induziert eine Hochregulierung des anti-apoptotischen Bcl-X_L

Um zu bestimmen, welche Rolle das anti-apoptotische Bcl-X_L bei der Verstärkung des Neuritenauswachsens spielt, wurden ebenfalls Western Blots gegen Bcl-X_L durchgeführt. Es zeigte sich eine Hochregulierung von Bcl-X_L in den EPO-behandelten Proben, wohingegen in nicht-zytokinbehandelten Retinalysaten nach Axotomie die Expression abnahm, was sich mit früheren immunhistochemischen Untersuchungen deckt (Isenmann et al., 1997), und auf eine Reduktion des endogenen Bcl-X_L-Gehalts infolge RGZ-Apoptose zurückzuführen ist.

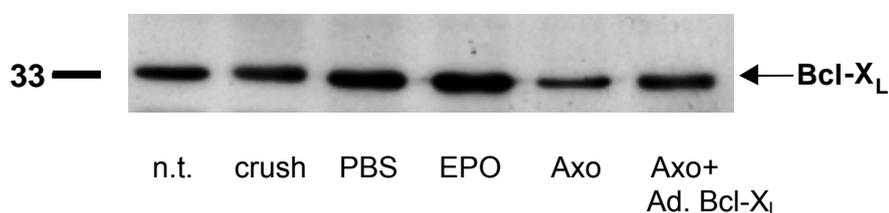


Abb. 5c): Bcl-X_L-Blot.

Abbildung 5: Ergebnisse der Western Blots zur Proteinbestimmung; verschiedene Antikörper und Lysate (s. Beschriftung).

3.3.2 Auswirkung der Inhibition von Transduktionskaskaden

3.3.2.1 Der Jak-2/STAT3 Inhibitor AG 490 blockiert das EPO-vermittelte Neuritenwachstum

Hier sollte die Rolle des Jak-2/STAT3 Signalweges bei der Induktion der Erythropoietin-vermittelten Neuroregeneration untersucht werden. Nach Zugabe von 100 µmol/ml des Jak-2/STAT3 Inhibitors AG 490 (in DMSO) zum Medium zeigten sich keinerlei toxische Effekte auf die retinalen Gewebestreifen, wohl aber eine vollständige Inhibition der EPO-vermittelten Neuritogenese mit Absinken der Werte für Länge und Anzahl auf Kontrollniveau. Dabei lagen die Werte für die Neuritenlänge in den Kontrollen im Mittel bei 323,87 µm/100 µm Basis; in den behandelten Retinae (100 µmol/ml AG 490 + 1000 IE EPO 4h später) im Mittel bei 393,75 µm/100 µm Basis. Entsprechend fanden sich für die Neuritenzahl Mittelwerte von 0,95/100 µm Basis in den Kontrollen und 0,93 in den behandelten Retinae. (Diagramm 4a und b). Die Applikation von DMSO alleine blieb ohne Auswirkung auf die Neuritogenese.

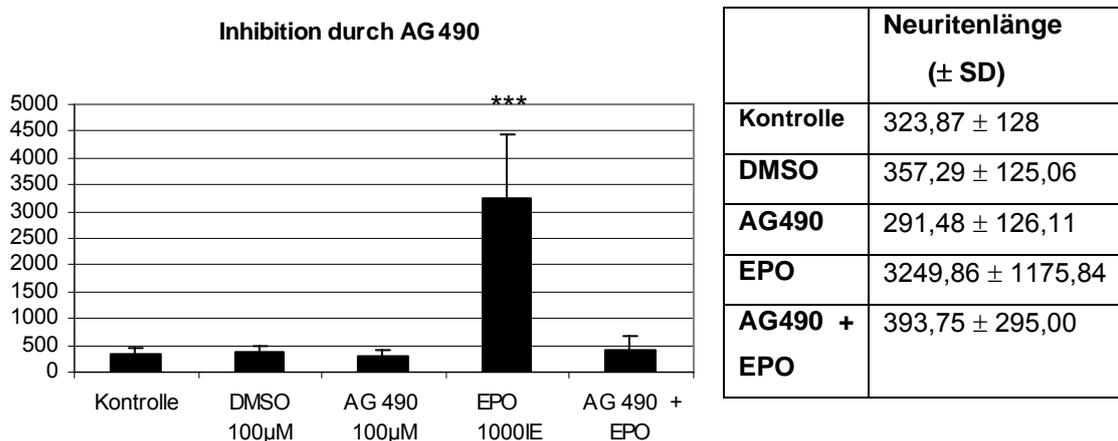


Diagramm 4a): Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen.

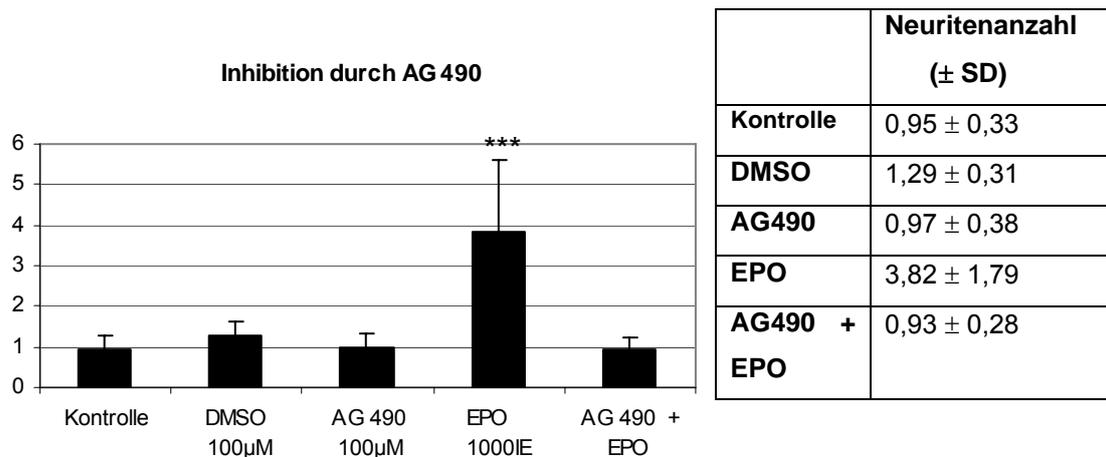


Diagramm 4b): Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen.

Diagramm 4: Die Säulen stellen die für die neu ausgewachsenen Neuriten gemessenen Werte in Länge (a) und Anzahl (b) unter den verschiedenen Bedingungen (Kontrolle; AG 490-äquimolare Menge DMSO; AG 490 100 µmol/ml; EPO 1000 IE/ml Medium; AG 490 100 mM + 1000 IE EPO/ml Medium) dar. ***, $p < 0,001$.

Die zum Vergleich für diese Versuchsreihe neu kultivierten EPO-behandelten Retinae (1000 IE EPO/ml Medium) lagen mit Werten von 3249,86 µm Länge /100 µm Basis bzw. 3,82/100 µm Basis (Anzahl) im erwarteten Bereich einer 10fachen Wachstumsverstärkung für die Länge bzw. nahezu 4-fachen Stimulation deren Anzahl. Die zum Ausschluß einer DMSO-vermittelten Regeneration durchgeführten Kontrollpräparationen mit äquimolarer DMSO-Zugabe zeigten keinerlei Effekt.

3.3.2.2 Der PI3 Kinase Inhibitor LY 294002 blockiert das EPO-vermittelte Neuritenwachstum

Um zu ermitteln, ob auch der PI3-Kinase/AKT Signalweg eine Funktion in der Vermittlung Erythropoietin-induzierter Neuroregeneration inne hat, wurde zur Blockade desselben der pharmakologische Inhibitor LY294002 in zwei verschiedenen Konzentrationen (25 µmol/ml; 50 µmol/ml) dem Medium zugegeben und dessen Auswirkung auf das EPO-induzierte Auswachsen der Neuriten untersucht.

Bei Zugabe von 25 µmol/ml LY294002 (in DMSO) pro ml Medium zeigte sich ein deutlicher Rückgang des unstimulierten, basalen Neuritenwachstums sowohl in Länge als auch in Anzahl im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle (Länge: von 505,26 µm/100 µm Basis auf 173,48 µm/100 µm Basis; Anzahl: von 1,29/100 µm Basis auf 0,59/100 µm Basis; Diag. 5a+b). Darüber hinaus führte LY294002 (25 µmol/ml) zu einer partiellen Inhibition der EPO (1000 IE/ml)-stimulierten Neuritogenese (Länge: von 1650,89 µm/100 µm Basis auf 1106,80 µm/ 100 µm Basis; Anzahl: von 2,36/100 µm Basis auf 1,85/100 µm Basis; Diag.5a+b).

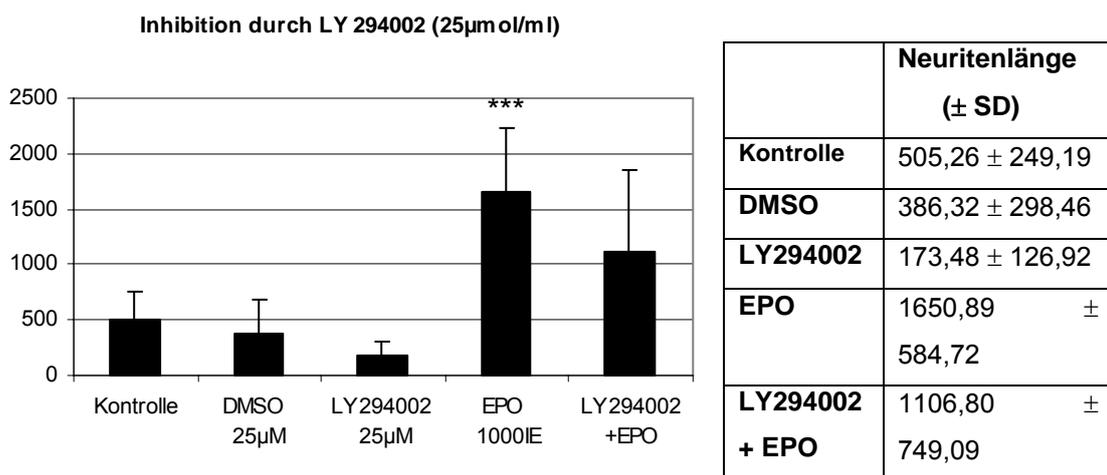


Diagramm 5a): Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen.

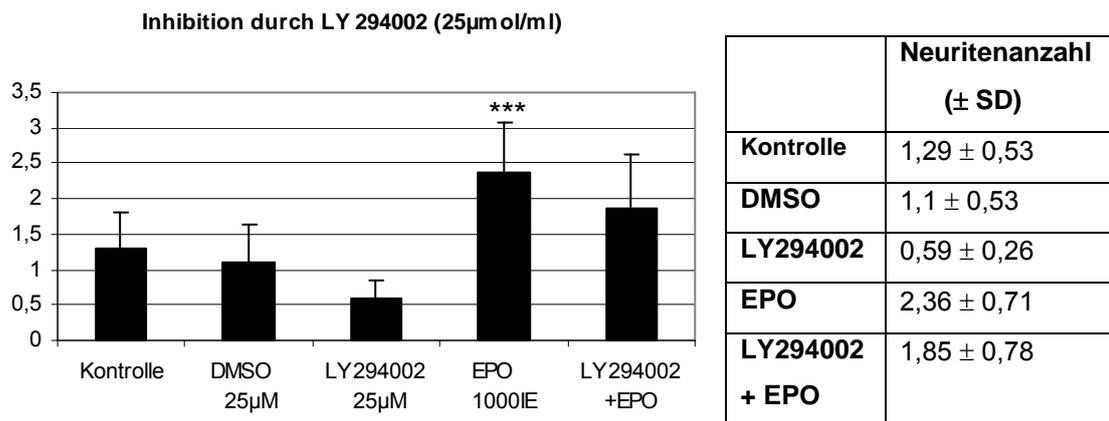


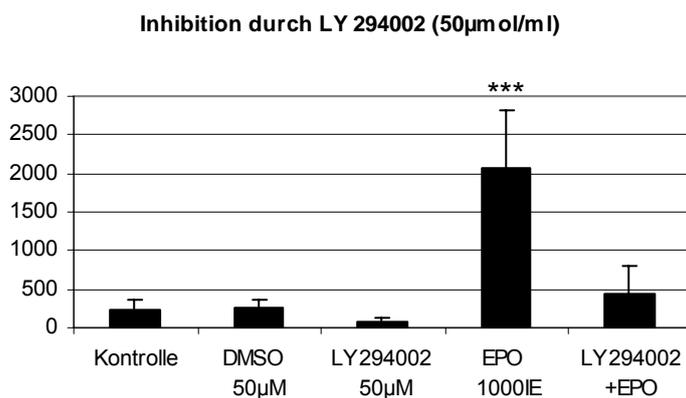
Diagramm 5b): Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen.

Diagramm 5: Die Säulen stellen das durchschnittliche Wachstum der Neuriten in Länge (5a) und Anzahl (5b) pro 100 µm Basis unter den verschiedenen Behandlungen (Kontrolle; DMSO in äquimolarer Konzentration; LY294002 25 µmol/ml; EPO 1000 IE/ml Medium; LY294002 25 µmol/ml + 1000 IE EPO/ml Medium) dar. ***, $p < 0,001$.

Da die Teilhemmung des Wachstums, die sowohl bei LY294002-Gabe gegenüber der unbehandelten Kontrolle, als auch unter LY294002-Gabe mit anschließender Zytokinbehandlung gegenüber der reinen Erythropoietin-Behandlung beobachtet wurde, die Vermutung nahelegte, EPO könne über PI3-Kinase vor allem das intrinsische, nicht aber das durch externe Zuführung des Zytokins vermittelte Regenerationspotential inhibieren, wurde eine weitere Versuchsreihe mit 50 µmol/ml LY294002 (in DMSO) angesetzt. Hiermit sollte unterschieden werden, ob der submaximalen Inhibition ein konzentrationsabhängiger Effekt zugrunde liegt.

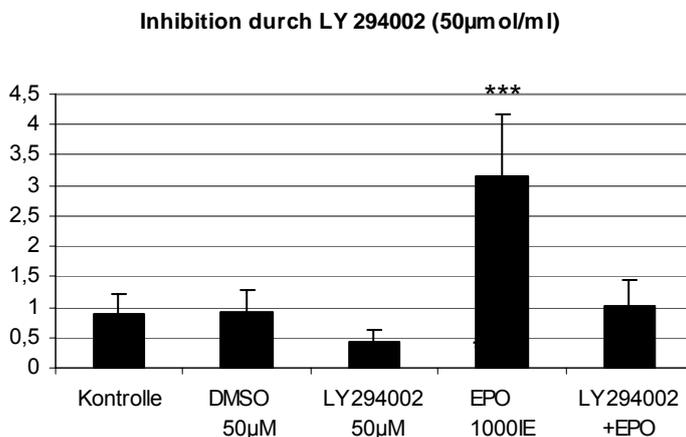
Die Zugabe von 50 µmol/ml LY294002 (in DMSO) bewirkte eine weitere, wenn auch geringfügige Inhibition intrinsischen, unstimulierten Wachstums. In der LY294002 + EPO - Präparation kehrten die gemessenen Werte sowohl in Länge (448,26 µm/100 µm Basis) als auch in Anzahl (1,03/100 µm Basis) auf das Ausgangsniveau, definiert durch den Mittelwert der Kontrollen (239,29

µm/100 µm Basis für die Länge; 0,9/100 µm Basis für die Anzahl), zurück, was einer nahezu vollständige Hemmung EPO-vermittelter Neuroregeneration entspricht (Diag.6a+b). Die angepasste Erhöhung der eingesetzten DMSO-Volumina bewirkte weiterhin keine Förderung der Neuritogenese; auch wurden weder in den DMSO-Präparationen noch in den LY294002-behandelten Retinae toxische Effekte festgestellt.



	Neuritenlänge (± SD)
Kontrolle	239,29 ± 125,38
DMSO	246,81 ± 110,41
LY294002	88,28 ± 50,15
EPO	2069,42 ± 739,68
LY294002 + EPO	448,26 ± 365,40

Diagramm 6a): Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen.



	Neuritenanzahl (± SD)
Kontrolle	0,9 ± 0,31
DMSO	0,93 ± 0,35
LY294002	0,44 ± 0,17
EPO	3,16 ± 1,00
LY294002 + EPO	1,03 ± 0,43

Diagramm 6b): Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen.

Diagramm 6: Die Säulen stellen die Neuritenlänge (a) und Neuritenanzahl (b) pro 100 µm unter verschiedenen Kulturbedingungen (unbehandelte Kontrolle; DMSO; LY294002 50 µmol/ml; EPO 1000 IE/ml Medium; LY294002 50 µmol/ml + 1000 IE EPO/ml Medium) nach 5 Tagen in Kultur dar. ***, p<0,001.

3.3.2.3 Der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk hat keinen Einfluß auf EPO-vermitteltes Neuritenwachstum

Um zu klären, ob die EPO-vermittelte neuronale Regeneration von EPO-induzierten anti-apoptotischen Vorgängen zu trennen ist, wurde bei drei Retinakulturen der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (Promega, Mannheim) in einer Konzentration von 20 µmol/ml zum Medium zupipetiert. Die Caspasen-Inhibition bewirkte keinerlei Wachstumsförderung, weder in Anzahl, noch in Länge, gegenüber den Kontrollpräparationen (Diag.7a+b).

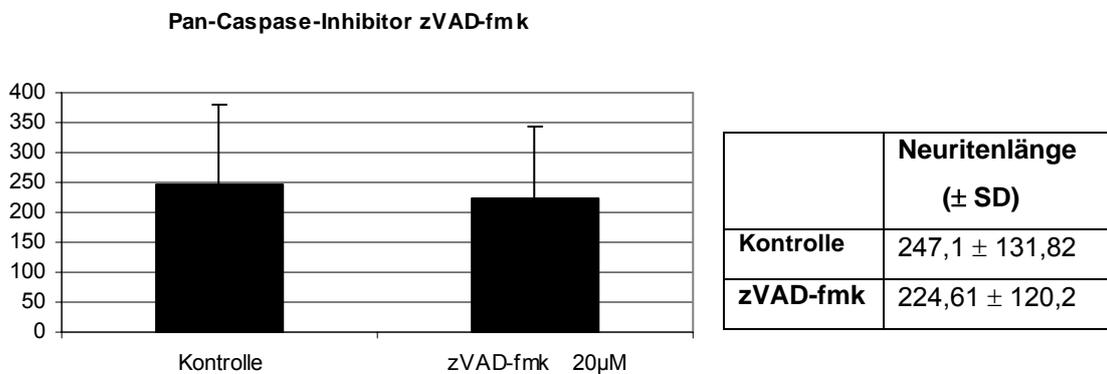


Diagramm 7a): Neuritenlänge pro 100 µm retinalem Streifen.

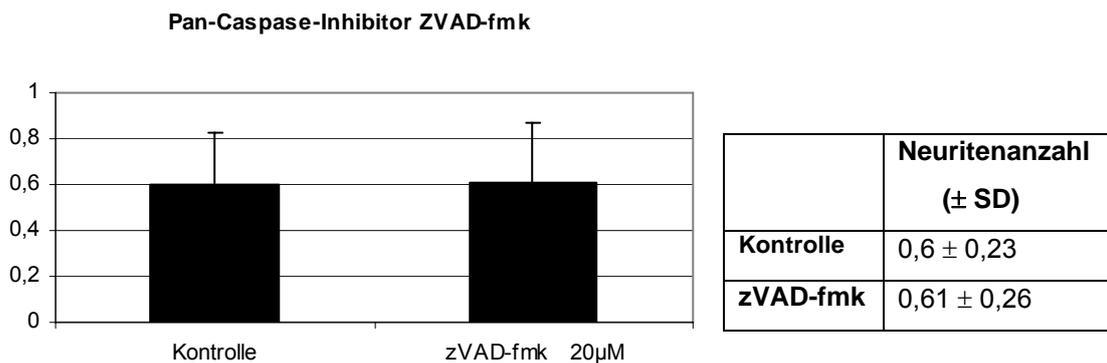


Diagramm 7b): Neuritenanzahl pro 100 µm retinalem Streifen.

Diagramm 7: Die Säulen stellen die mittlere Neuriten-Länge (a) bzw -Anzahl (b) pro 100 µm nach ZVAD-fmk-Zugabe zum Medium gegen Kontrolle dar. ***, p<0,001.

3.4 Ad.Bcl-X_L stimuliert neuronales Wachstum *in vivo*

Um das regenerative Potential von EPO mit der durch Bcl-X_L-Überexpression mittels adenoviraler Vektoren (Ad.Bcl-X_L) erzielten Stimulation axonaler Regeneration zu vergleichen, wurden fünf Präparationen aus Virus-transduzierten Retinae nach ON-Schädigung erneut 5 Tage kultiviert, fixiert und ausgewertet. Dabei zeigte sich für die Bcl-X_L-behandelten Präparate gegenüber den Kontrollretinae nach ON-Läsion eine Wachstumsverstärkung um das 10-fache in der Länge (von 233,72 µm/100 µm Basis auf 2535,72 µm/100 µmBasis) und um das 3,5-fache in der Anzahl (von 0,96/100 µm Basis auf 3,69/100 µm Basis; Signifikanz von $p \leq 0,001$ für die Länge und eine Signifikanz von $p \leq 0,001$ für die Anzahl der neu generierten Neuriten; Diag.8a+b). Toxische Effekte oder Zeichen einer inflammatorischen Reaktion des retinalen Gewebes auf das Virus konnten in keinem Fall beobachtet werden. Die neu ausgewachsenen Axone färbten sich stark an und erschienen ebenfalls kräftiger und dicker als die wenigen dünnen Neuriten der Kontrollpräparationen. Auffällig war das arkadenförmige Wachstum der Neuriten aus Bcl-X_L-transduzierten Retinae, die häufig einen bogenförmigen Verlauf zurück zum Ursprungstreifen annahmen (Abb.6).

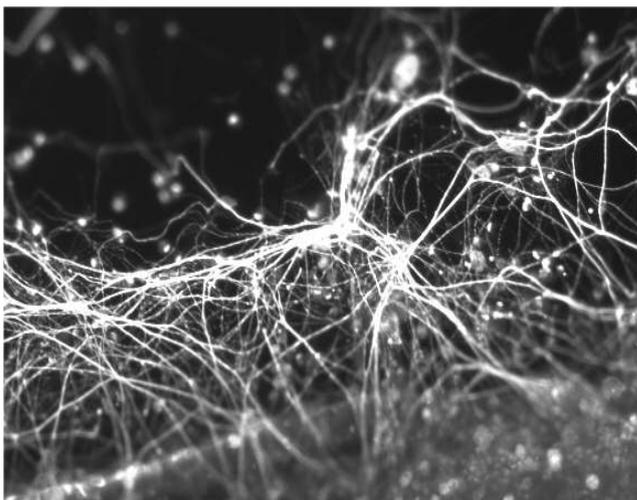


Abb.6. Ausschnitt einer Retina nach ON-Axotomie und Ad.Bcl-X_L Vektor-Transduktion; deutlich verstärktes Neuritenwachstum in Länge und Anzahl, bogenförmiges Auswachsen; dicker imponierende Axone.

Abbildung 6: Das Bild zeigt eine Bcl-X_L- behandelte Retina nach 5 Tagen in Kultur (SMI-31/Alexa Fluor 488 – Färbung; Objektiv 20x).

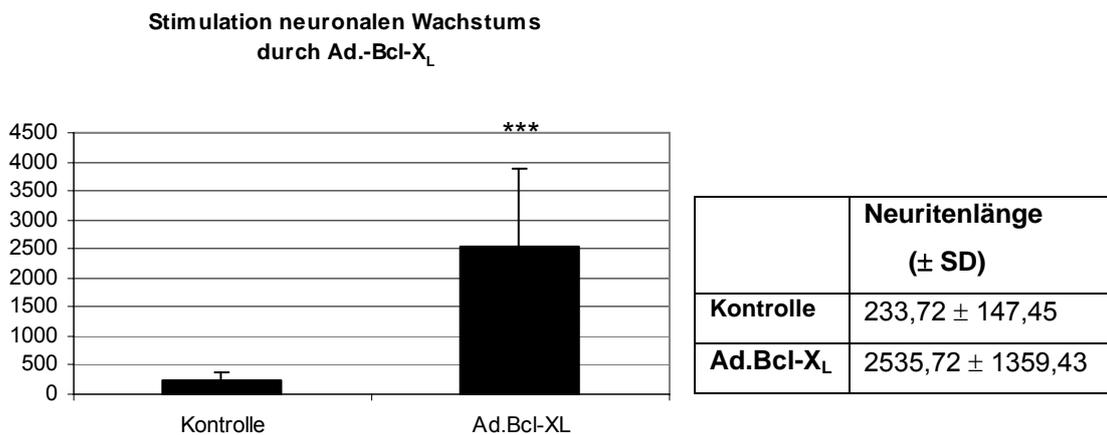


Diagramm 8a): Neuritenlänge pro 100 μm Basis retinalem Streifen.

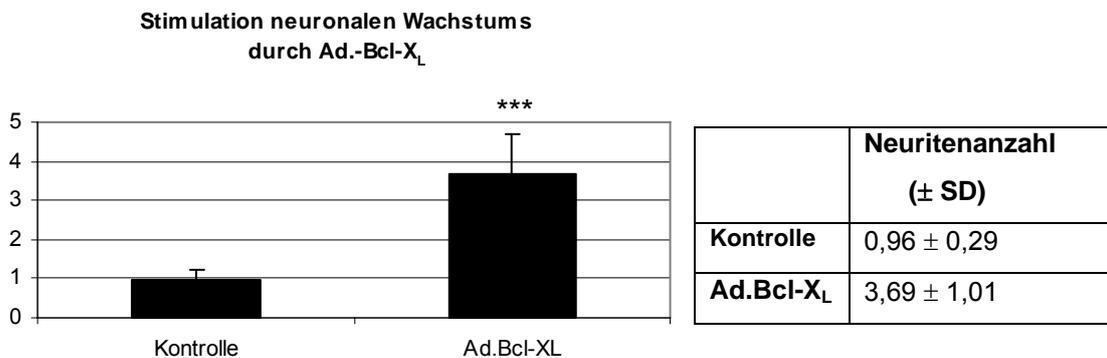


Diagramm 8b): Neuritenanzahl pro 100 μm Basis retinalem Streifen.

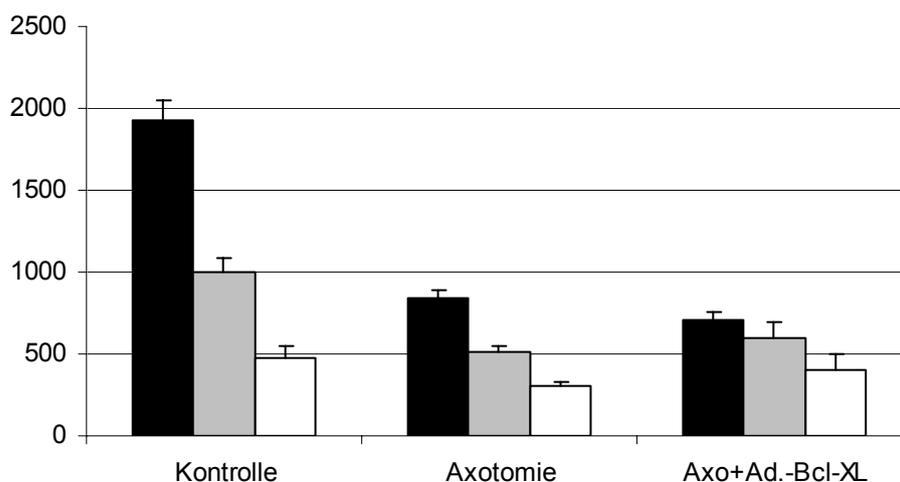
Diagramm 8: Die Säulen stellen das mittlere Neuritenwachstum in Länge (a) und Anzahl (b) nach Axotomie und Ad.Bcl-X_L-Behandlung gegen Kontrolle dar. ***, p<0,001.

3.5 Ad.Bcl-X_L führt zu keiner signifikanten Zellrettung retinaler Ganglienzellen *in vivo*

Die Quantifizierung Dil-markierter retinaler Ganglienzellen nach Axotomie (mit oder ohne weitere Vektorbehandlung) ergab, daß Ad.Bcl-X_L geringfügiger als EPO zum Überleben der RGZ beiträgt. Die virustransfizierten Retinae zeigten in diesem Modell und zu diesem Zeitpunkt keinen signifikant höheren Anteil an

vitalen Zellen als die kontrollaxotomierten Retinae (Diag.9), wobei einschränkend zu sagen ist, dass spätere Versuche der Arbeitsgruppe zum Überleben von RGZ nach Bcl-X_L-Transduktion in einem *in vivo* Modell (19 Tage nach Läsion) zu einer signifikanten Zellrettung führten (Kretz et al., 2004b). Möglicherweise muß ein transientser Effekt der neuronalen Zellrettung durch Bcl-X_L diskutiert werden, der in diesem speziellen *in vitro* Modell nicht erfasst werden konnte. Die Zellquantifizierung erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Protokoll in 3 verschiedenen radialen Abständen zur Papille (Abb.7). Da das Gewebe in allen Präparationen ähnlich aussah, konnten toxische Effekte des Virus als Ursache für eine mögliche Aufhebung eines protektiven Einflusses auf die RGZ weitestgehend ausgeschlossen werden.

Anzahl RGZ/mm² Retina



	R1/6 Anzahl RGZ ± SD	R3/6 Anzahl RGZ ± SD	R5/6 Anzahl RGZ ± SD
Kontrolle	1929,97 ± 123,68	998,56 ± 84,77	479,36 ± 73,0
Axotomie	839,17 ± 48,1	509,1 ± 35,13	304,63 ± 20,04
Axotomie+Ad.-Bcl-X_L	706,18 ± 52,18	592,23 ± 101,32	399,95 ± 105,58

Diagramm 9: Die Säulen stellen die Anzahl durchschnittlich überlebender retinaler Ganglienzellen pro mm² Retina dar; (Kontrolle = keine ON-Läsion,

unbehandelt; Axotomie = ON-Läsion, unbehandelt; Axotomie + Ad.Bcl-X_L = ON-Läsion, Ad.Bcl-X_L -behandelt), gemessen in 3 radialen Abschnitten von innen (r1/6) nach aussen (r5/6). ***, p<0,001.

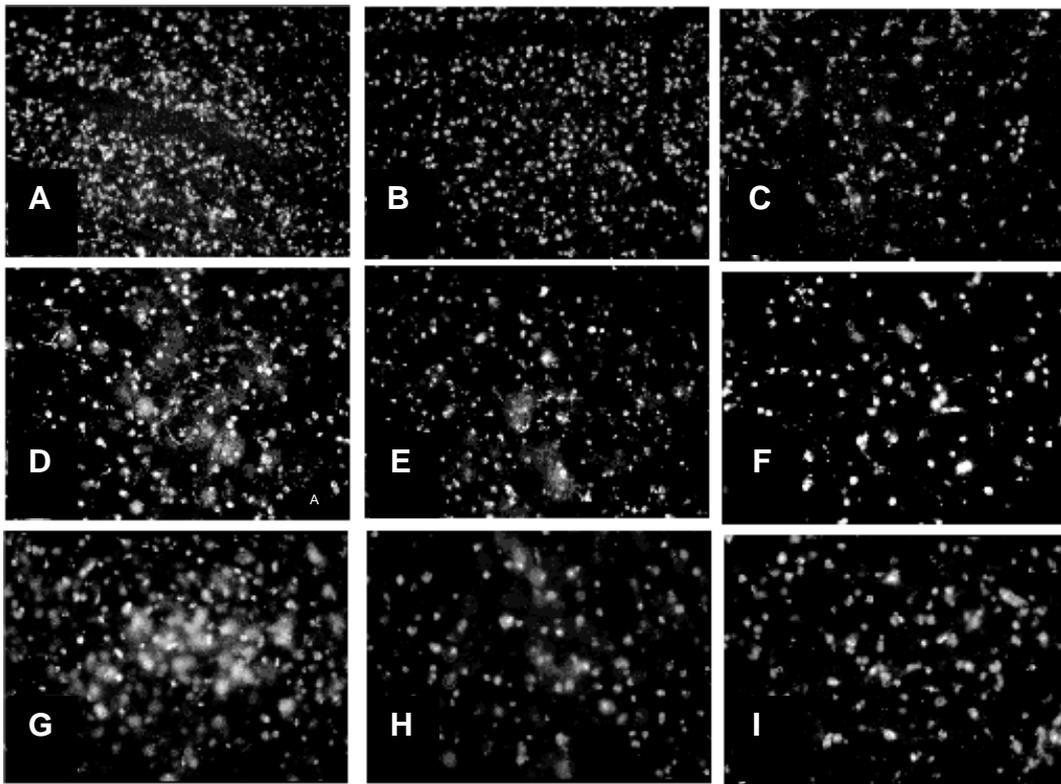


Abbildung 7: Repräsentative Ausschnitte aus den Ganglienzellschichten Dil-gefärbter Retinae; nicht operierte Kontrolle, r1/6, r3/6, r5/6 (A-C) ; nach Axotomie, r1/6, r3/6, r5/6 (D-F) ; nach Axotomie, Ad.Bcl-X_L -behandelte Retina, r1/6, r3/6, r5/6 (G-I).

(Dil-Markierung, zusätzlich SMI-31/Alexa Fluor 488 Färbung; Objektiv 10x)

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das hämatopoietische Zytokin EPO konzentrationsabhängig neuronales Wachstum induziert und das Überleben retinaler Ganglienzellen nach Schädigung fördert. Zusätzlich konnten als Mediatoren dieser Signalübertragungen sowohl das STAT3 als auch die p44/42MAPK durch Expressionsanalysen und Kulturreihen bestimmt werden. Für das Proto-Onkogen Bcl-X_L konnte ebenfalls eine signifikante Bedeutung für Neuroregeneration, jedoch nicht für Zellüberleben, in diesen Versuchen festgestellt werden.

4.1 Regenerationsfördernde und anti-apoptotische EPO-Effekte

4.1.1 Regeneratives Potential von Erythropoietin

Bei Zugabe von EPO zu kultiviertem Retinagewebe ins Medium zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme des neuronalen Auswachsens (Diagramm 1), sowohl in Bezug auf die Gesamtlänge der neugebildeten Neuriten, wie auch auf die Anzahl an Neuriten pro Basisabschnitt, nach 5 Tagen in Kultur. Im Vergleich zu unbehandelten, läsionierten Kontrollen erreichten die Werte für den Längenzuwachs durchschnittlich das 10-fache des Ausgangswertes unter Stimulation mit 1000 IE EPO/ml Medium, sowie das 2,5-fache des Ausgangswertes bezüglich der Neuritenanzahl. Damit zeigt sich für EPO ein signifikantes neuroregeneratives Potential 10 Tage nach Schädigung der Nervenzellen, wobei eine signifikante Stimulation der Regeneration bereits ab 10 IE/ml beobachtet wurde.

Die an einer limitierten Zahl von Präparationen getestete Konzentration von 10000 IE/ml EPO ergab keinen Anhalt auf eine weitere Wachstumsstimulation, sodaß möglicherweise bei 1000 IE/ml eine Rezeptorsättigung vorliegt; eine Limitierung durch das zellintrinsische Wachstumsverhalten ist ebenfalls

möglich. Die *in vitro*-Applikation von EPO erfolgte zum Tag 13 nach Läsion, d.h. mit deutlicher Latenz zur RGZ-Deafferenzierung.

Die intravitreale Injektion von 4 x 2 µl Zytokinlösung (1000 IE/300 µl), entsprechend je ~6,6 IE EPO, über einen Zeitraum von 10 Tagen erhöhte die neuronale Regeneration in Kultur um das 5-fache in Länge und das Doppelte in der Anzahl im Vergleich zu den läsierten, unbehandelten Kontrollen (Diagramm 2). Zum Ausschluß möglicher endogener regenerativer Prozesse wurden ebenfalls Kontrollgruppen gebildet, die zeitgleich jeweils 2µl PBS erhielten. Diese Gruppe wies keine signifikante Regeneration auf. Es ist nicht auszuschließen, daß eine höhere Konzentration von EPO das Regenerationsvermögen *in vivo* nach Läsion noch verstärkt hätte. Ebenso hätte eine höhere Injektionsfrequenz bei einer Plasma-HWZ von ca. 6h möglicherweise positive Effekte erzielen können. Da die wiederholte Narkotisierung und Augenpunktion aber eine gravierende Belastung und Gefährdung der Tiere (erhöhtes Verletzungs- und Infektionsrisiko durch die Mikropunktionen, erhöhtes Risiko des Versterbens der Tiere bei wiederholter Narkose) bedeutet hätte, wurde auf eine derartige Versuchsreihe verzichtet. Die *in vivo*-Behandlung wurde unmittelbar nach der Läsion begonnen.

Insgesamt zeigte sich, dass eine frühe Behandlung läsierten Nervenzellen mit EPO schon in niedriger Dosis zu deutlichen regenerativen Effekten führt, und dass eine späte Behandlung ebenfalls erfolgreich ist, wobei hier aber ein höherer Plasmaspiegel erforderlich ist. Damit präsentiert sich EPO als Agens mit großem therapeutischem Fenster, das eine gute Möglichkeit der Anwendung insbesondere auch nach Traumen in der klinischen Therapie bieten könnte.

4.1.2 Anti-apoptotisches Potential von Erythropoietin

Die Auswertung der Dil-gefärbten, überlebenden RGZs ergab, daß eine einmalige Zytokinapplikation von 1000 IE/ml Medium in Kultur 10 Tage nach Läsionierung des ON einen zellrettenden Einfluß ausübt. In allen drei gemessenen radialen Abschnitten eines Retinastreifens fanden sich nahezu

doppelt so viele überlebende Ganglienzellen verglichen mit Retinastreifen nach ON-Läsion ohne EPO Behandlung (Diagramm 3). Damit überleben unter Zytokinbehandlung immerhin die Hälfte der RGZ in Tieren mit ON-Läsion, gemessen an unläsionierten Kontrollen; ohne Zytokinbehandlung überlebt nur ein Viertel aller RGZ nach Crush. Andere Arbeitsgruppen hatten bereits für EPO deutliche neuroprotektive Effekte *in vivo* und *in vitro* gezeigt (Weishaupt et al., 2004; Grimm et al., 2004). Zellüberleben ist eine Voraussetzung für eine axonale Regeneration; allerdings zeigen die Versuche mit dem Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk, dass die Zellrettung alleine nicht ausreichend ist, um das Zellwachstum zu induzieren. Um individuelle Schwankungen der RGZ-Anzahl von Tier zu Tier auszuschließen, wurde jeweils das andere Auge als unbehandelte Kontrolle in Kultur genommen und ausgewertet. Die Werte für unläsionierte Ganglienzellen (~2028 RGZ/mm²) waren im Einklang mit bereits ermittelten Werten in vorangegangenen Arbeiten (~2084 RGZ/mm²; Isenmann et al., 1997; Schmeer et al., 2002). Die Abnahme der Zellzahl von zentral nach peripher blieb unter allen Bedingungen bestehen, sodaß artifizielle präparationsbedingte Zellverluste weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Diese Versuchsreihe gestaltete sich als schwierig, da die kollikulären Dil-Injektionen zu einer Markierung sämtlicher Ganglienzellen führen mussten und zur Beurteilung der Regeneration zusätzlich eine immunhistochemische Färbung für einen Neurofilament-Marker durchgeführt werden musste. Auch erlaubte das schnelle Ausbleichen des Dil keine allzulange Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop und keine Lagerung der Objektträger über einen Zeitraum von mehr als 3 Tagen.

4.1.3 Regeneratives Potential von Bcl-X_L

Nach Transduktion der Retinae mit Ad.Bcl-X_L nach Axotomie des ON ergab sich eine Regenerationssteigerung der Neuriten um das 10-fache in der Länge sowie um das 3,5-fache in der Anzahl im Vergleich zur unbehandelten, axotomierten Kontrolle nach 5 Tagen in Kultur (Diagramm 8). Damit erzielt die Bcl-X_L-Überexpression ähnlich hohe Werte für die Längenregeneration wie die

Behandlung mit 1000 IE EPO/ml Medium, ebenfalls ohne Zeichen der Toxizität; in Bezug auf die Neuritenanzahl übertrifft das Bcl-X_L die EPO-Applikation sogar. Da EPO stärker neuroprotektiv als Bcl-X_L wirkt, ist dies ein weiteres Argument dafür, dass das Überleben neuronaler Zellen über andere Wege reguliert wird, als die Neuroregeneration. In Anlehnung an aus dem hämatopoietischen System bekannte Signalkaskaden-Aktivierungen kommt Bcl-X_L als Zielgen EPO-vermittelter Regeneration in Frage. Vergleichbare Resultate hier sprechen dafür, dass EPO über eine Induktion von Bcl-X_L regenerationsfördernd wirksam ist.

4.1.4 Anti-apoptotisches Potential von Bcl-X_L

Die Auswertung der Dil-markierten RGZ nach Axotomie mit und ohne Vektorbehandlung zeigte für Bcl-X_L keinen nennenswerten Effekt in Bezug auf die Zellrettung (Diagramm 9); die Kontroll-Axotomiegruppe unterschied sich nach 5 Tagen in Kultur in ihrer Zellzahl nicht von der vektorbehandelten Gruppe. Zytotoxische Effekte durch das Virus als Ursache für ein Zellabsterben sind weitestgehend ausgeschlossen, da sich das retinale Gewebe nach Virustransduktion optisch nicht von dem unbehandelten Gewebe unterschied, nicht inflammatorisch verändert erschien, und keine verstärkten Zeichen der Zersetzung oder Gewebsschädigung aufwies. In der Literatur finden sich jedoch mehrere Arbeiten, die eine neuroprotektive Wirkung von Bcl-X_L dokumentieren (Cao et al., 2002; Kilic et al., 2002). Mögliche Erklärungsansätze für diese Diskrepanz können sein:

1. ein generell kurzer Zeitraum der durch den adenoviralen Vektor regulierten Genexpression in Zielzellen nach Vektorinjektion;
2. ein Zellrettungseffekt von transientser Natur, der ggf. zu einem früheren Zeitpunkt detektierbar gewesen wäre;
3. das hier verwendete, spezielle experimentelle Modell, welches durch die anschließende Explantation der Retinae und der Kultur der RGZ über 5 Tage einen zusätzlichen Streß für die bereits axotomierten RGZ zur Folge hat.

4.1.5 Vergleich der regenerativen Effekte von Erythropoietin und Bcl-X_L

Zunächst ist festzustellen, daß sowohl das Zytokin EPO wie auch das adenoviral exprimierte, transgene Bcl-X_L eine signifikante Stimulation der Neuroregeneration bewirken. Bei beiden Paradigmen konnte durchschnittlich eine 10-fache Steigerung des Summenlängenwachstums neu generierter Nervenfasern erzielt werden.

Obgleich diese Experimente keine Aussage über Ergebnisse auf längere Sicht erlauben, da die Untersuchungen einen begrenzten Zeitraum von 10-14 Tagen nach Läsion umfassen, gibt es Anzeichen für eine gute Langzeitprognose der EPO-Behandlung, die im Hinblick auf das funktionelle Ergebnis optimistisch stimmen. Langzeitversuche werden im Weiteren nötig sein, um endgültige Aussagen über eine anhaltende Zellrettung und Neuroregeneration zu treffen.

Methodische Unterschiede zwischen Zytokin-Behandlung und Virus-Transduktion lagen insbesondere in der Applikationsform und in dem zeitlichen Applikations- bzw. Expressions-Schema. Die Zytokinapplikation erfolgte direkt und dann wiederholt zu den Tagen 3, 6 und 9 nach Läsion intravitreal bzw. 13 Tage nach Läsion zum Kulturmedium, wohingegen der Vektor unmittelbar nach der Läsion des ON direkt auf den Nervenstumpf gegeben wurde. Allerdings ist daraus nicht unbedingt zu schließen, daß der Vektor eine sofortige Applikation nach Läsion erfordern würde; frühere Versuche der Arbeitsgruppe haben bei Transduktion des Vektors zum Medium zum Tag 13 nach Läsion ebenfalls signifikante Wachstumserfolge festgestellt, die z.T. diejenigen direkt nach Axotomie überschritten. Allerdings waren hierzu höhere Vektorkonzentrationen erforderlich, (Endkonzentration im Kulturmedium $4,0 \times 10^9$ pfu/ml), weshalb der Applikationsform nach Axotomie den Vorzug gegeben wurde.

Trotz guter Resultate stellt die Vektor-basierte Strategie weiterhin eine weitgehend experimentelle Methode dar, deren klinische Erprobung aufgrund von möglichen Nebenwirkungen wie lokaler Entzündungsreaktion, einer unklaren Dauer und Stabilität der Genexpression weiterhin zurückhaltend behandelt wird. Im Gegensatz dazu gewinnt das klinisch vielfältig erprobte, systemisch applizierbare EPO an Attraktivität. Nach mehr als 15 Jahren Erfahrung mit dem Zytokin ist es weitaus näher an der Möglichkeit eines

Einsatzes auch bei neurologischen Erkrankungen und Traumata, insbesondere seit der Entdeckung, daß systemisch appliziertes EPO die Blut-Hirn-, Blut-Retina- und Blut-Rückenmark-Schranke passieren kann (Brines et al., 2000); eine erste klinische Studie mit EPO in der Therapie des Schlaganfalles wurde bereits durchgeführt (Ehrenreich et al., 2002) und zeigt erste Erfolge in Bezug auf Läsionsgröße und funktionelle Einbußen. Das Spektrum der Nebenwirkungen ist bekannt und somit einschätzbar, insbesondere seit neue, synthetische EPO-Derivate wie carbamyliertes EPO auf den Markt gekommen sind, die rein zytoprotektive Wirkkomponenten aufweisen, ohne jedoch einen Einfluß auf die Erythropoiese zu haben, und damit keine Steigerung des Hämatokrits mit konsekutivem Hypertonus oder potentieller Thrombemboliegefahr mit sich bringen (Leist et al., 2004). Zudem sind EPO-Applikationen gut steuerbar und gut verträglich. Nicht zuletzt kann rekombinantes EPO kostengünstiger hergestellt werden als virale Vektoren.

4.2 Signalvermittlung neuroprotektiver und regenerationsfördernder EPO-Effekte

4.2.1 Regulation EPO-vermittelter Neuroregeneration; Inhibitorversuche

Zur Bestimmung der Signalkaskaden, über die EPO-induzierte Neuroregeneration vermittelt wird, wurden in Kultur Versuche mit diversen Inhibitoren durchgeführt. Für Erythropoietin-abhängige Vorläuferzellen konnte eine Induktion von Bcl-X_L durch STAT5 gezeigt werden (Silva et al., 1999); andere Versuche wiederum deuten auf eine Funktion des PI3K/Akt-Signalweges für EPO-vermittelte Zellrettung hin (Ruscher et al., 2002; Weishaupt et al., 2004). Aus diesem Grund wurden Präparationen kurz vor EPO-Applikation mit jeweils einem Jak-2/STAT3-Inhibitor (AG 490) oder dem PI3K-Inhibitor LY 294002, der sich gegenüber dem PI3K-Inhibitor Wortmannin durch eine höhere Permeabilität und Spezifität auszeichnet, versetzt. Zum Ausschluß einer verstärkten Regenerationskapazität ausschließlich durch Apoptosehemmung wurden Präparationen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor

zVAD-fmk behandelt. Da die Inhibitoren in DMSO aufgelöst waren, wurde jeweils eine Kontrollpräparation mit einer äquimolaren DMSO-Menge durchgeführt, um einen möglichen Einfluß dieser Trägerlösung auf die Regenerationsfähigkeit der kultivierten Gewebe auszuschließen (Shimizu et al., 1997). Es konnte jedoch kein Effekt auf die Regeneration festgestellt werden. Es zeigte sich, daß die pharmakologische Inhibition von Jak-2/STAT3 durch AG 490 die EPO-vermittelte Regeneration von Neuriten komplett blockiert (Diagramm 4); bei der Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges durch LY 294002 wurde erst eine Teilhemmung der unstimulierten, basalen sowie der EPO-vermittelten Regeneration erreicht (Diagramm 5); in höheren Konzentrationen (50µmol/ml) stellte sich jedoch eine komplette Inhibition dieser Regeneration. Erklärbar wäre diese Teilhemmung der EPO-vermittelten Regeneration, wenn man sie als LY 294002-induzierte Inhibition des intrinsischen, anti-apoptotischen PI3K-Signalweges ansieht. In anderen Arbeiten war nach Läsion von RGZ eine deutliche Abnahme in der Anzahl überlebender Zellen nach LY 294002-Gabe gezeigt worden, die darauf zurückgeführt wurde, daß der pharmakologische PI3K-Inhibitor intrinsische neuroprotektive Mechanismen unterbindet (Nakazawa et al., 2003). Bei Steigerung der Inhibitorenkonzentration wurde letztlich ebenfalls ein Abfall der Regeneration auf das Ausgangsniveau erreicht (Diagramm 6). Damit erscheinen beide Signalwege, nämlich sowohl PI3K/Akt wie auch Jak-2/STAT3, zur Vermittlung neuroregenerativer Signale durch EPO beizutragen. Eine Verschaltung beider Signalkaskaden ist ebenfalls nicht auszuschließen. In T-Zellen konnte gezeigt werden, daß Inhibition von PI3K durch LY 294002 einerseits die Aktivierung von MAPK blockiert, und andererseits auch die Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT3 (aber nicht STAT5) verringert, was den Schluß zuläßt, daß diese Signalkaskaden nahe miteinander verknüpft sind (Fung et al., 2003). Der Zusammenhang zwischen Regenerationsfähigkeit und Überleben ist jedoch nicht vollständig geklärt. Versuche mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk zeigten zwar, daß das Regenerationspotential durch die Hemmung der Apoptosekaskade nicht beeinflusst wird, dh. keine verstärkte Regeneration auftritt, wenn Caspasen gehemmt werden. Dennoch schließt dies nicht

zwingend aus, daß Neuroregeneration und Neuroprotektion wenigstens zum Teil über gleiche Signalkaskaden vermittelt werden können, was insofern naheliegt, als das Zellüberleben Grundvoraussetzung für eine weitere Axonrestitution ist. So ist z.B. Caspase 9 ein Ziel von PI3K/Akt (Wang et al., 2003), und durch Aktivierung dieses Signalweges werden Caspase-Kaskaden zum Teil gehemmt. So war auch unter EPO-Behandlung nicht nur eine Regeneration der Neuriten (durch die Inhibitorenversuche zumindest zum Teil sicher dem PI3K/Akt-Signalweg zuzuordnen) festzustellen, sondern ebenfalls ein in den Dil-Färbungsversuchen gezeigtes anti-apoptotisches Potential des Zytokins. Man kann also vermuten, daß über den PI3K/Akt-Signalweg sowohl die regenerativen als auch die anti-apoptotischen Signale vermittelt werden. Dies läßt aber eine Vermittlung über verschiedene weitere Mediatoren und eine Verknüpfung zu anderen Signalkaskaden vermuten, insbesondere auch, da die EPO-induzierte Regeneration nur inkomplett gehemmt wurde.

4.2.2 Regulation EPO-vermittelter Neuroregeneration; Western Blots

Entsprechend den Versuchen in Kultur ergaben auch die Expressionsanalysen im Western Blot einen Zusammenhang zwischen EPO-vermittelter Regeneration und dem Jak-2/STAT3-Signalweg. Die genauere Unterscheidung durch die drei verschiedenen STAT-Antikörper konnte zeigen, daß nicht STAT1 oder STAT5, wohl aber STAT3 nach EPO-Applikation induziert wird (Abbildung 5a). Das phosphorylierte, also aktive STAT3 zeigte sich ausschließlich in den protektiv behandelten Retinae, d.h. sowohl nach EPO- wie auch nach Bcl-X_L-Applikation, hochreguliert. Nachdem nun diskutiert worden ist, daß EPO sowohl neuroprotektiv als auch neuroregenerativ wirksam ist, Bcl-X_L jedoch weitgehend vor allem regenerative Effekte in läsionierten Retinae *in vitro* aufgewiesen hat, und beide STAT3 zu regulieren scheinen, kann man nun vermuten, daß über den Jak-2/STAT3-Signalweg vornehmlich die den beiden Mediatoren eigenen regenerativen Effekte laufen.

Auch in den Western Blots gegen MAPK und Phospho-MAPK zeigten sich Änderungen in der Regulierung nach protektiver Behandlung läsionierter Zellen. Eine Hochregulierung der Phospho-MAPK konnte nachgewiesen werden in

Lysaten aus EPO-behandelten Retinae und in Ad. Bcl-X_L-transduzierten Retinae. Somit scheint auch der MAPK-Signalweg durch Einsetzen protektiver Substanzen aktiviert zu werden. Am peripheren Nerven wurde in anderen Untersuchungen ebenfalls eine Hochregulierung sowohl von STAT3 wie auch von MAPK nach Läsion als intrinsischer Mechanismus festgestellt, womit tatsächlich eine Bedeutung beider Signalkaskaden bestätigt zu sein scheint (Sheu et al., 2000). Interessanterweise war in diesem Fall die Phosphorylierungszeit und Expressionsdauer beider Regulatoren unterschiedlich. Somit ist zu überlegen, ob nicht nur ein einzelner Weg letztendlich regenerativ oder protektiv auf geschädigtes Nervengewebe wirkt, sondern vielmehr mehrere Signalkaskaden mit unterschiedlicher Kinetik ineinandergreifen und dadurch über ein breiteres Feld schützend in das Zellgeschehen eingreifen können. Dies zu klären bedarf es weiterer Untersuchungen, die insbesondere zu verschiedenen Zeitpunkten die Hochregulierung einzelner Regulatormoleküle und deren Interaktionen untersuchen.

4.3 Rolle von Bcl-X_L für die Erythropoietin-vermittelte Neuroregeneration

Um zu bestimmen, welche Rolle Bcl-X_L im Zusammenhang mit EPO bei der Regeneration der Neuriten spielt, wurden Western Blots gegen Bcl-X_L an Proben aus EPO-behandelten Retinae durchgeführt (Abbildung 5c). Diese zeigten eine leichte Herunterregulierung von Bcl-X_L in läsierten Retinae, übereinstimmend mit früheren Beobachtungen (Isenmann et al., 1997), und eine Hochregulierung des Proteins in EPO-behandelten Retinae. Dies bestätigt, daß die EPO-Behandlung mindestens über einen, wenn nicht über mehrere Signalwege Bcl-X_L hochreguliert, wobei STAT3 eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Diese mögliche Verschaltung von STAT3 und Bcl-X_L korreliert auch mit früheren Ergebnissen an anderen Zellarten, die zeigten, daß STAT3 an den Promoter des *bcl-x_L*-Genes binden kann; so konnte in Myelomzellen nach Inhibition von STAT3 eine Hemmung der Bcl-X_L- Expression nachgewiesen

werden (Catlett-Falcone et al., 1999); in Gliomzellen wurde durch Inhibition von STAT3 das Zellüberleben drastisch gesenkt, was mit einer Herunterregulierung von Bcl-X_L korrelierte (Konnikova et al., 2003). Auch in läsierten Motoneuronen wird eine Bcl-X_L Hochregulierung über STAT3 induziert (Schweizer et al., 2002). Zusammen mit den Versuchen, die eine STAT3-Aktivierung über EPO nachgewiesen haben (Kirito et al., 2002), ergibt sich ein Bild, das Bcl-X_L als potentielles Ziel von EPO aufweist, zumindest, was die regenerative Wirkung angeht.

Auch wenn Bcl-X_L in Kultur nur gering neuroprotektiv wirkt, so zeigen doch unsere *in vivo* Daten, daß Bcl-X_L im Axotomiemodell ebenfalls zellrettend auf RGZ wirkt (Kretz et al., 2004b).

Ein Erklärungsansatz wäre, den Faktor Zeit genauer zu untersuchen. Durch den Caspasen-Inhibitionsversuch (Diagramm 7) liegt nahe, daß Bcl-X_L-vermittelte Regeneration und Protektion über zwei voneinander unabhängige, eventuell zeitlich unterschiedlich induzierbare Wege ablaufen. Möglicherweise konnte die Apoptose-Inhibition in unserem Modell nicht erkannt werden, weil die zeitliche Latenz von ca. 10 Tagen *in vivo* und weiteren 5 Tagen in Kultur in den Rahmen des regenerativen Potentials für Bcl-X_L fiel, diejenige für protektive Effekte jedoch eventuell schon überschritten war. Die meisten bekannten Versuche, die zum Vergleich vorliegen, untersuchen über einen kürzeren Zeitraum und selten an *in vivo* Modellen. Um dies zu klären, müßten Versuche zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden, ohne primäre Berücksichtigung der regenerativen Effekte; schließlich erwies sich im reinen *in vivo*-Modell auch bei uns Bcl-X_L als neuroprotektiv.

In diversen Versuchen mit transgenen Tieren konnte ebenfalls die Bedeutung der Bcl-Familie für neuronales Überleben gezeigt werden; während die meisten transgenen Tiere Bcl-2 in ihrer normalen Entwicklung nicht zwingend benötigen, unterliegen Bcl-X_L-defiziente Tiere massiven Apoptosevorgängen in unreifen Neuronen (Motoyama et al., 1995). Im Gegensatz dazu scheinen transgene Tiere, die Bcl-2 überexprimieren, in hohem Maße vor induziertem Zelltod geschützt zu sein, auch bei adulten Säugern (Cenni et al., 1996). Es ist daher davon auszugehen, dass auch hier ein komplexes Netzwerk besteht, und ein

Zellüberleben nur durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren zustande kommt.

4.4 Rolle von STAT3 für die Erythropoietin-vermittelte Neuroregeneration

Frühere Untersuchungen zu STAT-Aktivierung durch EPO haben unterschiedliche Ergebnisse gezeigt. Mehrere Arbeiten fanden eine STAT5-Aktivierung durch EPO (Silva et al., 1999), andere hingegen konnten eine STAT3-Aktivierung über den EPO-R nachweisen (Kirito et al., 2002). Die Gründe für diese Unterschiede sind nicht klar; die meisten Versuche wurden an hämatopoietischen Zelllinien durchgeführt. Unsere Versuche legen nahe, daß im Falle der RGZ die EPO-induzierte Hochregulierung des regenerativen und per se auch protektiven Bcl-X_L über STAT3, weniger über STAT5, mediiert wird. Interessant ist in dieser Hinsicht, daß Neurotrophine wie das CNTF ebenfalls über STAT3 wirken (Peterson et al., 2000). In jedem Fall wurde gezeigt, daß eine Bindung von EPO an den klassischen EPO-R nicht unbedingt eine Voraussetzung ist, weder für die EPO-vermittelten hämatopoietischen, noch für die zytoprotektiven Effekte (Leist et al., 2004). Insbesondere ist anzumerken, daß CNTF das STAT3 in der Retina nur in den Ganglienzellen, nicht aber in den Photorezeptoren stimuliert, was als Hinweis für die Selektivität dieser Signalvermittlung gewertet werden kann (Peterson et al., 2000). Weiterhin ist davon auszugehen, dass die Regulation protektiver Prozesse komplex ist und ein Netz interagierender Faktoren und Signaltransduktionskaskaden umfasst. Schließlich erscheint es wahrscheinlich, dass ein definierter Faktor in verschiedenen Geweben und Zelltypen unterschiedliche Signalwege aktivieren kann.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß EPO nicht ausschließlich direkt auf Jak-2/STAT3 wirkt, sondern über einen unbekanntem Mechanismus mit einer Induktion von Neurotrophinen, wie dem CNTF, verknüpft ist. Ein Versuch von Kirsch et al. (2003) wies in Motoneuronen das Vorkommen von CNTF als Voraussetzung für eine STAT3 Hochregulierung nach. Auch in der Arbeit von

Goldman und Nedergaard (2002) wird die Möglichkeit einer EPO-induzierten Stimulierung kapillärer Endothelzellen zur Produktion protektiver Neurotrophine, in diesem Falle BDNF, diskutiert. Diese Befunde bedürfen ebenso weiterer Untersuchungen.

Ein potentielles Risiko im Falle eines längerfristigen Einsatzes von EPO als therapeutisches Agens bei neuronalen Schäden birgt das STAT3 durch seine Funktion im Zellzyklus. Als Mediator der Zellproliferation wird STAT3 physiologischerweise nur vorübergehend phosphoryliert. In vielen Tumorzelllinien findet sich jedoch ein konstant phosphoryliertes STAT3, d.h. ein dauerhaft aktiviertes, proliferativ wirkendes Protein, von dem anzunehmen ist, daß es für die Vermehrung von Tumorzellen, und somit für Tumorwachstum und Invasivität, von Bedeutung ist (Bromberg et al., 1999). Bei Leukämie oder dem hepatozellulären Karzinom konnte daueraktiviertes STAT3 nachgewiesen werden. Wenn nun STAT3 nach EPO-Applikation hochreguliert wird, muß die Frage gestellt werden, welche Konsequenzen das für dessen Rolle als potentiell Onkogen mit sich bringt, und ob eine Therapie mit dem Zytokin möglicherweise tumorinduzierend wirken kann, insbesondere, da Bcl-X_L als Onkogen identifiziert wurde. Um dies auszuschließen, wären Langzeitversuche im Tiermodell nötig – sollte sich diese Möglichkeit bewahrheiten, wäre ein Versuch einer anschließenden Therapie mit STAT-Inhibitoren, wie den PIAS, ein möglicher nächster experimenteller Schritt. Allerdings ist das Risiko einer Tumorentstehung durch temporäre STAT3-Überaktivierung nach EPO-Therapie zum Zwecke einer Limitierung von Neurodegeneration als gering einzuschätzen. Eine Zytokintherapie z.B. nach Schlaganfall verläuft zeitlich befristet (in der vorliegenden Studie von Ehrenreich et al. [2002] drei Tage); eine Hyperkoagulation des Blutes durch EPO sowie die Entwicklung eines Hypertonus sind als Nebenwirkungen allenfalls bei Langzeit-/Dauertherapie zu fürchten, und traten in klinischen Studien bei EPO-therapierten Schlaganfallpatienten ebenfalls nicht auf (Ehrenreich et al., 2002). Selbst eine Dauertherapie mit EPO, wie bei Patienten mit chronischer renaler Anämie, ist generell gut verträglich. Nur bei sehr hohen Dosen wären relevante Nebenwirkungen einer EPO-Gabe zu befürchten. In Tiermodellen wurden

Hämatokritsteigerungen um bis auf das 1,7-fache dokumentiert (Leist et al., 2004).

4.5 Grenzen, Alternativen, Ausblick

Es konnte deutlich gezeigt werden, daß adulte ZNS-Neurone nach einer Läsion, die einem axonalen Trauma entspricht, die Fähigkeit zur Regeneration besitzen. Eine sehr geringe intrinsische Regenerationskapazität kann durch Zugabe von protektiven Agenzien erheblich gesteigert werden. Dabei konnten sowohl für das hämatopoietische Zytokin EPO wie auch für das Vektorvermittelte Proto-Onkogen Bcl-X_L eine bis zu 10-fache Stimulation über das Grundniveau erzielt werden. Diese Ergebnisse lassen die Frage nach einem möglichen klinischen Einsatz zu. Was sind die einschränkenden Faktoren, wo liegen die Möglichkeiten?

Die Forschung an viralen Vektoren macht weiterhin Fortschritte; mit der Generierung neuer Virusgenerationen, wie adenoviralen „gutless“-Vektoren (Hardy et al., 1997), eröffnen sich neue Möglichkeiten, und im Tiermodell hat ein Gentransfer an einem Parkinson-Modell gute Ergebnisse erzielt (Eberhardt et al., 2000). Auch bei den viralen Vektoren sind schon die ersten klinischen Anwendungen erfolgt (Lu, 2004). Zwar bestehen bei den Vektoren noch immer gewisse Probleme und Risiken:

1. eine gezielte Injektion eines Vektors ist nicht immer möglich;
2. es kann zu einer unspezifischen Transduktion auch in gesunden Zellpopulationen kommen;
3. die Vektortherapie kann durch das Transgen oder durch das Vektorgerüst zu inflammatorischen Reaktionen im umliegenden Gewebe führen;
4. die Blut-Hirn-Schranke kann für Partikel mit Virusgröße eine unüberwindbare Barriere darstellen.

Allerdings ist durch die Replikationsdefizienz des viralen Vektors die Gefahr einer unkontrollierten Ausbreitung unterbunden.

Im Gegensatz dazu kann EPO quasi bedarfsadaptiert lokal oder systemisch angewandt und dosiert werden und ist klinisch bereits erprobt; doch auch hier gilt: trotz seiner hohen Effizienz und Verträglichkeit im klinischen Gebrauch und der aufkommenden Bedeutung auch für die ZNS-Forschung gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch kaum Erfahrungswerte, was die Therapie explizit neurologischer Erkrankungen mit diesem Zytokin angeht. Allerdings läuft seit kurzem eine erste Phase III- Studie zum Einsatz von EPO bei Schlaganfallpatienten, und die Voruntersuchung lässt hoffen, daß das Zytokin in der Therapie nicht nur von Hirninfarkten, sondern auch von weiteren neurologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose oder Rückenmarksverletzung, wirksam ist. Allein bei der Erforschung des Einsatzes von EPO im ZNS konnten an Gehirn, Rückenmark und Retina positive Ergebnisse in Modellen von Ischämie, Kompression, stumpfen Traumen oder entzündlichen Erkrankungen gezeigt werden (Brines et al., 2000; Junk et al., 2002). Auch über das ZNS hinaus kommt EPO in verschiedenen Geweben inzwischen therapeutisch zum Einsatz (Cai et al., 2003; Buemi et al., 2002).

Für die Kombination verschiedener Strategien sprechen mögliche synergistische Effekte bei günstigerem Nebenwirkungsprofil (Straten et al., 2002; Digicaylioglu et al., 2004). Zu bedenken sind jedoch die prinzipiellen Risiken des Gentransfers (s.o.) sowie möglicherweise kummulierte Risiken bei Eingriffen in den gleichen Signalweg (STAT3 bei EPO und Bcl-X_L). Auch eine Kombination regenerationsfördernder Substanzen mit den gut erforschten Myelin-/bzw. Gliainhibitoren (s.o.) könnte in Zukunft neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

Obwohl eine zurückhaltende Interpretation sicherlich erforderlich ist, kann man hoffen, daß weitere Arbeiten zum besseren Verständnis der molekularen Vorgänge degenerierender und regenerierender Neurone beiträgt. Dieses Verständnis könnte es in Zukunft ermöglichen, Patienten mit neurodegenerativen oder neurotraumatischen Erkrankungen eine neuroprotektive und möglicherweise regenerations-fördernde Therapie ohne unkontrollierbare Nebenwirkungen anzubieten. Schließlich nähern wir uns damit der Frage an, ob das Anfang des letzten Jahrhunderts von Ramon y Cajal

geprägtes Postulat, daß adulte Neurone nach Schädigung unwiderruflich der Degeneration anheim fallen (Ramon y Cajal, 1928), nicht zumindest eingeschränkt revisionsbedürftig ist. Es ist erwiesen, dass adulte ZNS-Neurone unter geeigneten Bedingungen regenerieren können. Dies auch klinisch zu erreichen, bedarf noch umfangreicher weiterer Forschung. Doch sollte angesichts der erfolgversprechenden Ergebnisse dies nicht schrecken, sondern ermutigen, weitere Schritte zu gehen.

Zusammenfassung

Einleitung: Axonale Regeneration nach Trauma gilt im adulten ZNS bis heute als schwer erreichbares Ziel. Um das anti-apoptotische und neuroregenerative Potential des hämatopoietischen Zytokines EPO auf ZNS-Neurone nach Schädigung zu untersuchen, wurden in einem etablierten Zellkulturmodell *in vivo* und *in vitro* RGZ nach Läsion des ON mit EPO in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt, die Ergebnisse mit denen für das anti-apoptotische vektor-vermittelt applizierte Bcl-X_L verglichen, und die Mediatoren der Signaltransduktion untersucht.

Material und Methoden: Zur Schädigung des ON wurde wahlweise axotomiert oder eine *crush*-Läsion gesetzt. RGZ wurden für *in vitro*-Versuche nach Retina-Explantation kultiviert und in steigenden Konzentrationen mit Zytokin behandelt, für *in vivo*-Versuche durch intravitreale EPO-Injektion behandelt und anschließend in Kultur genommen. Vektor-Behandlung erfolgte *in vivo* am ON-Stumpf nach Axotomie. Die Auswertung erfolgte durch Ausmessen der neu generierten Neuriten und durch Auszählung der überlebenden RGZ nach Markierungsfärbung. Mittels Western-Blot-Analysen und Inhibitorversuchen in Kultur wurden die Mediatoren der Signaltransduktion ermittelt.

Ergebnisse: EPO induziert konzentrationsabhängig neuronales Wachstum nach axonaler Schädigung, sowohl nach Applikation *in vivo* als auch *in vitro*, und zwar sowohl nach frühem als auch nach verzögertem Therapiebeginn. Dabei wurde das Wachstum bis auf das 10-fache gegenüber den Kontrollen hinsichtlich der Gesamtstrecke axonüberbrückender Distanzen gesteigert. Bezogen auf die Anzahl regenerierender Neuriten konnte eine Stimulation auf das 2,5-fache respektive 2-fache gegenüber den Kontrollen erzielt werden. Gleichzeitig konnte EPO die Anzahl überlebender RGZ nach Läsion verdoppeln. Als Mediatoren wurden STAT3 (nicht jedoch STAT1 und STAT5) sowie p44/42 MAPK ausgemacht. Für Ad.Bcl-X_L *in vivo* zeigte sich ebenfalls ein deutliches neuroregeneratives Potential mit einer 10-fachen Stimulation der Neuritenlänge und 3,5-fachen Stimulation der Neuritenanzahl gegenüber den

Kontrollen, jedoch konnte kein signifikanter anti-apoptotischer Effekt auf RGZ nach ON-Läsion *in vitro* festgestellt werden.

Diskussion: Es konnte gezeigt werden, daß EPO ein deutliches Potential zur Stimulation von Regeneration und Protektion adulter, geschädigter RGZ besitzt, mit Bcl-X_L als *downstream*-Effektor im ZNS, und daß die übermittelten Signale über STAT3 vermittelt werden, sowie auch über p42/44-MAPK und PI3K, möglicherweise auch über interne Verknüpfungen dieser Signalkaskaden.

Literatur

1. Akira, S. (2000). "Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting." *Oncogene* 19(21): 2607-11.
2. Bellacosa, A., J. R. Testa, et al. (1991). "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region." *Science* 254(5029): 274-7.
3. Bett, A. J., W. Haddara, et al. (1994). "An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19): 8802-6.
4. Biggs, W. H., 3rd, K. H. Zavitz, et al. (1994). "The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway." *EMBO J* 13(7): 1628-35.
5. Bocker-Meffert, S., P. Rosenstiel, et al. (2002). "Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(6): 2021-6.
6. Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." *Cell* 74(4): 597-608.
7. Bonni, A., A. Brunet, et al. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science* 286(5443): 1358-62.
8. Bosch, E., H. Cherwinski, et al. (1997). "Mutations of critical amino acids affect the biological and biochemical properties of oncogenic A-Raf and Raf-1." *Oncogene* 15(9): 1021-33.
9. Boulton, T. G. und M. H. Cobb (1991). "Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies." *Cell Regul* 2(5): 357-71.
10. Brines, M. L., P. Ghezzi, et al. (2000). "Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19): 10526-31.
11. Bromberg, J. F., M. H. Wrzeszczynska, et al. (1999). "Stat3 as an oncogene." *Cell* 98(3): 295-303.
12. Buemi, M., C. Aloisi, et al. (2002). "Recombinant human erythropoietin (rHuEPO): more than just the correction of uremic anemia." *J Nephrol* 15(2): 97-103.

13. Burgering, B. M. und P. J. Coffers (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." *Nature* 376(6541): 599-602.
14. Cai, Z., D. J. Manalo, et al. (2003). "Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury." *Circulation* 108(1): 79-85.
15. Campos, C. B., P. A. Bedard, et al. (2003). "Selective involvement of the PI3K/PKB/bad pathway in retinal cell death." *J Neurobiol* 56(2): 171-7.
16. Cao, G., W. Pei, et al. (2002). "*In Vivo* Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis." *J Neurosci* 22(13): 5423-31.
17. Cara, D. C., J. Kaur, et al. (2001). "Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration and chemotaxis *in vivo*." *J Immunol* 167(11): 6552-8.
18. Catlett-Falcone, R., T. H. Landowski, et al. (1999). "Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells." *Immunity* 10(1): 105-15.
19. Cenni, M. C., L. Bonfanti, et al. (1996). "Long-term survival of retinal ganglion cells following optic nerve section in adult bcl-2 transgenic mice." *Eur J Neurosci* 8(8): 1735-45.
20. Chang, B. S., A. J. Minn, et al. (1997). "Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2." *EMBO J* 16(5): 968-77.
21. Chang, L. und M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* 410(6824): 37-40.
22. Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1997). "Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death." *Science* 275(5303): 1122-6.
23. Clark, E. A. und J. S. Brugge (1995). "Integrins and signal transduction pathways: the road taken." *Science* 268(5208): 233-9.
24. Crowder, R. J. und R. S. Freeman (1998). "Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons." *J Neurosci* 18(8): 2933-43.

25. Dash, P. K., S. A. Mach, et al. (2002). "The role of extracellular signal-regulated kinase in cognitive and motor deficits following experimental traumatic brain injury." *Neuroscience* 114(3): 755-67.
26. David, S., A. J. Aguayo (1981). "Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after cerebral nervous system injury in adult rats." *Science* 214(4523): 931-3.
27. Davies, S.J., J. Silver (1998). "Adult axon regeneration in adult CNS white matter." *Trends Neurosci* 21(12): 515.
28. Decker, T., P. Kovarik (2000). "Serine phosphorylation of STATs." *Oncogene* 19(21): 2628-37.
29. Diem, R., M. Hobom, et al. (2003). "Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway." *J Neurosci* 23(18): 6993-7000.
30. Dietz, G. P., E. Kilic, et al. (2001). "Bcl-2 is not required in retinal ganglion cells surviving optic nerve axotomy." *Neuroreport* 12(15): 3353-6.
31. Digicaylioglu, M., S. Bichet, et al. (1995). "Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(9): 3717-20.
32. Digicaylioglu, M, G. Garden, et al. (2004). "Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26): 9855-60.
33. Dion, L. D., J. Fang, et al. (1996). "Supernatant rescue assay vs. polymerase chain reaction for detection of wild type adenovirus-contaminating recombinant adenovirus stocks." *J Virol Methods* 56(1): 99-107.
34. Duffy, K. R., W. M. Pardridge, et al. (1988). "Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor." *Metabolism* 37(2): 136-40.
35. Ebert, B. L. und H. F. Bunn (1999). "Regulation of the erythropoietin gene." *Blood* 94(6): 1864-77.
36. Eberhardt, O., R.V. Coelln, et al. (2000). "Protection by synergistic effects of adenovirus-mediated X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis and glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease." *J Neurosci* 20(24):9126-34.

37. Eckardt, K. U. (2001). "After 15 years of success--perspectives of erythropoietin therapy." *Nephrol Dial Transplant* 16(9): 1745-9.
38. Ehrenreich, H., M. Hasselblatt, et al. (2002). "Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial." *Mol Med* 8(8): 495-505.
39. Ferrer, I., R. Blanco, et al. (2001). "Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies." *J Neural Transm* 108(12): 1397-415.
40. Fung, M. M., F. Rohwer, et al. (2003). "IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells." *Cell Signal* 15(6): 625-36.
41. Genc, S., F. Kuralay, et al. (2001). "Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production." *Neurosci Lett* 298(2): 139-41.
42. Glasgow, J. N., J. Qiu, et al. (2001). "Transcriptional regulation of the BCL-X gene by NF-kappaB is an element of hypoxic responses in the rat brain." *Neurochem Res* 26(6): 647-59.
43. Goldman, S. A. und M. Nedergaard (2002). "Erythropoietin strikes a new cord." *Nat Med* 8(8): 785-7.
44. Gonzalez-Garcia, M., I. Garcia, et al. (1995). "bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4304-8.
45. GrandPre, T., S. Li, et al. (2002). "Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration." *Nature* 417(6888): 547-51.
46. Grimm, C., A. Wenzel, et al. (2004). "Constitutive overexpression of human erythropoietin protects the mouse retina against induced but not inherited retinal degeneration." *J Neurosci* 24(25): 5651-8.
47. Guise, S., D. Braguer, et al. (2001). "Hyperphosphorylation of tau is mediated by ERK activation during anticancer drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells." *J Neurosci Res* 63(3): 257-67.
48. Hardy, S., M. Kitamura, et al. (1997). "Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination." *J Virol* 71(3): 1842-9.

49. Horvitz, H. R., S. Shaham, et al. (1994). "The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 377-85.
50. Hoyle, P. E., P. W. Moye, et al. (2000). "Differential abilities of the Raf family of protein kinases to abrogate cytokine dependency and prevent apoptosis in murine hematopoietic cells by a MEK1-dependent mechanism." *Leukemia* 14(4): 642-56.
51. Hu, Y., M. A. Benedict, et al. (1998). "Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4386-91.
52. Ihle, J. N. (1995). "Cytokine receptor signalling." *Nature* 377(6550): 591-4.
53. Isenmann, S. und M. Bähr (1997). "Expression of c-Jun protein in degenerating retinal ganglion cells after optic nerve lesion in the rat." *Exp Neurol* 147(1): 28-36.
54. Isenmann, S., A. Cellerino, et al. (1999). "Excess target-derived brain-derived neurotrophic factor preserves the transient uncrossed retinal projection to the superior colliculus." *Mol Cell Neurosci* 14(1): 52-65.
55. Isenmann, S., N. Klöcker, et al. (1998). "Protection of axotomized retinal ganglion cells by adenovirally delivered BDNF *in vivo*." *Eur J Neurosci* 10(8): 2751-6.
56. Isenmann, S., A. Kretz, et al. (2003). "Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration." *Prog Retin Eye Res* 22(4): 483-543.
57. Isenmann, S., G. Stoll, et al. (1998). "Differential regulation of Bax, Bcl-2, and Bcl-X proteins in focal cortical ischemia in the rat." *Brain Pathol* 8(1): 49-62; discussion 62-3.
58. Isenmann, S., C. Wahl, et al. (1997). "Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat." *Eur J Neurosci* 9(8): 1763-72.
59. Ivanov, V. N., A. Bhoumik, et al. (2001). "Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription." *Mol Cell* 7(3): 517-28.
60. Jiang, Z., Y. Zhang, et al. (2003). "Apoptosis and activation of Erkl/2 and Akt in astrocytes postischemia." *Neurochem Res* 28(6): 831-7.

61. Junk, A. K., A. Mammis, et al. (2002). "Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10659-64.
62. Kaplan, D. H., V. Shankaran, et al. (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7556-61.
63. Kilic, E., D. M. Hermann, et al. (2002). "Adenovirus-mediated Bcl-X(L) Expression using a neuron-specific synapsin-1 promoter protects against disseminated neuronal injury and brain infarction following focal cerebral ischemia in mice." *Neurobiol Dis* 11(2): 275-84.
64. Kilic, U., E. Kilic, et al. (2005). "Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2." *FASEB J* 19(2): 249-51
65. Kim, T. I., S. H. Jin, et al. (2001). "Prolonged activation of mitogen-activated protein kinases during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells." *Int J Colorectal Dis* 16(3): 167-73.
66. Kirito, K., T. Watanabe, et al. (2002). "Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways." *J Biol Chem* 277(10): 8329-37.
67. Kirsch, M., U. Terheggen, et al. (2003). "Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons." *Mol Cell Neurosci* 24(1): 130-8.
68. Klöcker, N., F. Braunling, et al. (1997). "*In vivo* neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells." *Neuroreport* 8(16): 3439-42.
69. Klöcker, N., M. Jung, et al. (2001). "BDNF increases the number of axotomized rat retinal ganglion cells expressing GAP-43, L1, and TAG-1 mRNA--a supportive role for nitric oxide?" *Neurobiol Dis* 8(1): 103-13.
70. Klöcker, N., P. Kermer, et al. (2000). "Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells *in vivo* does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B signaling." *J Neurosci* 20(18): 6962-7.
71. Kohn, A. D., F. Takeuchi, et al. (1996). "Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation." *J Biol Chem* 271(36): 21920-6.
72. Konnikova, L., M. Kotecki, et al. (2003). "Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells." *BMC Cancer* 3(1): 23.

73. Korsmeyer, S. J., J. R. Shutter, et al. (1993). "Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death." *Semin Cancer Biol* 4(6): 327-32.
74. Koshimura, K., Y. Murakami, et al. (1999). "Effects of erythropoietin on neuronal activity." *J Neurochem* 72(6): 2565-72.
75. Krajewski, S., S. Tanaka, et al. (1993). "Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes." *Cancer Res* 53(19): 4701-14.
76. Krebs, D. L. und D. J. Hilton (2001). "SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling." *Stem Cells* 19(5): 378-87.
77. Kretz, A., S. H. Hermening, et al. (2004a). "A novel primary culture technique for adult retina allows for evaluation of CNS axon regeneration in rodents." *J Neurosci Methods* 136(2): 207-19.
78. Kretz, A., S. Kügler, et al. (2004b). "Excess Bcl-XL increases the intrinsic growth potential of adult CNS neurons *in vitro*." *Mol Cell Neurosci* 26(1): 63-74.
79. Kügler, S., N. Klöcker, et al. (1999). "Transduction of axotomized retinal ganglion cells by adenoviral vector administration at the optic nerve stump: an *in vivo* model system for the inhibition of neuronal apoptotic cell death." *Gene Ther* 6(10): 1759-67.
80. Kulik, G., A. Klippel, et al. (1997). "Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt." *Mol Cell Biol* 17(3): 1595-606.
81. Lallemand, F., P. P. Lefebvre, et al. (2003). "Substance P protects spiral ganglion neurons from apoptosis via PKC-Ca²⁺-MAPK/ERK pathways." *J Neurochem* 87(2): 508-21.
82. LeBrun, D. P., R. A. Warnke, et al. (1993). "Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis." *Am J Pathol* 142(3): 743-53.
83. Leist, M., P. Ghezzi, et al. (2004). "Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic." *Science* 305(5681): 239-42.
84. Leon, S., Y. Yin, et al (2000). "Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve." *J Neuroscience* 20(12): 4615-26
85. Leonard, W. J. (2001). "Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction." *Int J Hematol* 73(3): 271-7.

86. Levin, L. A., C. L. Schlamp, et al. (1997). "Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(12): 2545-53.
87. Lu, Y. (2004). "Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review." *Stem Cells Dev* 13(1): 133-45.
88. Marais, R., Y. Light, et al. (1997). "Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases." *J Biol Chem* 272(7): 4378-83.
89. Marti, H. H., M. Bernaudin, et al. (2000). "Neuroprotection and Angiogenesis: Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia." *News Physiol Sci* 15: 225-229.
90. Marti, H. H., M. Gassmann, et al. (1997). "Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain." *Kidney Int* 51(2): 416-8.
91. Marti, H. H., R. H. Wenger, et al. (1996). "Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain." *Eur J Neurosci* 8(4): 666-76.
92. Martin, D. P., R. E. Schmidt, et al. (1988). Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol.* 106: 829-44.
93. Masuda, S., M. Nagao, et al. (1993). "Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells." *J Biol Chem* 268(15): 11208-16.
94. Meraz, M. A., J. M. White, et al. (1996). "Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway." *Cell* 84(3): 431-42.
95. Merry, D. E., D. J. Veis, et al. (1994). "bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS." *Development* 120(2): 301-11.
96. Morishita, E., S. Masuda, et al. (1997). "Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents *in vitro* glutamate-induced neuronal death." *Neuroscience* 76(1): 105-16.
97. Motoyama, N., F. Wang, et al. (1995). "Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-X deficient mice." *Science* 267(5203): 1506-10.

98. Muchmore, S. W., M. Sattler, et al. (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." *Nature* 381(6580): 335-41.
99. Muslin, A. J., J. W. Tanner, et al. (1996). "Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine." *Cell* 84(6): 889-97.
100. Myers, M. P., J. N. Andersen, et al. (2001). "TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B." *J Biol Chem* 276(51): 47771-4.
101. Myers, M. P., I. Pass, et al. (1998). "The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13513-8.
102. Nakazawa, T., M. Shimura, et al. (2003). "Intrinsic activation of PI3K/Akt signaling pathway and its neuroprotective effect against retinal injury." *Curr Eye Res* 26(1): 55-63.
103. Navas, T. A., D. T. Baldwin, et al. (1999). "RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase." *J Biol Chem* 274(47): 33684-90.
104. Nunez, G. und L. del Peso (1998). "Linking extracellular survival signals and the apoptotic machinery." *Curr Opin Neurobiol* 8(5): 613-8.
105. Nunez, G., L. London, et al. (1990). "Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines." *J Immunol* 144(9): 3602-10.
106. Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell* 74(4): 609-19.
107. Otilie, S., J. L. Diaz, et al. (1997). "Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins." *J Biol Chem* 272(49): 30866-72.
108. Perron, J. C. und J. L. Bixby (1999). "Distinct neurite outgrowth signaling pathways converge on ERK activation." *Mol Cell Neurosci* 13(5): 362-78.
109. Peterson, W. M., Q. Wang, et al. (2000). "Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia." *J Neurosci* 20(11): 4081-90.

110. Quelle, F. W., D. Wang, et al. (1996). "Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response." *Mol Cell Biol* 16(4): 1622-31.
111. Rajan, P., A. J. Symes, et al. (1996). "STAT proteins are activated by ciliary neurotrophic factor in cells of central nervous system origin." *J Neurosci Res* 43(4): 403-11.
112. Rameh, L. E. und L. C. Cantley (1999). "The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function." *J Biol Chem* 274(13): 8347-50.
113. Ramon Y Cajal, S. (1928). *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. London
114. Ratajczak, J., M. Majka, et al. (2001). "Biological significance of MAPK, AKT and JAK-STAT protein activation by various erythropoietic factors in normal human early erythroid cells." *Br J Haematol* 115(1): 195-204.
115. Ray, L. B. und T. W. Sturgill (1987). "Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(6): 1502-6.
116. Rodriguez-Viciano, P., P. H. Warne, et al. (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." *Nature* 370(6490): 527-32.
117. Rommel, C., B. A. Clarke, et al. (1999). "Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt." *Science* 286(5445): 1738-41.
118. Ruscher, K., D. Freyer, et al. (2002). "Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an *in vitro* model." *J Neurosci* 22(23): 10291-301.
119. Sakanaka, M., T. C. Wen, et al. (1998). "*In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4635-40.
120. Scheid, M. P., R. W. Lauener, et al. (1995). "Role of phosphatidylinositol 3-OH-kinase activity in the inhibition of apoptosis in haemopoietic cells: phosphatidylinositol 3-OH-kinase inhibitors reveal a difference in signalling between interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor." *Biochem J* 312 (Pt 1): 159-62.

121. Schindler, C. und J. E. Darnell, Jr. (1995). "Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway." *Annu Rev Biochem* 64: 621-51.
122. Schmeer, C., G. Straten, et al. (2002). "Dose-dependent rescue of axotomized rat retinal ganglion cells by adenovirus-mediated expression of glial cell-line derived neurotrophic factor *in vivo*." *Eur J Neurosci* 15(4): 637-43.
123. Schnell, L., M. Schwab (1990). "Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors." *Nature* 343 (6255): 269-72.
124. Schweizer, U., J. Gunnensen, et al. (2002). "Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult." *J Cell Biol* 156(2): 287-97.
125. Sheu, J. Y., D. J. Kulhanek, et al. (2000). "Differential patterns of ERK and STAT3 phosphorylation after sciatic nerve transection in the rat." *Exp Neurol* 166(2): 392-402.
126. Shimizu, S., R. P. Simon, et al. (1997). "Dimethylsulfoxide (DMSO) treatment reduces infarction volume after permanent focal cerebral ischemia in rats." *Neurosci Lett* 239(2-3): 125-7.
127. Shuai, K. (2000). "Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins." *Oncogene* 19(21): 2638-44.
128. Silva, M., A. Benito, et al. (1999). "Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines." *J Biol Chem* 274(32): 22165-9.
129. Sinor, A. D. und D. A. Greenberg (2000). "Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity." *Neurosci Lett* 290(3): 213-5.
130. Siren, A. L. und H. Ehrenreich (2001). "Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251(4): 179-84.
131. Stambolic, V., A. Suzuki, et al. (1998). "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN." *Cell* 95(1): 29-39.
132. Steller, H. (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide." *Science* 267(5203): 1445-9.

133. Straten, G., C. Schmeer, et al. (2002). "Potential synergistic protection of retinal ganglion cells from axotomy-induced apoptosis by adenoviral administration of glial cell line-derived neurotrophic factor and X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis." *Neurobiol Dis* 11(1): 123-33.
134. Takeda, K., K. Noguchi, et al. (1997). "Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3801-4.
135. Tan, C. C., K. U. Eckardt, et al. (1992). "Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia." *Am J Physiol* 263(3 Pt 2): F474-81.
136. Tatton, W. G., R. Chalmers-Redman, et al. (2003). "Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation." *Ann Neurol* 53 Suppl 3: S61-70; discussion S70-2.
137. Teng, F. Y., B. M. Ling, et al. (2004). "Inter- and intracellular interactions of Nogo: new findings and hypothesis." *J Neurochem* 89(4): 801-6.
138. Tsujimoto, Y., J. Cossman, et al. (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." *Science* 228(4706): 1440-3.
139. Tsujimoto, Y., E. Jaffe, et al. (1985). "Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation." *Nature* 315(6017): 340-3.
140. Wang, H. Q., T. Quan, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor-dependent, NF-kappaB-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases-3, -8, and -9 in human keratinocytes." *J Biol Chem* 278(46): 45737-45.
141. Weber-Nordt, R. M., C. Egen, et al. (1996). "Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines." *Blood* 88(3): 809-16.
142. Weishaupt, J. H., G. Rohde, et al. (2004). "Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(5): 1514-22.
143. Wellington, C. L. und M. R. Hayden (2000). "Caspases and neurodegeneration: on the cutting edge of new therapeutic approaches." *Clin Genet* 57(1): 1-10.

144. Wiessner, C., P. R. Allegrini, et al. (1999). "Neuron-specific transgene expression of Bcl-XL but not Bcl-2 genes reduced lesion size after permanent middle cerebral artery occlusion in mice." *Neurosci Lett* 268(3): 119-22.
145. Wu, J., A. J. Rossomando, et al. (1992). "Apparent sufficiency of a dual-specificity tyrosine/threonine kinase for activation of MAP kinase poses new questions for the dual-phosphorylation mechanism." *Biochem Soc Trans* 20(3): 675-7.
146. Xia, X. G., H. D. Hofmann, et al. (2002). "Induction of STAT3 signaling in activated astrocytes and sprouting septal neurons following entorhinal cortex lesion in adult rats." *Mol Cell Neurosci* 21(3): 379-92.
147. Yamaji, R., T. Okada, et al. (1996). "Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA." *Eur J Biochem* 239(2): 494-500.
148. Yao, R. und G. M. Cooper (1995). "Regulation of the Ras signaling pathway by GTPase-activating protein in PC12 cells." *Oncogene* 11(8): 1607-14.
149. Zha, J., H. Harada, et al. (1996). "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." *Cell* 87(4): 619-28.

Erklärung nach § 6.2. der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät

Mein Beitrag zu den Daten der beiden Publikationen lässt sich wie folgt zusammenfassen:

Kretz A, Happold C, Marticke J, Isenmann S. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway. Mol. Cell. Neurosci. 2005; 29(4):569-79.

Fig. 1: Abb. 1: Nach Etablierung des Zellkulturmodells für adulte Neuronen durch Fr. Dr. Kretz wurde von mir selbständig eine Konzentrationsreihe erstellt, um die Dosis-abhängige Wirkung des Zytokin hormons Erythropoietin auf die Neuroregeneration zu untersuchen. Erste Versuche wurden gemeinsam mit Frau Dr. Kretz, Folgeexperimente selbständig durchgeführt. Die Computer-gestützte mikroskopische Auswertung der retinalen Explantatkulturen wurde gemeinsam jeweils in Einzelarbeit erstellt.

Fig. 2: Die Quantifizierung der axonalen, EPO-vermittelten Neuroregeneration für die *in vitro* als auch für die *in vivo* Versuche wurde nach Einweisung durch Fr. Dr. Kretz von mir selbständig durchgeführt und von Fr. Dr. Kretz in einem verblindeten Verfahren verifiziert. Bei der Quantifizierung handelt es sich um ein aufwändiges Verfahren, bei dem retinale Basislänge zur Gesamtneuritenlänge und deren Anzahl innerhalb eines definierten, standardisierten Wachstumsfokus in Beziehung gesetzt werden. Für die statistische Auswertung wurde ich von Herrn Sikorski, Psychologiedirektor des Landesinstitut für Erziehung und Unterricht in Stuttgart, zur selbstständigen Erstellung angeleitet.

Fig. 3 und Table 1: Zelluläres Überleben ist eine Grundvoraussetzung für regenerative Prozesse. Effekte von EPO auf das Überleben der läsierten Neurone wurde nach retrograder Markierung der retinalen Ganglienzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil bestimmt. Die retrograde Markierung erfolgte stereotaktisch am narkotisierten Tier. Diese Technik bedarf zum Gelingen besonderer Präzision. Die stereotaktischen Dil-Injektionen in die superioren Colliculi der Ratte wurden von Fr. Dr. Kretz und mir gemeinsam durchgeführt. Die Zellquantifizierung in 3 retinalen Rädien nach Explantation und Kultivierung der Retinae durch mich erfolgte zur Erhöhung der Interrater-Reliabilität unabhängig durch Fr. Dr. Kretz und mich. Die Auswertung und Erstellung der Statistik erfolgte durch mich unter Anleitung durch Herrn Sikorski.

Fig. 4: Die Induktion von intrinsischem Bcl-X_L durch intravitreale EPO-Injektion nach crush-Läsion des N. opticus wurde mittels Western Blot von Fr. Kretz nachgewiesen und in weiteren, von mir durchgeführten Blots bestätigt. Der Nachweis der EPO-vermittelten Stimulation der Bcl-X_L-

Expression in retinalen Ganglienzellen mittels Immunfluoreszenz sowie die zugehörige statistische Auswertung erfolgten durch Fr. Dr. Kretz.

Fig. 5: Zur Evaluation der intrinsischen Signalkaskaden, die die geschilderten EPO-Funktionen im ZNS vermitteln, wurde die Expression verschiedener Proteine aus der Stat-Familie untersucht. Für Stat-3 wurde eine Induktion der Phosphorylierung unter EPO-Behandlung nachgewiesen, während sich für Stat-1 und -5 keine Effekte zeigten. Die Spezifität der Stat-3 vermittelten Proteinphosphorylierung wurde durch Blockungs-Experimente mit Thyrphostin (AG490), das spezifisch den Jak2/Stat-3-Pfad inhibiert, nachgewiesen. Außerdem wurde das EPO-vermittelte Neuritenwachstum nach Applikation von AG490 aufgehoben. Die Expressionsanalysen für die verschiedenen Stat-Proteine (nur für Stat-3 in der Publikation gezeigt) wurden von Frau Dr. Kretz und mir durchgeführt. Die Wachstumsstimulations- und Inhibitionsversuche wurden von mir durchgeführt.

Fig. 6: Der histologische Nachweis dafür, dass sich die Induktion der Expression von Stat-3 sowie dessen Phosphorylierung unter EPO-Behandlung primär in retinalen Ganglienzellen abspielt, erfolgte mittels Immunfluoreszenz durch Frau Dr. Kretz.

Fig. 7: Der Nachweis der Induktion der Akt-Phosphorylierung als Teil der EPO-vermittelten intrazellulären Signalkaskade, die potentiell Zellüberleben und axonale Regeneration fördert, erfolgte durch Fr. Dr. Kretz .

Fig. 8: Die Hemmung der EPO-vermittelten Regeneration nach Applikation des PI3K/Akt-Inhibitors LY294002 und somit die Bedeutung der PI3K/Akt-Kaskade für die adulte, postläsionale Neuritogenese wurde von mir im Zellkulturmodell durch Auswertung von Länge und Anzahl neu generierter Neuriten nachgewiesen. Untersuchungen zum Einfluß einer Caspasen-Inhibition mittels zVAD-fmk im Zellkulturmodell wurden ebenfalls von mir durchgeführt. Die Auswertung und Erstellung der Statistik erfolgte durch mich unter Anleitung durch Herrn Sikorski.

Kretz A, Kügler S, Happold C, Bähr M, Isenmann S. Excess Bcl-X_L increases the intrinsic growth potential of adult CNS neurons in vitro. Mol. Cell. Neurosci. 2004; 26(1): 63-74.

Fig. 1: Die Etablierung des Zellkulturmodells sowie die Vektortransduktionsstudien zum Nachweis der Expression von Bcl-X_L sowie β -Galaktosidase in retinalen Ganglienzellen erfolgten durch Fr. Dr. Kretz.

Fig. 2: Western Blot-Analysen zum Nachweis einer erfolgreichen Vektortransduktion wurden von Fr. Dr. Kretz durchgeführt. Der rekombinante

virale Vektor Ad.Bcl-X_L wurde von Herrn Dr. S. Kügler (AG Prof. Dr. med. M. Bähr, Universitätsklinikum Göttingen) hergestellt.

Fig. 3: Immunfärbungen zum Nachweis eines Bcl-X_L-induzierten Neuritenwachstums *in vivo* und *in vitro* nach Vektortransduktion nativer und geschädigter Retina wurde initial von Fr. Dr. Kretz durchgeführt; in weiteren Experimenten erfolgten Kulturpräparationen und Färbungen durch mich. Bildgebungen hierzu wurden von Fr. Dr. Kretz und mir individuell erstellt.

Fig. 4: Die Operationen am optischen Nerv inklusive Vektortransduktionsstudien wurden primär von Frau Dr. Kretz durchgeführt. Die Herstellung der retinalen Explantatkulturen und die vergleichende, quantitative Analyse der neu gebildeten Neuriten in untransduzierter sowie Bcl-X_L überexprimierender Retina erfolgten primär durch mich.

Fig. 5: Die histologischen und quantitativen Untersuchungen zur Formation bzw. Degeneration der Nervenfaszikel in unläsionierter, läsionierter, oder läsionierter und Ad.Bcl-X_L-transduzierter Retina, sowie die intraretinalen Analysen zur Expression des Wachstum-assoziierten Proteins GAP-43 wurden von Fr. Dr. Kretz durchgeführt.

Fig. 6: Die immunhistochemischen Analysen zur *in vivo* Stimulation der axonalen Regeneration am proximalen und distalen Ende des durchtrennten optischen Nervs in An- und Abwesenheit einer lokalen Überexpression von Bcl-X_L erfolgten durch Fr. Dr. Kretz.

Fig. 7: Anterograde und immunhistochemische Markierung von Axonen mit CTX-Konjugaten oder mittels dem Neurofilamentmarker SMI-31 zur Differenzierung residualer, degenerierender und neu formierter Axone *in vivo* wurde von Fr. Dr. Kretz durchgeführt.

Fig. 8: Die Quantifizierung überlebender retinaler Ganglienzellen in 3 Radian an explantierter und kultivierter nativer, geschädigter sowie Bcl-X_L-transduzierter Retina nach retrograder Dil-Färbung (colliculäre Injektionen erforderlich) wurde von mir vorgenommen. Die retrograden stereotaktischen Farbstoffinjektionen in die Colliculi der Ratte wurden von Fr. Dr. Kretz und mir gemeinsam durchgeführt. Zur Erhöhung der Interrater-Reliabilität erfolgte die Auswertung unabhängig jeweils durch Fr. Dr. Kretz und mich selbst. Die Auswertung und Erstellung der Statistik erfolgte durch mich unter Anleitung durch Herrn Sikorski.

Fig. 9: Auswertung des Zellüberlebens mittels zytoskeletaler Marker in nativen, geschädigten sowie Bcl-X_L-transduzierten Retinae wurde von Fr. Dr. Kretz durchgeführt.

Danksagung

All denen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich meinen Dank aussprechen.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. med. Stefan Isenmann für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieses Projektes. Für seine stetige Unterstützung und Förderung während der Entstehung dieser Arbeit ebenso wie für das gute Verhältnis, das zwischen uns herrschte, bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. U. Lauer sowie Herrn Prof. Dr. med. S. Schwab sei für die Zweit- bzw. Drittbegutachtung dieser Arbeit ebenfalls an dieser Stelle gedankt.

Von ganzem Herzen zu Dank verpflichtet bin ich Dr. med. Alexandra Kretz, die mir während der ganzen Zeit im Labor und beim Verfassen dieser Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich ausgezeichnet unterstützt hat – sie führte mich in die wissenschaftliche Tätigkeit ein und wird zweifellos jeden meiner weiteren Schritte durch die Gründlichkeit und Genauigkeit, die ihre Arbeit auszeichnete, geprägt haben. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin wünschen können.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meiner restlichen Arbeitsgruppe, die dafür gesorgt hat, dass ich stets gerne an die Arbeit gegangen bin; insbesondere möchte ich dabei Caroline Herrmann erwähnen, die mich in die wesentlichen Grundlagen der Labortätigkeiten eingewiesen hat, und stets ein offenes Ohr für alle Fragen hatte.

Der Boehringer Ingelheim Stiftung danke ich sehr für die großzügige Unterstützung durch das Doktoranden-Stipendium, welches mir erlaubt hat, mich intensiv ausschließlich mit meiner Labortätigkeit zu befassen.

Herrn Psychologiedirektor Sikorski vom Landesinstitut für Erziehung und Unterricht in Stuttgart danke ich für die Anleitung zur Erstellung der Statistiken.

Christine Eisenmann und Dr. med. Patrick Roth danke ich für das wiederholte Korrekturlesen dieser Arbeit und die kritischen Anregungen, Dr. med. Martin Ohmer und Mike Schneider danke ich für die Hilfestellungen beim Formatieren von Text und Bild. Nicht nur durch praktische Unterstützung und Hilfe beim Durchführen und Verfassen der Arbeit, sondern auch durch ihre Freundschaft in allen Lebenslagen haben sie mir immer beigestanden.

Antonia Leicht, Stefan Zepernick, Saskia Bartel, Kathrin Heiß und Steffi Groll sei für ihren ständigen moralischen, kulinarischen und önologischen Beistand und die ermutigenden Worte während der Entstehung dieser Arbeit herzlich gedankt.

Meinen Eltern Klaus und Michèle Happold sowie meiner Schwester Céline danke ich von Herzen für ihre ständige Unterstützung in jeglicher Hinsicht seit Beginn meines Studiums – ohne ihren Rückhalt wäre diese Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen.

Zum Schluß noch ein riesiges Dankeschön allen Menschen, die mir auf dem Weg moralischen Beistand geleistet haben und immer für mich da sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Caroline Juliette Happold
geb. am 23. 5. 1979 in Stuttgart

Schulbildung

1985-1989 Französische Grundschule Stuttgart
1989-1998 Wagenburg-Gymnasium, Stuttgart
(französischer Zug)
1996 Edgemont-Highschool, New York, USA

Schulabschluss

Abitur (19.6.98)
Baccalauréat S (scientifique) (24.6.98)

Studium

1999-2005 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

2001 Ärztliche Vorprüfung
2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004-2005 Praktisches Jahr an den Universitätskliniken
Inselhospital Bern, Schweiz (Chirurgie)
UKT Tübingen (Wahlfach Neurologie)
CHU Montpellier, Frankreich (Innere Medizin)

17.11.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

Seit 2003 Promotionsthema: Bedeutung von Erythropoietin für Neuroregeneration und Neuroprotektion in läsierten adulten Neuronen im ZNS
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Isenmann, Neurologische Universitätsklinik Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. M. Weller)
Unterstützt durch ein Stipendium der Boehringer Ingelheim Stiftung