

Aus dem
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen
Abteilung Klinische Pharmakologie
Leiter: Professor M. Schwab

Expression und Wirkung von Erythropoietin β bei
Astrozyten unter normoxischen und hypoxischen
Bedingungen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Christina Paul, geb. Schneider

aus
Albstadt-Ebingen

2007

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C.H. Gleiter

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Dirnagel

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	9
I.1. Arbeitshypothese.....	9
I.2. Bisheriger Kenntnisstand	10
I.2.1. Gliazellen	10
I.2.2. Einteilung und Charakterisierung von Astrozyten.....	11
I.2.3. Funktion und Aufgaben von Astrozyten.....	13
I.3. Hypoxie und Ischämie	14
I.4. Blut-Hirn-Schranke	15
I.5. Erythropoietin	17
I.5.1. Die Suche nach EPO	17
I.5.2. Struktur, Gen und Wirkungsweise von Erythropoietin	17
I.5.3. Pharmakodynamik von EPO	19
I.5.4. Pharmakokinetik von EPO	20
I.5.5. Vorkommen von EPO in Zellen des ZNS	21
I.5.6. Wirkung von EPO auf das ZNS.....	21
I.5.7. Faktoren, die die EPO-Expression beeinflussen	23
I.5.8. Signaltransduktion bei Bindung von EPO an seinen Rezeptor.....	23
I.5.9. EPO-Wirkungen bei Hypoxie-induzierter Apoptose.....	25
I.5.10. Das Zusammenspiel zwischen EPO, HIF-1 und Apoptose	28
I.5.11. Der Wirkungsmechanismus von EPO als neuroprotektiver Faktor... 30	
I.6. Eigene Fragestellung	32
II. Material	34
II.1. Primärantikörper.....	34
II.2. Sekundärantikörper.....	34
II.3. Molekularbiologische und zellbiologische Kits.....	34
II.4. Chemikalien	35
II.5. Zusätzliches Material.....	36
II.6. Geräte	37

Inhaltsverzeichnis

III. Methoden	39
III.1. Allgemeine Techniken	39
III.2. Präparation der astroglialen Primärkultur aus der Ratte.....	40
III.3. Immunfluoreszenzanfärbungen.....	44
III.3.1. Vorbereitung der immunzytochemischen Färbungen.....	44
III.3.2. Immunzytochemische Färbetechniken	46
III.3.3. Apoptose – Nachweis in Zellen mittels TUNEL-Reaktion.....	47
III.3.4. DAPI - Kernfärbung:.....	48
III.4. ELISA.....	48
III.5. Real-time-RT-PCR	52
III.5.1. RNA – Extraktion mittels RNeasy-Kit®	52
III.5.2. Bestimmung der RNA-Menge je Probe	53
III.5.3. Umschreiben der RNA in cDNA	53
III.5.4. Messen der cDNA mittels real-time-RT-PCR	54
III.5.5. Herstellung des MasterMix und der Verdünnungsreihe	55
III.5.6. Vorbereitung der LightCycler®-Kapillaren.....	55
III.5.7. Start des LightCyclers®	55
III.5.8. Auswertung nach Beendigung des LightCycler®-Laufs	56
III.6. Durchflusszytometrie.....	56
III.7. ATP-Biolumineszenz (Cell Viability Assay)	58
III.8. LDH-Messung mittels CytoTox 96®-Assay	59
III.9. Caspase-3/7-Assay.....	60
III.10. Statistische Auswertung der Ergebnisse	60
IV. Ergebnisse	61
IV.1. EPO-Expression und EPO-Sekretion von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie	63
IV.1.1. EPO-Produktion in Astrozyten unter Normoxie in Abhängigkeit vom Zellalter: Untersuchungen mittels PCR und Durchflusszytometrie ...	63
IV.1.2. EPO-Genexpression in Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie in Abhängigkeit vom Zellalter	68
IV.1.3. EPO-Sekretion von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie in Abhängigkeit vom Zellalter: Untersuchungen mittels EPO-ELISA....	70

IV.2. Einfluss von exogenem EPO auf Astrozyten	74
IV.2.1. Zellzahlen und LDH-Aktivitäten unter Normoxie und Hypoxie bei unterschiedlichen EPO-Dosierungen	74
IV.2.2. Zellzahlen und LDH-Aktivitäten unter Normoxie und Hypoxie bei Astrozyten verschiedenen Alters	78
IV.2.3. Einfluss von exogenem EPO auf Proliferation und Apoptose bei Zellen unterschiedlichen Alters unter Normoxie und Hypoxie	82
IV.2.4. Einfluss von exogenem EPO auf die Proliferation von Astrozyten – Durchflusszytometrische Messungen	86
IV.2.5. Einfluss von EPO auf das Apoptoseverhalten von Astrozyten: Untersuchungen zu Zellzahlen, LDH- und Caspase-3/7-Aktivität.....	87
IV.3. Korrelation zwischen der EPO-Expression und dem Differenzierungszustand von Astrozyten sowie deren Ansprechen auf exogene EPO-Gabe	91
IV.3.1. Korrelation zwischen dem Differenzierungszustand und der astrozytären EPO-Expression	91
IV.3.2. Auswirkungen von exogenem EPO auf den Differenzierungszustand von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie	94
V. Diskussion	100
VI. Zusammenfassung	112
VII. Schlussbetrachtung	114
VIII. Literaturverzeichnis	116
IX. Quellennachweis	130
X. Danksagung	131
XI. Lebenslauf	133

Abkürzungen

Nicht aufgeführt sind die Abkürzungen, die gemäß den Autorenrichtlinien des Journals of Neurochemistry nicht definiert werden müssen.

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APK	Astrogliareiche Primärkultur
Cy3	Indocarbocyanin 3
BHS	Blut-Hirn-Schranke
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DFX	Desferrioxamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin – Rezeptor
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFAP	Gliafaser-saures Protein (glial fibrillary acidic protein)
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
HCP	Hämatopoetische Zellphosphatase (hematopoietic cell phosphatase)
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1
IF	Intermediärfilament
IGF	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
JAK-2	Janus-Kinase 2
JUNK	JUN-Kinase
LDH	Laktatdehydrogenase

Abkürzungen

mab	Monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MAP-K	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEK	MAPK/ERK-Kinase
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
pab	Polyklonaler Antikörper (polyclonal antibody)
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCNA	Proliferation cell nuclear antigen
RA	Rattenastrozyten
RAF-1	Receptor associated factor
Ras	Rat sarcoma onkogen
rHuEPO	Rekombinantes humanes Erythropoietin
rt-RT-PCR	Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean)
SHC	Src-homology-2-domain-containing protein
SMAA	Smooth muscle α -actin
SOD	Superoxiddismutase
SOS1	Son of sevenless 1 (ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor)
SOS2	Salt overly sensitive 2 (eine Proteinkinase)
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TUNEL	Terminaldeoxynucleotidyltransferase mediated UTP nick end labeling
U	Unit; Enzymaktivität, meist in μ mol des umgesetzten Substrates pro Minute angegeben. Im weiteren Sinn Einheit der biologischen Wirksamkeit von Hormonen.

I. Einleitung

I.1. Arbeitshypothese

Der Schlaganfall ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen und malignen Neubildungen die dritthäufigste Todesursache (11,4%) in Deutschland. Etwa 20% der Patienten sterben innerhalb von vier Wochen nach einem Schlaganfall, 37% der Neuerkrankten innerhalb des ersten Jahres. Fünf Jahre nach dem ersten Hirninfarkt leben noch 40-50% der Betroffenen. In Deutschland erleiden jedes Jahr zwischen 120 000 und 350 000 Menschen einen Schlaganfall, schätzungsweise 1 bis 1,5 Mio Menschen leiden allein in Deutschland unter den Folgen. Der Schlaganfall stellt in Deutschland die häufigste Ursache für eine lebenslange Behinderung im Erwachsenenalter dar. Aufgrund der demographischen Entwicklung in Deutschland muss heute mit einem Anstieg dieses Patientenkollektivs gerechnet werden (Daten des „Sachverständigenrates für die Konzertierte Aktion im Gesundheitswesen“, Bundespressekonferenz 2001, www.svr-gesundheit.de/Informationen/prsvr.pdf, letzter Zugriff Oktober 2005). Dies hat – neben den tragischen Folgen für den Patienten selbst – auch enorme Kosten für das Gesundheitssystem zur Folge, da abhängig vom Schweregrad des Schlaganfalls bleibende Behinderungen oft eine intensive Rehabilitation (mit leider häufig geringen Erfolgen) notwendig machen. Ein Schlaganfall und seine Folgen können nicht rückgängig gemacht werden, da das Gehirn einmal eingetretene Schäden nur schlecht durch intakte Bereiche kompensieren kann. Dass viele Schlaganfälle häufig schwerwiegende Schäden zur Folge haben, liegt an der Anfälligkeit des Gehirns gegenüber Durchblutungsstörungen und der sehr kurzen Zeitspanne von nur etwa zehn Minuten, die das Gehirn einen Sauerstoffmangel toleriert. Sowohl aus medizinischer wie aus gesundheits-politischer Sicht ist daher die Möglichkeit einer Begrenzung dieser zerebralen Schäden und deren Folgen von großer Bedeutung.

Seit einiger Zeit steht das Hormon Erythropoietin im Mittelpunkt des Interesses. Eine Studie von Ehrenreich et al. aus dem Jahr 2002 zeigt, dass die Gabe von Erythropoietin bei Patienten mit zerebraler Ischämie eine signifikante Verbesserung der klinischen Symptomatik, ein deutlich kleineres Ausmaß der

Gehirnläsion und einen geringeren Anstieg von LDH im Serum zur Folge hat als in der placebogeführten Kontrollgruppe. Von diesen Überlegungen ausgehend untersucht die vorliegende Arbeit die Produktion und Sekretion von EPO in kultivierten Astrogliazellen und die Wirkung von exogenem EPO auf diese Zellen. Die astrogliale Zellkultur bietet hier ein Modell zur Untersuchung von EPO als mögliches Therapeutikum bei hypoxischer Hirnschädigung. Ziel der Arbeit ist ein besseres Verständnis der molekularen Veränderungen, die durch Erythropoietin in astroglialem Gewebe hervorgerufen werden, um therapeutische Optionen beispielsweise nach Schlaganfall besser verstehen und einsetzen zu können.

I.2. Bisheriger Kenntnisstand

I.2.1. Gliazellen

Die vom Ektoderm abstammende Neuroglia stellt das interstitielle Zellgewebe des ZNS dar, das den Raum zwischen Neurone und Blutgefäßen bis auf den 20 nm breiten Extrazellularraum ausfüllt. Sie bildet zum einen die Markscheiden zur elektrischen Isolation der Neurone, zum anderen übernimmt die Astroglia Stütz-, Nähr- und Phagozytosefunktionen.

Die Einteilung der Neuroglia erfolgt in:

1. Makroglia: Astrozyten, die sich in
 - a) kurzstrahlige Astrozyten = protoplasmatische Astrozyten der grauen Substanz und
 - b) langstrahlige Astrozyten = fibröse Astrozyten der weißen Substanz einteilen lassen.

Astrozyten bilden zusammen mit Oligodendrogliazellen die Makroglia (Einteilung nach Somjen 1988; Tower 1988).

2. Mikroglia
3. Ependymzellen
4. besondere Formen:
 - a) Bergmann-Glia (Astrozyten der Kleinhirnrinde)
 - b) Müller-Stützzellen (spezialisierte Astrozyten der Retina)
 - c) Fañanas-Zellen (protoplasmatische Glia der Kleinhirnrinde)
 - d) Pituizyten (die Gliazellen der Neurohypophyse)

I.2.2. Einteilung und Charakterisierung von Astrozyten

Astrozyten sind Makrogliazellen mit strahlenförmigen Fortsätzen, die daher auch als Sternzellen bezeichnet werden. Sie werden unterteilt in einen protoplasmatischen Typ (plump, zellplasmareich, fortsatzarm; v.a. im Rindengrau des ZNS) und einen fibrösen Typ (»Spinnenzelle«; mit kleinem Zelleib, langen dünnen Fortsätzen und vielen Fibrillen; v.a. in der weißen Substanz). Astrozyten sind die größten Zellen der Neuroglia. Der Zellkörper der protoplasmatischen Astrozyten hat einen Durchmesser von 15 – 25 µm, fibröse Astrozyten sind mit 10 – 12 µm Durchmesser kleiner. Die unterschiedlichen Formen dürften mit dem Alter der Zellen korrelieren. So tritt der protoplasmareiche Typ auch in der Zellkultur besonders im jungen, noch nicht vollständig ausdifferenzierten Stadium auf und verändert sein Aussehen im Laufe der Zeit zum fibrösen Typ. Astrozyten haben einen zentral liegenden, runden Zellkern. Charakteristisch für sie sind zytoplasmatische Intermediärfilamente (Durchmesser 5 – 10 nm), die sich zu Fibrillen zusammenlagern und über ein für Astrozyten spezifisches Protein verfügen, das GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), das immunzytochemisch nachweisbar ist. Ein weiterer Marker für Astrozyten ist SMAA (smooth muscle α -actin). Beide Marker werden im Folgenden kurz beschrieben.

GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein

GFAP ist als immunzytochemischer Marker dazu geeignet, Astrozyten von anderen Zellen im ZNS zu unterscheiden (McLendon und Bigner 1994). Der in dieser Arbeit für die immunzytochemischen Färbungen verwendete Antikörper gegen GFAP färbt neben Astrozyten auch enteritische Gliazellen (Goebel et al. 1987), die jedoch in einer aus Hirngewebe isolierten Zellkultur naturgemäß nicht vorkommen. GFAP ist ein 50 kDa großes intrazytoplasmatisches Protein, das in Astrozyten einen Teil des Zytoskeletts bildet und damit ein wichtiges Strukturelement darstellt (Eng et al. 1971). GFAP ist ein Klasse-III-Subtyp der Intermediärfilament-Proteine (IF-Proteine) in Astroglia (Inagaki et al. 1994). Intermediärfilament-Proteine bestehen aus einer amino-terminalen HEAD-Domäne, einer zentralen ROD-Domäne und einer carboxyterminalen TAIL-Domäne. Der für diese Arbeit verwandte monoklonale Antikörper gegen GFAP

der Firma Progen ist gegen die α -helicale ROD-Domäne gerichtet (Achstätter et al. 1986). Die Verknüpfung der GFAP-Untereinheiten miteinander geschieht durch Phosphorylierung der HEAD-Domäne und Veränderung ihrer Ladung. Der Auf- und Abbau von GFAP steht in einem direkten Zusammenhang mit der Neuordnung des glialen Zytoskeletts während der Mitose. Vimentin, ein weiteres IF-Protein, ist mit GFAP in Gliazellen assoziiert und scheint GFAP zu stabilisieren (Galou et al. 1996). Funktionell wird GFAP eine wichtige Rolle bei der Mobilität und strukturellen Stabilität von Astrozyten zugeschrieben (Rutka et al. 1997). Bei Verletzungen des ZNS proliferieren Astrozyten und zeigen eine exzessive Hypertrophie des Zellkörpers mit einer deutlichen Steigerung der GFAP – Expression (Rutka et al. 1997).

SMAA – Smooth Muscle Alpha Actin

Actin ist ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts in praktisch allen lebenden Zellen und dient u.a. dazu, der Zelle Bewegungen zu ermöglichen sowie deren äußere Form festzulegen. Es sind bisher bei Säugetieren 6 verschiedene Actine bekannt, alle davon weisen eine Größe von etwa 375 Aminosäuren auf. Für diese Arbeit ist α -Actin von besonderer Bedeutung, da es außer in Muskelzellen (daher der volle Name smooth muscle α -actin, kurz SMAA) auch in Astrozyten vorkommt (alle Angaben: Lodish et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit dient SMAA als immunhistologischer Marker für Astrozyten in Abgrenzung zu möglicherweise weiteren, in der Primärkultur vorhandenen Zellen (neuronalen Zellen etc.), die im Gegensatz zu Astrozyten kein SMAA aufweisen. SMAA ist zudem ein wichtiger Differenzierungsmarker (Skalli et al. 1986; Schurch et al. 1987; Demirkesen et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit wird besonders darauf eingegangen, dass sich SMAA verstärkt in jungen, undifferenzierten Astrozyten und weniger bei älteren, weiter differenzierten Zellen findet (vgl. Teil IV: Ergebnisse). Für Details zu den sehr komplexen Umbau- und Kontraktionszuständen von Actinen muss an dieser Stelle auf weiterführende Literatur (u.a. Lodish et al. 1996) verwiesen werden. Es wurde zudem Nestin als Marker für undifferenzierte neurale Vorläuferzellen verwendet (Lendahl et al. 1990; Koyama et al. 2003).

I.2.3. Funktion und Aufgaben von Astrozyten

Astrozyten stellen die größten Zellen der Neuroglia dar. Ihre Funktionen sind vielfältig: Bisher wird von folgenden Hauptfunktionen ausgegangen (Junqueira und Carneiro 1996):

- 1. Stoffaustausch:** Astrozyten transportieren Nährstoffe von und zu Neurone und sind deren wichtigste Versorger. Wesentlich ist dabei der Metabolitenaustausch durch den Interzellularraum. Spezielle Aufgaben besitzen Astrozyten auch für neuronale Synapsen. Sie sind hier insbesondere für die Bildung und den Austausch von Glutamat (in Form von Glutamin) zuständig sowie am Metabolismus der γ -Aminobuttersäure (GABA) beteiligt.
- 2. Ionenhaushalt:** Astrozyten regulieren an den neuronalen Synapsen die für die Erregungsbildung notwendige Kaliumionenkonzentration. Astrozyten sind in der Lage, freigesetzte Kaliumionen sowie andere Ionen aufzunehmen und über ihre „gap junctions“ auf mehrere Zellen zu verteilen. Astrozyten tragen dazu bei, das Ionenmilieu innerhalb der Gliagrenzmembran (um die Gefäße wird diese Grenzmembran als „membrana limitans perivascularis“, an der Oberfläche von Gehirn und Rückenmark als „membrana limitans gliae superficialis“ bezeichnet) konstant zu halten.
- 3. Beteiligung an der Isolierung von Neurone:** Ohne Astrozyten ist eine elektrische Informationsweitergabe durch Neurone unmöglich. Obwohl die Myelinscheiden von Oligodendrogliazellen gebildet werden, zeigt sich bei demyelinisierenden Prozessen häufig auch eine Beteiligung der Astrozyten, so beispielsweise bei der Multiplen Sklerose, die histologisch u.a. durch einen regellos verteilten Markscheidenzerfall, eine perivaskuläre Infiltration, Gliaproliferation und durch Glianarben gekennzeichnet ist. Astrozyten spielen auch eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Axonen im ZNS (Gimenez y Rabotta et al. 2001).
- 4. Phagozytose** abgestorbener Neurone und Narbenbildung: Die Abräumung der toten Neurone mit anschließender Bildung einer Glianarbe geschieht ebenfalls durch Astrozyten (Guenard et al. 1996). Die im Bereich der

Schädigung entstandene Glianarbe stellt kein funktionelles Gewebe im Sinne einer Wiederherstellung der Funktion der abgestorbenen Neurone dar, sie ist daher eine Defektheilung. Dennoch scheinen Astrozyten durch Ausschüttung neurotropher Substanzen auch zum Wachstum verletzter neuronaler Fortsätze beizutragen (Manthorpe et al. 1983; Liesi et al. 1984).

5. **Immunabwehr:** Seit sich gezeigt hat, dass Astrozyten auch antigen-präsentierende Zellen mit Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) auf der Zelloberfläche sein können, wird davon ausgegangen, dass sie auch an der immunologischen Abwehr beteiligt sind (Naparstek et al. 1983).
6. **Leitstrukturen:** Die radiäre Glia, eine Frühform späterer Astrozyten, bildet während der Neurogenese Leitstrukturen, entlang derer Nervenfortsätze ihr Ziel finden. Dabei gibt die radiäre Glia Mediatoren (u.a. Nervenwachstumsfaktor, Laminin, Fibronectin) ab, die die Entstehung einer komplexen neuronalen Struktur erst ermöglichen (Junqueiro und Carneiro 1996).

I.3. Hypoxie und Ischämie

Hypoxie bedeutet eine erniedrigte O₂-Konzentration im Gewebe, meist verursacht durch eine Verschlechterung der Perfusion aufgrund verschiedener Pathogenesen, so z.B. im Rahmen des Myokardinfarkts oder des Apoplexes. Tritt eine Minderdurchblutung des Gewebes ein, kommt es meist auch zu einer Mangelversorgung mit Glukose, so dass es durch das Fehlen von O₂ und Glukose zu einem Synergieeffekt (Ischämie) kommt, der oft im Absterben der Zelle endet. Für das Überleben der Zellen sind deshalb die Dauer der Hypoxie bzw. der Ischämie, die Zellart und die je nach Zellart verschiedenen Möglichkeiten der Kompensation wichtig. Um einen hypoxischen Zustand zu erzeugen, wurden die Zellkulturen in der vorliegenden Arbeit in Normalmedium (siehe Teil III. Methoden) im Hypoxie-Brutschrank bei 1% O₂ inkubiert. Da bei hypoxisch/ischämischen Ereignissen der Organismus versucht, das geschädigte Gebiet einzugrenzen und Schäden möglichst gering zu halten, sind an diesem Geschehen viele Zellarten (so z.B. Lymphozyten aus dem Blut) beteiligt. In den durchgeführten Experimenten ist dies nicht der Fall, weshalb auch von einer „In-vitro-Ischämie“ gesprochen wird.

I.4. Blut-Hirn-Schranke

Bereits 1885 zeigte Paul Ehrlich, dass saure Farbstoffe nach Injektion ins Blut nicht in die Zerebrospinalflüssigkeit des Gehirns übertraten. Er zog daraus den Schluss, dass die Gehirnstrukturen keine Affinität zum verwendeten Anilinfarbstoff hätten. Das Kontrollexperiment führte sein Schüler Gehrman erst 20 Jahre später durch und zeigte so, dass die mangelnde Anfärbbarkeit nicht an der fehlenden Affinität des Gehirns zum Farbstoff lag, sondern dass der Farbstoff durch eine Barriere davon abgehalten wird, diese Strukturen anzufärben. In die Blutbahn injizierte Farbstoffe wie beispielsweise Trypanblau führen zu keiner Färbung des Gehirns im Gegensatz zu anderen Geweben (Betz et al. 1994). Der Begriff der Blut-Hirn-Schranke, kurz BHS, wurde schließlich 1921 von Stern und Gautier geprägt und bezeichnet bis heute das Hindernis, das Stoffe beim Übertritt aus dem Blut ins Gehirn überwinden müssen. Die BHS bildet eine Barriere für nicht lipidlösliche Substanzen und Proteine. Die anatomische Blut-Hirn-Schranke wird vom Kapillarendothel mit seinen „tight junctions“ gebildet. Die Endothelzellen der Gehirnkapillaren sind in vivo von einer kollagenhaltigen extrazellulären Matrix mit eingebetteten Perizyten umgeben. Direkt an diese Matrix schließen sich die Endfüßchen der Astrozytenausläufer an, die 90% der Kapillaraußenseite bedecken. Der Abstand zwischen den astrozytären Endfüßchen und der Membran der Endothelzellen beträgt lediglich 0,4 nm (Pardridge 1991). Diese räumliche Beziehung führte zu der Annahme, dass Astrozyten direkt an der Blut-Hirn-Schranke mitwirken. Es wurde gezeigt, dass Astrozyten eine Induktion von „tight junctions“ des Endothels bewirken (Cancilla et al. 1993; Giese et al. 1995). Die Astrozyten sind an der „metabolischen“ Blut-Hirn-Schranke beteiligt und dienen der Induktion und Aufrechterhaltung der BHS über ihren Einfluss auf das Kapillarendothel. Die Beeinträchtigung der BHS geht wegen der Erhöhung der Permeabilität meist mit schweren ZNS-Erkrankungen einher. Umgekehrt zieht aber auch jede schwere ZNS-Erkrankung eine Störung der BHS nach sich, beispielsweise bei Tumoren, Neurotraumen, Neurodegeneration oder Ischämie. Ein Hirnödem bedeutet eine Volumenzunahme der Zellen im Gehirn. Dadurch verkleinern sich die Liquorräume, die Durchblutung wird verringert und es

kommt zum Hirndruck. Dies kann auf verschiedene Arten geschehen:

1. **Vasogen**, d.h. durch erhöhte Permeabilität der Kapillarendothelien.
2. **Hypoxisch-ischämisch**: Infolge des Glukose- und O₂-Mangels kommt es zu einem Abfall von ATP und konsekutiv zum Ausfall der Na⁺/K⁺-ATPase. Durch den Zusammenbruch der Volumenregulation kommt es zum Anschwellen von Neurone, Glia- und Endothelzellen und zum Zusammenbruch der BHS.
3. **Osmotisch**: Wasser (z.B. bei Wasserintoxikation, Hyponatriämie) führt zu einer Endothelschädigung, die die BHS durchlässig werden lässt. Es kommt zum Natrium- und Wassereinstrom. Hyperosmolare Zustände (z.B. bei hyperosmolarem Koma) führen zu einer Exsikkose des Endothels und zum Entzug von Wasser aus dem Gehirn.
4. **Interstitiell**: Kommt es zu einer Abflußstörung des Liquors z.B. durch Verlegung des Foramen Monroi, so führt dies zum Liquoraufstau und zum interstitiellen Hirnödem.

Bei allen oben beschriebenen pathologischen Zuständen kommt es zu einer Schädigung der BHS mit einer erhöhten Permeabilität für Stoffe, die toxisch auf das Gehirn wirken. Durch die metabolische Funktion und die räumliche Beziehung sind die Astrozyten bei einer Schädigung der BHS mitbetroffen.

I.5. Erythropoietin

I.5.1. Die Suche nach EPO

Im Jahr 1906 injizierten Carnot und Deflandre in einem Experiment normalen Kaninchen Plasma von anämischen Tieren und stellten einen Anstieg der peripheren Blutzellen fest. Sie postulierten daraufhin einen humoralen Faktor, der die Bildung von Blutzellen kontrollieren sollte und bezeichneten ihn als „Hämopoietin“. Der Begriff „Erythropoietin“ wurde erst 1948 von Bondsdorff und Jalavisto eingeführt, als sich der von Carnot und Deflandre beschriebene Faktor als Wachstumsfaktor für Erythrozyten herausstellte. Reissmann bestätigte die These, dass Erythropoietin lediglich das Wachstum von Erythrozyten anregt, im Jahr 1950. Im Jahr 1957 wurde durch Jacobson et al. die Niere als primärer Ort der Erythropoietinbildung identifiziert. Die Arbeitsgruppe um Miyake isolierte 1977 erstmals Erythropoietin aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie. 1985 erfolgte schließlich die Klonierung und gentechnische Herstellung von EPO durch Jacobs und Mitarbeiter. Im Jahr 1987 war Erythropoietin erstmals als Therapeutikum für die Indikation der renalen Anämie in Europa erhältlich und das erste im klinischen Alltag verwendete, allein biotechnologisch hergestellte Medikament überhaupt.

I.5.2. Struktur, Gen und Wirkungsweise von Erythropoietin

Erythropoietin, kurz EPO, ist ein sialisiertes, saures Glykoprotein-Hormon mit einer Molekularmasse von 34000 Da (für rhEPO in der β -Form (Ehrenreich et al. 2002)). Der Genort befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q22.1), siehe Abbildung 1.

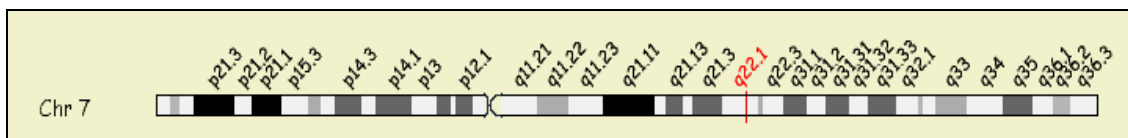
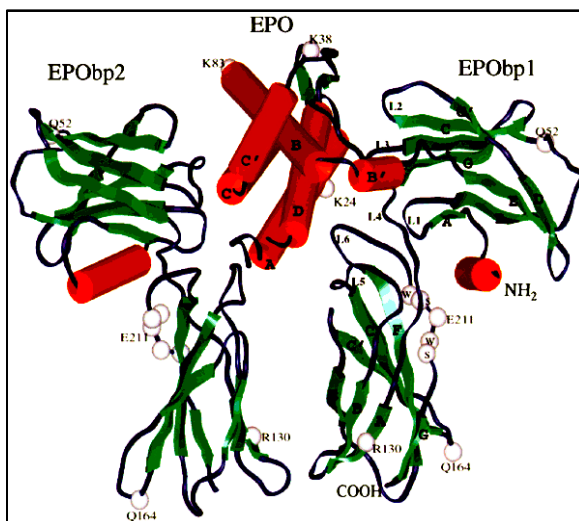


Abb. 1 Chromosom 7 mit Genort q22.1 für Erythropoietin, rot markiert

Die Abbildung stammt von der Webpage www.Genecard.com, letzter Zugriff 10/05.

Das Gen enthält fünf Exons und vier Introns (Dowell et al. 1986). Speicherformen des Genprodukts konnten bislang nicht nachgewiesen werden, so dass von einer De-novo Synthese ausgegangen wird (Hirth et al. 1988). Das Genprodukt ist ein monomeres Protein, das aus 193 Aminosäuren besteht, von

denen während der Proteinreifung die ersten 27 abgetrennt werden (Jacobs et al. 1985), so dass das Endprodukt 166 Aminosäuren aufweist. Etwa 40% des Molekulargewichts entfallen auf die Glykosylierung. EPO ist N-glykosyliert an den Aminosäuren Asn24, Asn36 und Asn83 sowie O-glykosyliert an Ser126, es existieren somit vier Bindungsstellen für die glykosidischen Reste. Die Halbwertszeit von glykosyliertem EPO beträgt zwischen zwei und zwölf Stunden. Der Kohlenhydratanteil mit den endständigen Sialinsäuren ist für die biologische Aktivität von EPO entscheidend und schützt das Hormon vor dem raschen Abbau durch die Leber (Hirth et al. 1988). Asialoerythropoietin, das durch enzymatische Desialysierung hergestellt wird und somit nicht glykosyliert ist, hat eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit. Es hat keinen hämatopoetischen Effekt, gilt jedoch als neuroprotektiv und erscheint im Liquor (Erbayraktar et al. 2003).



Erythropoietin besteht aus α -Helices (Abb. 2, rot markierte Bereiche) und β -Faltblattstrukturen (Abb. 2, grün markierte Bereiche). EPO beinhaltet zwei Disulfidbrücken zwischen Cys7 und Cys161 sowie Cys29 und Cys33. Die molekulare Struktur von EPO wurde u.a. von Cheetham et al. (1998) untersucht.

Abb. 2 Struktur von Erythropoietin
nach Syed et al. (1998)

Es existieren verschiedene Isoformen von Erythropoietin: EPO- α , EPO- β , EPO- Ω , die sich lediglich in ihrem Glykosylierungsmuster und -gehalt unterscheiden (EPO- α besitzt 39%, EPO- β 24% Kohlenhydratanteil). Pharmakologisch besteht kein Unterschied zwischen der Alpha- und der Beta-Form. Beim Menschen kommt natürlicherweise EPO- β im Blut vor, weshalb sich die Untersuchungen zu dieser Arbeit auf EPO- β beschränken. Die Aminosäuresequenzen von EPO sind zwischen Nagetieren (z.B. der Ratte) und dem Menschen zu etwa 80%

identisch (Browne et al. 1986; Koury und Bondurant 1992). Erythropoietin wird beim Erwachsenen hauptsächlich von peritubulären Zellen der Niere gebildet (Bachmann et al. 1993), in der Fötalphase spielt auch die Produktion in Ito-Zellen der Leber eine wichtige Rolle (Fried 1972; Maxwell et al. 1993). Beide Zelltypen weisen funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten auf (Buniatian 1997). Der Übergang von der Produktion der Leber zu der Produktion der Niere erfolgt schrittweise ab dem 120. – 140. Tag der Schwangerschaft und ist etwa 40 Tage nach der Geburt abgeschlossen (Zanjani 1981). Allerdings kann ein Ausfall der renalen Produktion beim Erwachsenen nicht durch die Leber kompensiert werden (Sundal und Kaeser 1989).

I.5.3. Pharmakodynamik von EPO

Erythropoietin erhöht die Anzahl der roten Blutkörperchen durch Stimulation der erythropoetischen Stammzellen (CFU-Progenitors, Colony Forming Units) im Knochenmark, wird hierfür von peritubulären Zellen der Nieren produziert und bei Hypoxie vermehrt gebildet. Dabei wirkt EPO als essentieller Wachstums- und Überlebensfaktor auf späte erythroide Vorläuferzellen (Krantz 1991; Jelkmann 1992). Die Bindung von EPO an seinen Rezeptor ermöglicht diesen Zellen die Ausdifferenzierung zu Retikulozyten und Erythrozyten, indem eine frühzeitige Apoptose verhindert wird – auf diese Zellen wirkt EPO proliferativ und antiapoptotisch (Koury und Bondurant 1990). Ebenfalls antiapoptotisch wirksam zeigt sich EPO auf Motoneurone bei experimenteller ischämischer Rückenmarksschädigung (Celik et al. 2002).

Heute wird in ovariellen Hamsterzellen rekombinant hergestelltes EPO, kurz rHuEPO (NeoRecormon[®] (EPO- β) ROCHE; Eprex[®] (EPO- α) JANSSEN-CILAG), bei Patienten mit renaler, tumorbedingter oder durch chronische Blutungen bedingter Anämie sowie bei autologen Bluttransfusionen mit gutem Erfolg und wenigen Nebenwirkungen eingesetzt (Canadian Erythropoietin Study Group 1990; Evans et al. 1990). Klinisch relevant ist als Nebenwirkung lediglich die hypertensive Wirkung von EPO, die jedoch nicht direkt unter der Applikation auftritt und fast nur bei niereninsuffizienten Patienten beobachtet wird, obwohl andere Patienten sehr viel höhere Dosierungen erhalten. EPO hat daher keine direkte hypertensive Wirkung, sondern führt erst durch die Korrektur der

Anämie und der damit einhergehenden Erhöhung des peripheren Widerstandes zur Hypertension bei prädisponierten Patienten (Raine und Roger 1991; Maschio 1995).

I.5.4. Pharmakokinetik von EPO

Die physiologischen Konzentrationen von EPO im Serum betragen beim Menschen zwischen 10 und 25 mU/ml (Adamson 1996), dies entspricht einer Konzentration von ca. 3 bis 7 pmol/l (Cotes 1982; Erslev 1991a). Jede Form von Sauerstoffmangel, sei es durch Reduktion oder Blockade der O₂-Transportkapazität (z.B. bei Anämie oder CO-Exposition) oder durch die Verminderung der O₂-Sättigung im Rahmen von Ventilationsstörungen oder in großer Höhe, führt beim Gesunden nach etwa 1,5 Stunden zu einem Anstieg der EPO-Konzentration im Serum. Bei schwerer nicht-renaler Anämie kann die Plasmakonzentration tausendfach gegenüber dem Normalen erhöht sein (Cotes 1982; Erslev 1991b; Eckhardt 1998). Die EPO-Genregulation erfolgt dabei über „Sensormoleküle“, die dann Signalkaskaden auslösen, bis schließlich HIF-1 an die DNS bindet (Huang et al. 1997). Die Elimination von EPO erfolgt durch hepatische Metabolisierung (Spivak und Hogans 1989). Die Bindung an die Hepatozyten erfolgt proteinvermittelt (Samtleben und Gurland 1990). Die Eliminationsgeschwindigkeit ist entscheidend von der Oligosaccharid-Zusammensetzung des Moleküls bestimmt. Asialoerythropoietin wird sehr rasch abgebaut und kann deshalb keine Wirkung auf die Erythropoese entfalten (Hirth et al. 1988). Die Niere ist zwar Produktionsstätte von EPO, spielt bei der Metabolisierung und Ausscheidung aber eine untergeordnete Rolle. Die renale Ausscheidung von EPO beträgt etwa 0,5 bis 9 Units pro Tag und ist umgekehrt proportional zum Hämoglobinwert. EPO wird ins Lumen der Nierentubuli sezerniert und mit einer renalen Clearance von 1 ml/min eliminiert (Samtleben und Gurland 1990). Die EPO-Clearance wird durch eine abnehmende Nierenfunktion nicht beeinträchtigt (Steinberg et al. 1986). Die Eliminationshalbwertszeiten nach i.v.-Applikation schwanken zwischen 4,4 und 11 Stunden (Flatharty et al. 1989). Flatharty et al. gehen von einer Elimination erster Ordnung aus. MacDougall et al. (1989) und Cotes (1989) ermittelten für dialysepflichtige Patienten einen monophasischen Verlauf. Nach i.m.-Injektion

verteilt sich EPO innerhalb von 30 Minuten in einem Plasmavolumen von ca. 75 ml/kg Körpergewicht, dies entspricht einem scheinbaren Verteilungsvolumen von 5 bis 6 Litern (Samtleben und Gurland 1990). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied bezüglich der EPO-Plasmaspiegel besteht nicht. Die EPO-Konzentration im Plasma von Kindern entspricht den Werten beim Erwachsenen. Der Verlauf der EPO-Sekretion ist laut einigen Arbeiten biphasisch mit den höchsten Serumspiegeln morgens und den niedrigsten am Abend (u.a. Fisher 1997). Während der Schwangerschaft wurden drei- bis vierfach erhöhte Konzentrationen von EPO im Plasma gemessen (Cotes 1989).

I.5.5. Vorkommen von EPO in Zellen des ZNS

EPO wird im Gehirn von Astrozyten und Neurone, nicht aber von Mikrogliazellen produziert (Bernaudin et al. 2000). EPO-mRNA findet sich in humanen Astrozyten. Zu einer EPO-Rezeptor-Expression kommt es jedoch auf Astrozyten, Neurone und Mikrogliazellen. Nagai et al. fanden in Oligodendrogliazellen weder EPO-mRNA noch eine EPO-Rezeptor-Expression (Nagai et al. 2001).

I.5.6. Wirkung von EPO auf das ZNS

Neuronale Stammzellen differenzieren unter dem Einfluss von EPO vermehrt zu Neurone aus, dieser Effekt ist durch EPO-neutralisierende Antikörper aufhebbar (Shingo et al. 2001). Die Autoren dieser Arbeit leiten daraus ab, dass EPO in vitro und in vivo die Entwicklung von Neurone aus Vorläuferzellen reguliert. Wie wichtig EPO für die physiologische Hirnfunktion ist, zeigen Studien, bei denen Patienten im Endstadium eines Nierenversagens mit einem durchschnittlichen Hämatokrit von 31,5% rHuEPO gegeben wurde. Nach Anheben des Hämatokrits auf Werte um 43% zeigte sich eine signifikante Besserung der Hirnleistung und eine Abnahme pathologischer EEG-Veränderungen (Grimm et al. 1990; Marsh et al. 1991; Pickett et al. 1999). Ähnliches zeigte eine Studie an Dialysepatienten von Nissenson 1991. Es ist nicht bekannt, ob die Verbesserung der Hirnleistung durch eine bessere Hirnversorgung mit O₂ (durch den erythropoetischen Effekt von EPO) bedingt ist oder ob den gesteigerten kognitiven Leistungen eine durch EPO verbesserte Kompensation

von anfallenden neurotoxischen Stoffen zugrunde liegt. Das von Hirnzellen produzierte EPO scheint ein niedrigeres Molekulargewicht zu haben als das EPO im Serum, ersteres soll jedoch eine höhere Aktivität als jenes im Blut besitzen. Diese Unterschiede werden dem unterschiedlichen Glykosylierungsgrad zugeschrieben (Masuda et al. 1994). Auch protektive Auswirkungen auf das Lernverhalten im Tiermodell wurden beschrieben (Catania et al. 2002). Eine Untersuchung von Siren et al. aus dem Jahr 2001a zeigt den Verlauf der EPO/EPO-Rezeptor-Expression an humanen Hirnschnitten nach einem hypoxisch-ischämischen Ereignis. Im frischen Infarktgebiet fand sich EPO hauptsächlich im Endothel. Wird der Infarkt überlebt, reorganisieren Astrozyten das Gebiet der Schädigung. In diesen „reaktiven“ Astrozyten findet sich dann auch eine verstärkte EPO/EPO-Rezeptor-Expression. Eine ähnlich zeitabhängige Dynamik der EPO-Expression findet sich auch bei Mäusen mit experimentell erzeugter fokaler Ischämie (Bernaudin et al. 1999). Beide Arbeiten unterstreichen den neuroprotektiven Effekt von EPO bei ischämischen Ereignissen des Gehirns. Da EPO stark glykosyliert ist, ging man lange davon aus, dass peripheres EPO nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Es wurde jedoch an Nagern gezeigt, dass bei einmaliger intraperitonealer Injektion von radioaktiv markiertem EPO dieses über einen spezifischen Rezeptor-vermittelten Transport die BHS überwindet. Zudem schützte EPO in diesem Experiment das Gehirn der Tiere gegen verschiedene, experimentell zugefügte neurotoxische Schäden. So zeigte sich bei verschiedenen Versuchen an Tieren beispielsweise bei Gabe von EPO 24 Stunden vor und bis zu 6 Stunden nach einem durch Abbinden einer hirnversorgenden Arterie erzeugten Schlaganfall eine signifikant kleinere Ausdehnung der Ischämiezone als bei der Kontrollgruppe (Cerami et al. 2001; Brines et al. 2002). Weitere Arbeitsgruppen fanden bei Versuchen mit experimentell erzeugten Subarachnoidalblutungen bei Kaninchen, dass bei Tieren, die EPO erhalten hatten, sowohl die Mortalität als auch die neurologischen Schäden bei EPO-Gabe signifikant ($p < 0,001$) geringer waren. Auch hier wird der vermutete neuroprotektive Effekt von EPO als wahrscheinlich angesehen (Alafaci et al. 2000; Grasso 2001). Der EPO-

Rezeptor ist notwendig für eine normale Entwicklung des Mäusegehirns. Fehlt der EPO-Rezeptor, kommt es zu einer hohen neuronalen Apoptoserate im sich entwickelnden Gehirn der Tiere, was als weiteres Indiz für die Wichtigkeit von EPO als Faktor der Neuroprotektion und des Wachstums gesehen wird (Yu et al. 2002). Zudem wird EPO eine Rolle bei angiogenetischen Vorgängen und Gefäßneubildungen zugeschrieben (Buemi et al. 2002).

I.5.7. Faktoren, die die EPO-Expression beeinflussen

Verschiedene Faktoren beeinflussen die EPO-Expression im ZNS. Bis heute kennt man den Einfluss von Insulin-like Growth Factors 1 und 2 (IGF-1 und IGF-2), Insulin und unter experimentellen Bedingungen AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure), Desferrioxamin (DFX) und Kobaltchlorid. IGF-1, IGF-2 und Insulin stimulieren die EPO-Produktion in primären Astrozyten. IGF in Konzentrationen von 3 nM IGF-1 und 10 nM IGF-2 sowie 100 nM Insulin erreichten eine halbmaximale Aktivierung, wobei die EPO-mRNA hochreguliert wurde. Dieser Effekt wurde durch die O_2 -Konzentration nicht beeinflusst (Masuda et al. 1994). Substanzen, die die EPO-Expression in Neurone und Astrozyten erhöhen, sind AMPA (Sinor und Greenberg 2000), DFX und Kobaltchlorid (Bernaudin et al. 2000).

I.5.8. Signaltransduktion bei Bindung von EPO an seinen Rezeptor

Bindet EPO an den EPO-Rezeptor, kommt es zu einer Homodimerisierung der zytoplasmatischen Domänen des Rezeptors. Dies führt zur Aktivierung der JAK-2, einer Tyrosinkinase, des wichtigsten Mediators bei der Signaltransduktion der erythropoetischen Wirkung von EPO. Durch Anlagerung an die intrazelluläre Domäne des EPO-Rezeptors wird die JAK-2 aktiviert und phosphoryliert anschließend Tyrosin-OH-Gruppen des Rezeptors mit der Folge, dass STAT-5-Proteine (Signal Transducers and Activators of Transcription) an Tyrosylphosphate binden (Chin et al. 1996 und 1998). Nach Phosphorylierung von STAT-5 dimerisiert dieses, wandert als Dimer in den Zellkern und aktiviert dort spezifische Gene (siehe Abb. 3). Diese Signalkaskade wird von vielen Faktoren beeinflusst, dazu gehören Adenosin, ACTH, renale Prostanoiden und Katecholamine.

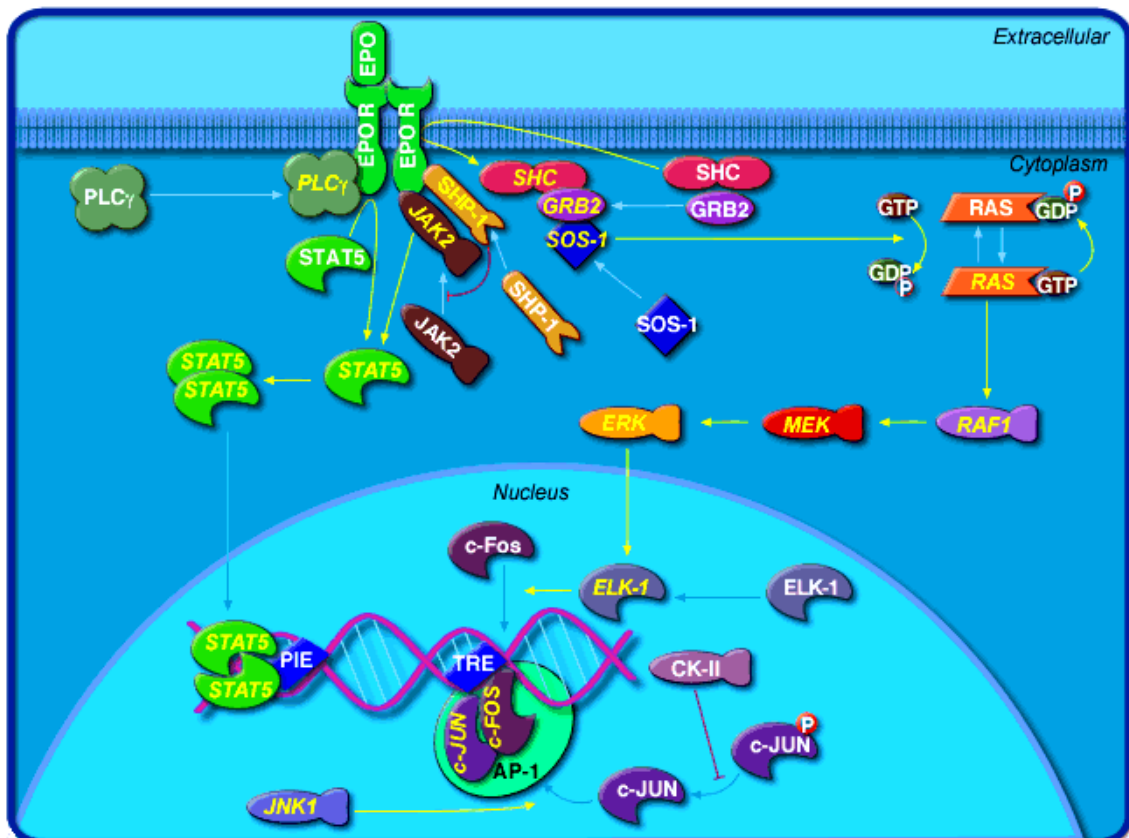


Abb. 3 Signaltransduktion über STAT-5 bei Bindung von EPO an den Rezeptor
modifiziert nach Walter O'Dell unter www.BioCarta.com; letzter Zugriff 12/06

Bindet EPO an die extrazelluläre Domäne seines Rezeptors, laufen verschiedene molekulare Prozesse ab:

1. Steigerung der Ca^{2+} -Aufnahme in die Zelle über spannungsabhängige Ionenkanäle (Miller et al. 1999).
2. Steigerung der Phosphorylierung sowohl des Rezeptors als auch verschiedener intrazellulärer Proteine (Beris 1998).
3. Steigerung der Glukoseaufnahme in die Zelle innerhalb einer Stunde (Beris 1998).
4. Anstieg des Transferrin-Rezeptors nach sechs Stunden (Beris 1998).
5. Aktivierung verschiedener Adenylatzyklasen und Erhöhung des zytosolischen AMP-Spiegels (D'Andrea und Zon 1990).
6. Beginn der Hämoglobin-Synthese nach etwa zwölf Stunden (Beris 1998).

Der zweite wichtige, durch EPO beeinflusste Signaltransduktionsweg ist der über das ras-Onkogen (rat sarcoma onkogen). Dazu muss eine Membranregion des EPO-Rezeptors phosphoryliert werden, um im nächsten Schritt die

Assoziation der hämatopoetischen Zellphosphatase (HCP) zu ermöglichen. Die Aktivierung des ras-Signaltransduktionswegs beinhaltet: Phosphorylierung von SHC (einem Protoonkogen), Assoziation von SHC mit Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) und SOS1 (son of sevenless 1), Aktivierung von RAF-1, Phosphorylierung von MAP-Kinasen (MEK, ERK, ELK-1, c-Fos) und schließlich die Aktivierung der Transkription (siehe Abb. 3). Die genaueren molekularen Abläufe, soweit bekannt, müssen an dieser Stelle weiterführender Literatur überlassen bleiben.

I.5.9. EPO-Wirkungen bei Hypoxie-induzierter Apoptose

Die zwei verschiedenen Modelle des Zelltodes, die Apoptose und die Nekrose, können anhand ihrer Unterschiede bezüglich morphologischer, biochemischer und molekularer Veränderungen der sterbenden Zelle unterschieden werden. Apoptose, der „programmierte Zelltod“, ist der häufigste Zelltod bei eukaryonten Zellen. Die Apoptose stellt einen physiologischen „Selbstmordmechanismus“ dar, welcher eine Homöostase garantiert, in deren Verlauf der Zelltod ein normaler Vorgang während der Erneuerung des Gewebes ist. Im Allgemeinen zeigen Zellen, die der Apoptose unterliegen, charakteristische Veränderungen im Kern und im Zytoplasma, ein Verklumpen der Plasmamembran und eine Desintegration des Kerns. Während der Apoptose kommt es zur Aktivierung einer Kalzium-abhängigen Endonuklease und zur Zerstückelung der DNS in verschieden große Fragmente (Compton 1992). Die apoptotischen Zellen werden sehr schnell von Phagozyten oder benachbarten Zellen aufgenommen, noch bevor durch Lyse der Zellinhalt der apoptotischen Zellen freigesetzt werden kann und eine Entzündungsreaktion hervorruft (Leist und Nicotera 1997). Apoptose ist notwendig für viele physiologische Prozesse wie Reifungs- und Erkennungsvorgänge des Immunsystems (Cohen et al. 1992; Allen et al. 1993) sowie für die Entwicklung von embryonalem Gewebe und läuft bei hormongesteuerten Umbauvorgängen ab (Strang et al. 2001). Apoptose kommt jedoch auch bei unphysiologischen Prozessen vor: so triggert u.a. oxidativer Stress den programmierten Zelltod. Dies ist besonders bei entzündlichen Prozessen der Fall, bei denen beispielsweise aktivierte neutrophile Granulozyten oxidativ wirkende Radikale wie Superoxidradikale produzieren,

um Bakterien am Eindringen in die Zelle zu hindern. Abbildung 4 zeigt vereinfacht die durch freie Radikale induzierten Apoptosemechanismen am Beispiel von Endothelzellen.

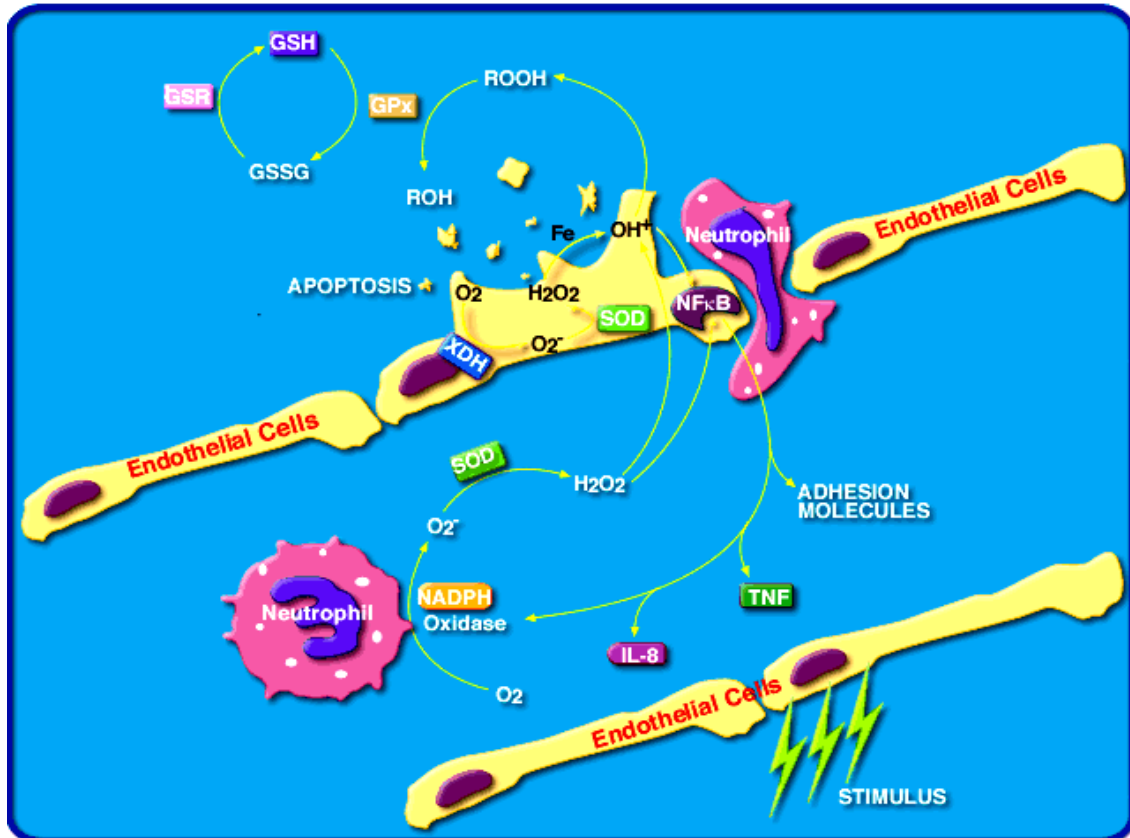


Abb. 4 Regelkreis bei Apoptose am Beispiel von Endothelzellen

modifiziert nach Gregg Hickey unter www.BioCarta.com; letzter Zugriff 12/06

Die Nekrose bezeichnet das Absterben von Zellen ohne ein kontrolliertes Ausscheiden aus dem Zellverband. Sie entsteht, wenn schädigende Einflüsse die Adaptationsmöglichkeiten der betreffenden Zelle überschreiten. Sie ist definiert als der irreversible Ausfall der Zellfunktion ohne Möglichkeiten der Regeneration und ist biochemisch durch die unumkehrbare Steigerung der Membranpermeabilität und durch den Zusammenbruch des intrazellulären Ionenmilieus gekennzeichnet (Thomas 1995). Möglicherweise ist die Nekrose auch die Folge einer nicht vollständig abgelaufenen Apoptose. Für apoptotische Vorgänge ist Energie notwendig. Steht diese Energie (in Form von ATP) nicht mehr zur Verfügung, so ist eine Apoptose nicht mehr möglich, es kommt zum nekrotischen Absterben der Zelle (Leist und Nicotera 1997). Proteine, die bei der Apoptose eine wichtige Rolle spielen, sind u.a. Caspasen, eine Klasse von

Cystein-Proteasen. Caspasen übermitteln apoptotische Signale einer proteolytischen Kaskade, wobei sich Caspasen gegenseitig verstärken und aktivieren. Dies ist in Abbildung 5 dargestellt.

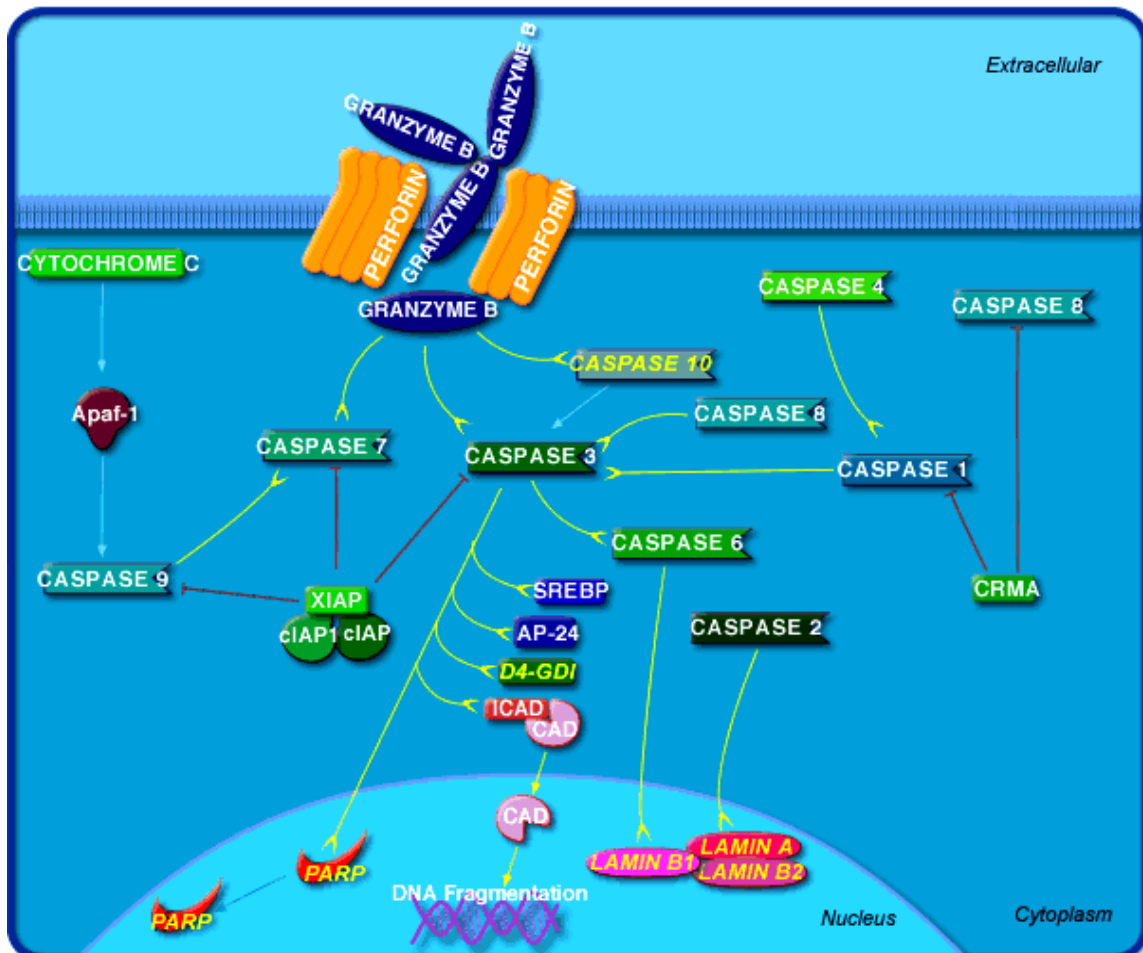


Abb. 5 Aktivierungskaskade der Caspasen zur Auslösung der Apoptose
modifiziert nach Kosi Gramatikoff unter www.BioCarta.com; letzter Zugriff 12/06

Zu den Caspasen am Beginn der Kaskade gehören Caspase-8 und Caspase-9, dabei ist Caspase-8 der initiale Faktor bei der Zellantwort an Death Domain Rezeptoren wie FAS. In den Mitochondrien beginnt unter Stress die Signaltransduktion mit der Freisetzung von Cytochrom C, welches dann mit Apaf-1 interagiert. Apaf-1 bewirkt die Selbstspaltung und Aktivierung von Caspase-9. Caspase-3, -6 und -7, allesamt „downstream“-Proteasen, werden durch „upstream“-Proteasen aktiviert und spalten Ziele innerhalb der Zelle. Dabei spielen insbesondere die Caspasen 3 und 7 Schlüsselrollen bei der Aktivierung der Apoptose, wie in Abbildung 5 zu sehen ist. Granzyme B und

Perforine, die von zytotoxischen T-Zellen im Rahmen der Immunabwehr produziert werden, induzieren Apoptose in den Zielzellen. Es wird vermutet, dass diese apoptotischen Vorgänge Caspasen-abhängig sind.

I.5.10. Das Zusammenspiel zwischen EPO, HIF-1 und Apoptose

Man weiß heute auch, dass EPO von astroglialem Gewebe als Reaktion auf einen hypoxischen Reiz sezerniert wird. Dies geschieht durch die Hochregulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 (HIF-1), eines heterodimeren, aus α - und β -Untereinheiten bestehenden Transkriptionsfaktors. Hypoxie im Gehirn stimuliert die Expression von HIF-1. Auch Kobaltchlorid induziert HIF-1 sehr stark (Jones und Bergeron 2001). HIF-1 reguliert auf Transkriptionsebene verschiedene für Zellwachstum und Differenzierung verantwortliche Gene, die bei O_2 -Mangel transkribiert werden, darunter die Gene für EPO, LDH-A, Endothelin-1, Transferrin, Transferrin-Rezeptor, Flk-1, Flt-1, VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF- β (platelet-derived growth factor- β), bFGF (basic fibroblast growth factor) und die Gene für weitere Proteine, die u.a. die Glykolyse betreffen (Agani et al. 2000; Wanner et al. 2000; Bernaudin et al. 2002). In den Abbildungen 6 und 7 sind diese Abläufe schematisch gezeigt. HIF-1 wird auch durch Desferrioxamin aktiviert (Prass et al. 2002). HIF-1 und Hepatic Nuclear Factor-4 erhöhen ihrerseits die EPO-Genexpression (Bunn et al. 1998). Durch HIF-1 induziertes EPO in hypoxischer Retina schützt gegen licht-induzierte retinale Degeneration (Grimm et al. 2002). HIF-1 wird unter Hypoxie in Mäusehirnen verstärkt gebildet (Bergeron et al. 2000). EPO schützt Neurone gegen chemische Noxen und Ischämie durch die Hochregulation der Expression von Bcl-xL, einem Faktor, von dem bekannt ist, dass er neuronales Überleben unterstützt (Wen et al. 2002). Die experimentelle Gabe von EPO vor hypoxischem oder anderem neuronalem Stress wirkt antiapoptotisch auf Neurone (Dawson 2002). Unter Hypoxie bei 1% O_2 steigen die Werte der EPO-mRNA um mehr als das 100-fache an (Marti et al. 1996; Bernaudin et al. 2002). Arbeiten von verschiedenen Gruppen zeigen, dass niedrigere O_2 -Konzentrationen zu höheren EPO-mRNA-Spiegeln im Gehirn von Affen führen, gleiches gilt für Mäuse mit Anämie (Marti et al. 1996; Masuda et

al. 1994; Liu et al. 1997). Es findet sich allerdings auch eine Arbeit, die zeigt, dass 30 pM EPO apoptotische Vorgänge bei neuronalen Zellen unter Hypoxie und gleichzeitigem Glukoseentzug reduziert, dieser Effekt sich bei Astrozyten jedoch nicht zeigt (Sinor und Greenberg 2000). Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über die antiapoptotischen Signalkaskaden, die durch EPO gesteuert werden.

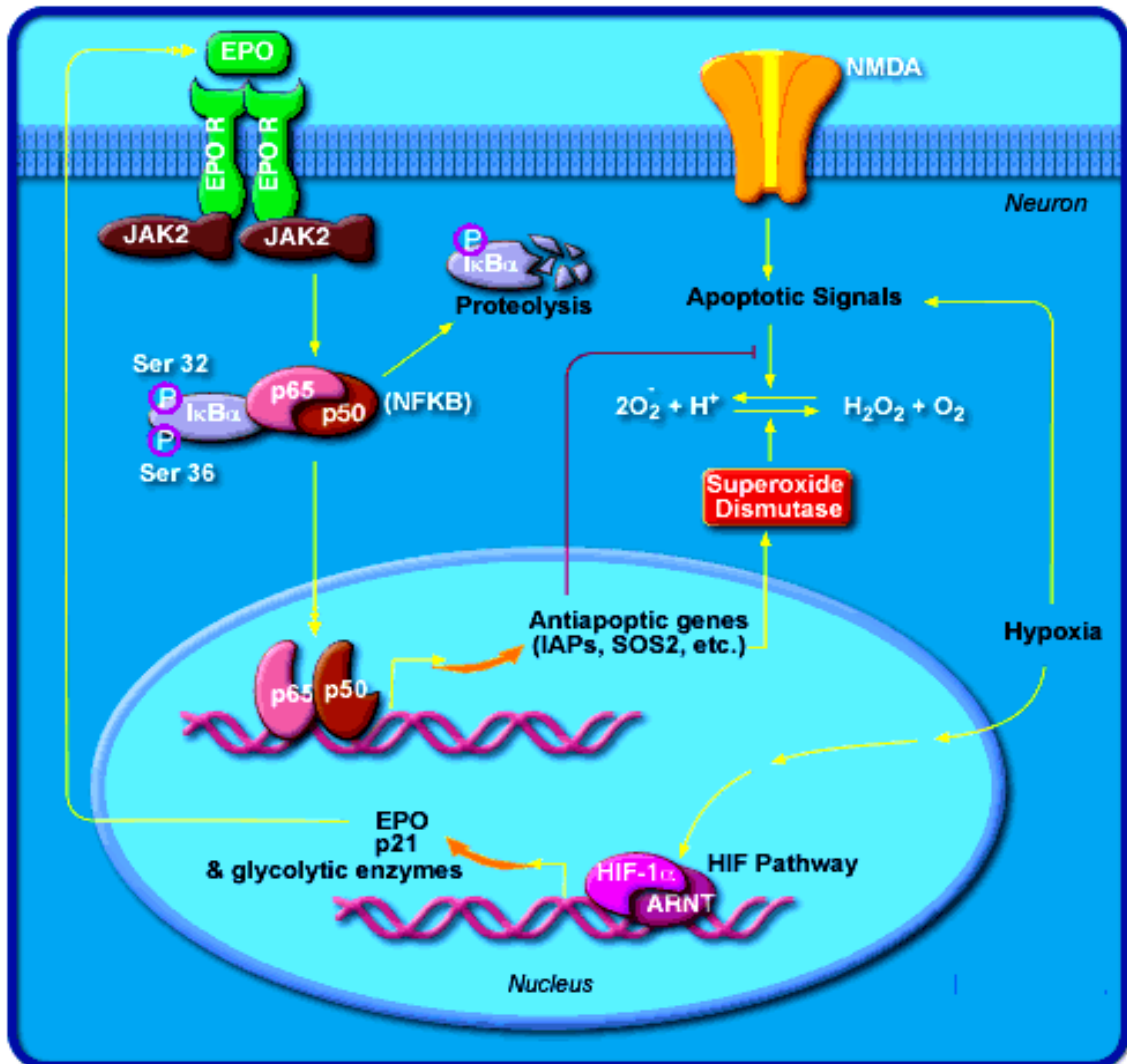


Abb. 6 Signaltransduktion bei antiapoptotischer Wirkung von EPO
modifiziert nach einer Abbildung unter www.BioCarta.com, Urheber unbekannt; letzter Zugriff 12/06.

I.5.11. Der Wirkungsmechanismus von EPO als neuroprotektiver Faktor

Wirkt EPO als neuroprotektiver Faktor, wird von der folgenden Signalkaskade ausgegangen: EPO aktiviert nach seiner Rezeptorbindung JAK-2-Proteine. Es wird angenommen, dass es über „downstream“-Mechanismen zur Aktivierung von STAT-5, Bcl-2, Protein-Kinase B, Cystein-Proteasen, Mitogen-aktivierenden Kinasen, Protein-dephosphorylierenden Phosphatasen und NF-κB kommt (Chong et al. 2002). In Abbildung 7 sind Teile dieser Signalkaskade dargestellt. Diese bleibt unvollständig, da die Details noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

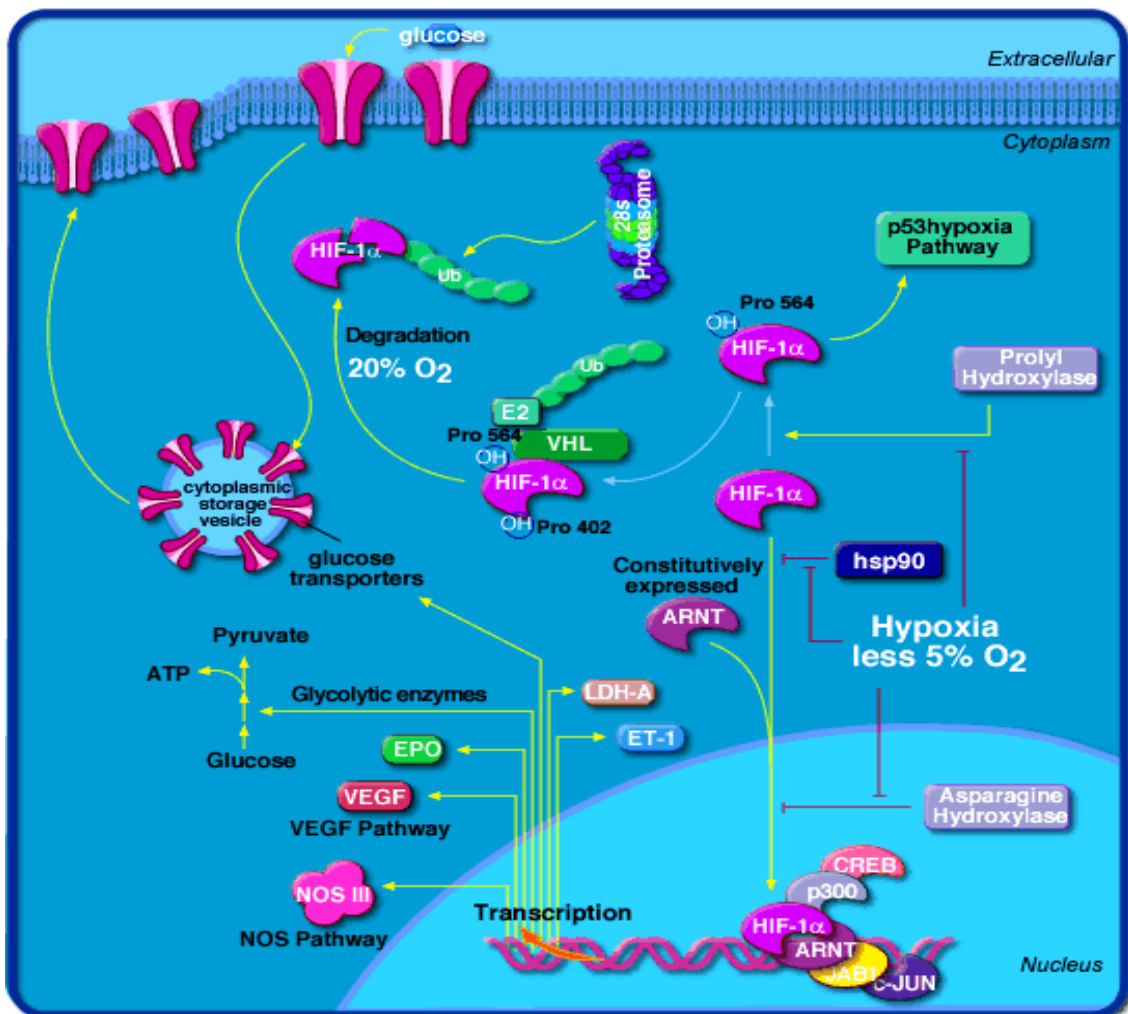


Abb. 7 Signaltransduktion in der Zelle unter Hypoxie

modifiziert nach Craig Monell unter www.BioCarta.com; letzter Zugriff 12/06

Die Neuroprotektion durch EPO unter Hypoxie beinhaltet die Interaktion des EPO-Rezeptors mit antiapoptotischen Signalwegen durch die Aktivierung von NF-κB mittels JAK-2 (Digicaylioglu und Lipton 2001). EPO stimuliert hier die

JAK-2-gesteuerte Phosphorylierung von I-κB, wodurch NF-κB entsteht, das dann in den Zellkern wandert und die Transkription von neuroprotektiven Genen wie z.B. SOS2 steuert (Mattson et al. 2000). Schematisch sind diese Vorgänge in Abbildung 6 gezeigt. Gene, die für Proteine kodieren, die neuroprotektive Wirkung besitzen und durch NF-κB aktiviert werden, sind beispielsweise Gene für die antioxidativ wirkenden Enzyme Superoxid-Dismutase und Calbindin D. Eisenchelatbildner scheinen einen neuroprotektiven Effekt zu haben, der zumindest teilweise durch eine Hochregulation von Genen, die für hypoxisch-ischämischen Stress kompensieren (z.B. EPO, HIF-1 und Enzyme der Glykolyse), zustande kommt (Zaman et al. 1999).

I.6. Eigene Fragestellung

Als Erythropoietin ab Mitte der 1980er Jahre gentechnisch hergestellt werden konnte und damit therapeutisch nutzbar wurde, revolutionierte es die Therapie der renalen Anämie. Waren vorher über 25% der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz dauerhaft transfusionspflichtig, ist dies heute nicht mehr notwendig, die Lebensqualität der Betroffenen verbesserte sich und Komplikationen wurden seltener. EPO stellt sich als ein wesentliches Zytokin der Erythropoese heraus. Seit Beginn der 1990er Jahre mehren sich die Hinweise dafür, dass EPO nicht nur – wie bisher angenommen – in den peritubulären Zellen der Nieren gebildet wird. Man weiß heute, dass viele Zellen des Gehirns bei Säugetieren EPO produzieren und dies in Zusammenhang mit einer neuroprotektiven und neurotrophischen Wirkung steht (Nagai et al. 2001; Siren et al. 2001a; Siren und Ehrenreich 2001). Diese Erkenntnisse führten zu Diskussionen über den möglichen therapeutischen Einsatz von EPO bei Schlaganfallpatienten; dies wurde in der klinischen Studie von Ehrenreich et al. 2002 überprüft. Daraus würde sich eine neue, wiederum revolutionäre Indikation für EPO ergeben, da bis heute keine Therapie bekannt ist, die eine Neuroprotektion nach einem schädigenden Ereignis ermöglicht. Etwa 85% der Schlaganfälle sind ischämischer, die verbleibenden 15% hämorrhagischer Pathogenese. Gleich welcher Ursache ist die kurze Zeitspanne, die zur Therapie bleibt, bevor bleibende Schäden am ZNS einsetzen, von zentraler Bedeutung. Die besondere Vulnerabilität des zerebralen Gewebes ist durch fehlende Sauerstoff- und Glukosevorräte bedingt. Der Energiegewinn des Gehirns erfolgt fast ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung. Demzufolge kommt es unter Hypoxie und Ischämie zu einem raschen neuronalen Funktionsausfall. Bereits nach 30 bis 40 Sekunden sistiert die Aktivität im Elektroenzephalogramm bei globaler Ischämie. Nach 4 bis 5 Minuten treten erste Nekrosen an Ganglienzellen auf (Poeck 1990; Dirnagl und Meisel 1998). Wegen dieser kurzen Zeit bis zum Eintritt unumkehrbarer Hirnschäden sind die Therapie-möglichkeiten für Schlaganfallpatienten limitiert. Es ist daher im besonderen Interesse der Patienten, die Zeitspanne bis zum Eintritt unumkehrbarer Schäden zu verlängern und dadurch genügend Zeit für

eine effektive Therapie zu gewinnen. Erythropoietin steht als möglicher neuroprotektiver Faktor in der Diskussion und wird im Gehirn von Astrozyten produziert. Zudem sind Astrozyten ein wichtiges Bindeglied zwischen Gefäßsystem einerseits und Neurone andererseits. Ihnen werden wesentliche Aufgaben bei der Regulierung der unter hypoxisch-ischämischen Einflüssen ablaufenden Stoffwechselfunktionen zugeschrieben. Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt, um die Veränderungen von Astrozyten unter hypoxischen Bedingungen und unter EPO-Stimulation genauer zu untersuchen und daraus auf ihre mögliche neuroprotektive Wirkung zu schließen. Es ergaben sich im Einzelnen folgende Fragestellungen:

1. Ist die EPO-Produktion in Astrozyten abhängig vom Alter der Zellen?
2. Wie verhält sich die EPO-Expression unter Normoxie und Hypoxie bei Zellen unterschiedlichen Alters?
3. Verhält sich die EPO-Sekretion analog zur EPO-Genexpression unter Normoxie und Hypoxie bei verschieden alten Zellen?
4. Wie reagieren Astrozyten unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen auf unterschiedliche EPO-Dosierungen?
5. Wie beeinflusst das Zellalter Astrozyten in ihrer Reaktion auf exogene EPO-Gaben unter Normoxie und Hypoxie?
6. Welchen Einfluss hat exogenes EPO auf die Proliferation von Astrozyten?
7. Welchen Einfluss hat EPO auf das Apoptoseverhalten von Astrozyten?
8. Welchen Einfluss hat der Differenzierungszustand von Astrozyten auf deren EPO-Expression?
9. Welchen Einfluss hat die exogene EPO-Gabe auf das Differenzierungsverhalten von Astrozyten?
10. Lässt sich aus den Beobachtungen zu Proliferation und Apoptoseverhalten von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie bei exogener EPO-Gabe ein möglicher protektiver Effekt von EPO auf Astrozyten ableiten?

Anmerkung: Solange die Zellen der Primärkultur nicht mittels spezifischer Marker (GFAP) eindeutig als Astrozyten charakterisiert sind, werden in dieser Arbeit die Begriffe "astrogliareiche Primärkultur" (APK) oder Astrogliazellen verwendet.

II. Material

II.1. Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Menge
EPO pab rabbit (H-162)	SANTA CRUZ	Sc-7956	200 µg
EPO mab mouse IgG _{2a}	BIOTREND	4297-5005	250 µg
EPO pab, clone AE7A5	BIOGENESIS	4297-5005	250 µg
GFAP Rabbit anti-Cow	DAKO	Z 0334	2 ml
GFAP mab mouse, clone GF 1224	PROGEN	61011	50 µg
Goat Serum	SIGMA	G9023	10 ml
Nestin mab mouse IgG1	B&D	611658	50 µg
PCNA mab mouse, IgG _{2a} clone PC10	CHEMICON	CBL 407	100 µg
SMAA mab mouse	PROGEN	61001	50 µg

II.2. Sekundärantikörper

Cy3 pab Goat anti-rabbit	DIANOVA	111-165-144	1,5 mg
Cy3 mab Goat anti-mouse	DIANOVA	115-165 166	0,5 mg
Cy3 mab Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	DIANOVA	111-165-003	2 mg
FITC Goat anti-Rabbit IgG conjugate	SIGMA	F 0511	0,5 ml

II.3. Molekularbiologische und zellbiologische Kits

Apo-ONE® Homogenous Caspase-3/7 Assay	PROMEGA	G7790	1 Kit
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	PROMEGA	G7571	1 Kit
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	PROMEGA	G1780	1 Kit
EPO-ELISA Testkit	MEDAC	500-VPDE	1 Kit

II. Material

Fortsetzung molekularbiologische und zellbiologische Kits

Fix Perm Cell Permeabilization Kit	CALTAG	GAS-004	200 tests
In-Situ-Cell-Death-Detection-Kit Fluorescein (TUNEL grün)	ROCHE	1 684 795	50 tests
LightCycler FastStart DNA Master Kit SYBER Green I	ROCHE	2 239 264	480 tests
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	74104	50 tests

II.4. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Menge
AMV-RT	PEQLAB	03-1011	10 µg
DMEM mit 4,5 g/l Glucose & L-Glutamin	BIOWHITTAKER	E12-604F	500 ml
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 µg auf 1ml Aqua bidest	PROMEGA	U1205, U1221 U1211, U1231	10 µg
FCS fetal calf serum	BIOWHITTAKER	14-801 F	500 ml
Methanol zur Analyse	MERCK	106009	2,5 l
Mounting Medium mit DAPI	VECTOR	H-1200	10 ml
Mounting Medium ohne DAPI	VECTOR	H-1000	10 ml
Natriumhydrogencarbonat	MERCK	1.06329.1000	1 kg
NeoRecormon® 1000 I.E. Epoetin β je Fertigspritze	ROCHE	PZN 8778064	N1
Oligo dT₁₅ Primer 500 µg je ml H ₂ O bidest	PROMEGA	C1101	20 µg
Primer EPO & Cyclophilin	THERMO ELECTRON	verschieden	38 nmol
PBS phosphate buffered saline, sterile	INVITROGEN	70011-036	500 ml
Penicillin G research grade, 1596 U/mg	SERVA	31749	25 g
Random Primer 500 µg je ml H ₂ O bidest	PROMEGA	C1181	20 µg
Silikonpaste „Baysilone“, mittelviskös	BAYER	-	35 g
Streptomycinsulfat 767 U/mg	SERVA	35500	100 g

II. Material

Fortsetzung Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Menge
Triton X 100	SIGMA	T 9284	100 ml
Trypan Blue Solution 0,4%	SIGMA	T8154	100 ml
Trypsin EDTA 0,05/0,01%, PBS mit Ca ²⁺	BIOCHROM	L 2145	500 ml

II.5. Zusätzliches Material

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.	Menge
AMICON ULTRA-15 PL-10	MILLIPORE	UFC9 010 24	96 St
Deckgläser 18 x 18 mm	LANGENBRINK	-	1000 St
Deckgläser 24 x 60 mm	LANGENBRINK	-	100 St
Kryoboxen -80 °C fest	VETTER	301001W1	1 St
LightCycler Kapillaren (Borosilicat-Glas)	ROCHE	1 909 339	96 St
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 10 µl	BRAND	702521	1000 St
Reaktionsgefäße 1,5 ml	EPPENDORF	0030 102.002	1000 St
Reaktionsgefäße 2 ml	EPPENDORF	0030 120.094	1000 St
Rastereinsätze für Kryoboxen	VETTER	30200130	1 St
Technisches Siebgewebe SEFAR NITEX 132 µm Maschenweite	SEFAR	03-132/44	5 m
Technisches Siebgewebe SEFAR NITEX 211 µm Maschenweite	SEFAR	03-210/40	5 m
Zellkulturschalen 10 cm Ø, steril	NUNC	150 350	10 St
Zellkulturschalen 5 cm Ø, steril	NUNC	150 288	10 St
Zellkulturflaschen 200 ml	NUNC	178905	5 St

II. Material

II.6. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absorptions-ELISA-Reader	TECAN CRAILSHEIM
Durchflußzytometer BD FACSCalibur	BECTON DICKINSON
Eismaschine	ZIEGERA
Fluoreszenzmikroskop BX 51 digital mit Station	OLYMPUS
Gefrierschrank Liebherr -25 °C	LIEBHERR
Gefrierschrank -80 °C	FORMA SCIENTIFIC
Heizblock HeizerDUO 2-2504	NEOLAB
Kühlschrank 4 °C	LIEBHERR
LightCycler System für Real-time-RT-PCR	ROCHE
Lumineszenz-Detektor Wallac MultiLabel Counter 1420	PERKIN ELMER
Magnetrührer	MONOTHERM
Neubauer - Kammer 0,1 mm Tiefe	NEUBAUER
pH-Meter 540 GLP	WTW
Pipette 5-10 µl	EPPENDORF
Pipette 10-100 µl	EPPENDORF
Pipette 100-1000 µl	EPPENDORF
Reinraumwerkbank Lamin Air HLB 124 mit Absaugvorrichtung	HERÄUS
Schüttelwasserbad	JULABO
UV-Spektrometer Ultrospec 3100	AMERSHAM PHAMABIOTECH
Vortex Mixer VM-300	NEOLAB
Wasserbad 37 °C	Eigenbau PCI Uni Tübingen

II. Material

Fortsetzung Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Wasserfiltrieranlage Simplicity 185	MILLIPORE
Zellinkubator Typ B 5060 EC CO ₂	HERÄUS
Zellinkubator C42; CO ₂ & O ₂ Steuerung	LABOTECT
Zellzentrifuge 5417 R	EPPENDORF
Zentrifuge für Eppendorfgefäße	EPPENDORF

III. Methoden

III.1. Allgemeine Techniken

Herstellung des Kulturmediums und Vorbereitungen für die Zellkultur

Material für 1 Liter Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10% FCS:

9,12 g DMEM Fertigpulver

3,70 g Natriumhydrogencarbonat

0,11 g Natriumpyruvat

100 ml FCS steril

1 ml Penicillin-/Streptomycin-Stammlösung

Penicillin-/Streptomycin-Stammlösung

2 Mio Einheiten Penicillin K-Salz und 1,5 Mio Einheiten Streptomycinsulfat wurden in 100 ml H₂O bidest. aufgelöst, sterilfiltriert und in 5 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Ansetzen des Mediums

9,12 g DMEM-Fertigpulver wurden mit 3,7 g Natriumhydrogenphosphat und 0,11 g Natriumpyruvat in 1 Liter H₂O bidest. aufgelöst. Anschließend wurde die Lösung solange mit CO₂ begast, bis ein pH-Wert von 7,35 erreicht wurde (mit pH-Meter pH-Wert bestimmen). Die Lösung wurde sterilfiltriert und in Flaschen abgefüllt. Unter Sterilbedingungen wurden 10% FCS (100 ml auf 900 ml DMEM) und 1 ml der sterilen Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt. Die Osmolarität des Mediums betrug zwischen 330 – 350 mosmol/l, der pH-Wert lag bei 7,3 – 7,4. Das Medium enthielt 25 mmol/l Glukose. Das Medium wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Bekleben der Kulturschalen mit Deckgläschen

Die Zellkulturen wurden zu immunzytochemischen Untersuchungen auf der Oberfläche von Deckgläsern angesät. Dazu wurden die Deckgläser (18x18 mm) unter sterilen Bedingungen mit Hilfe der mittelviskösen Silikonpaste auf den Boden der Kulturschalen geklebt.

Stimulieren der Kulturen mit Erythropoietin β (NeoRecormon[®])

Die Zellkulturen wurden zur Untersuchung der Wirkung von exogenem EPO durch Zugabe von Erythropoietin β (NeoRecormon[®], ROCHE) zum Zellkulturmedium über unterschiedliche Zeiträume (24 und 48 h) inkubiert. Dazu wurden die 300 μ l der Injektionslösung (1000 I.U.) zu 700 μ l sterilem PBS dazugegeben. 1 μ l dieser Gebrauchslösung entspricht so eine Aktivität von 1 U, so dass beispielsweise bei einer Stimulation mit 50 U je 10 cm-Zellkulturschale 50 μ l der Gebrauchslösung zugegeben wurden. Laut Hersteller enthält eine Fertigspritze NeoRecormon[®] mit 1000 I.U. 8,3 μ g rekombinantes humanes Erythropoietin. In der NeoRecormon[®]-Injektionslösung sind neben EPO verschiedene Aminosäuren und Puffersubstanzen enthalten. Werden nun 7,5 μ l der Gebrauchslösung zu 10 ml Kulturmedium (DMEM mit 10% FCS) zugegeben, entspricht dies etwa einer Verdünnung von 1:1333. Da im DMEM ebenfalls identische Aminosäuren enthalten sind, wurde aufgrund der hohen Verdünnung davon ausgegangen, dass bei der Zugabe der NeoRecormon[®]-Lösung tatsächlich nur das enthaltene EPO für die gemessenen Ergebnisse verantwortlich ist.

III.2. Präparation der astroglialen Primärkultur aus der Ratte

Zellkulturen werden ausgehend von einer aus dissoziiertem Gewebe entstandenen Einzelzellsuspension gezüchtet. Als „primär“ gelten Zellkulturen indes nur solange, bis sie das erste Mal abtrypsinisiert und erneut angesät werden. Die Zellzusammensetzung lässt sich u.a. durch die Präparationsmethode, die Wahl des Kulturmediums (Selektionsmedium) und die Dauer der Kultur beeinflussen. Um zu zeigen, welche Zellen hauptsächlich in der Kultur vorhanden sind, muss die Zusammensetzung mit Hilfe zelltypspezifischer Marker charakterisiert werden (siehe „Bestimmen der Reinheit der Zellkultur“, S. 43). Im Fall der astrogliareichen Kultur wurde GFAP als spezifischer Marker für Astrozyten verwendet (immunzytochemische Färbungen siehe Teil III.3.). Die Herstellung der astrogliareichen Primärkultur erfolgte nach Protokoll (Hamprecht und Löffler 1985) und wurde auch von Hansson 1986 beschrieben.

Benötigtes Material

- Puck's D1/Glukose/Saccharose PS 200, 4 °C, pH 7,4, steril, enthält:
 - 137 mM NaCl
 - 5,4 mM KCl
 - 0,22 mM KH₂PO₄
 - 0,17 mM Na₂HPO₄
 - 5,0 mM Glukose
 - 58,4 mM Saccharose
 - 200 U/ml Penicillin
 - 200 µg/ml Streptomycinsulfat
- Kulturmedium aus 90% DMEM mit 10% FCS, pH 7.4, 37 °C, steril
- Becherglas mit 70%igem Ethanol
- große Schere
- 2 gebogene Pinzetten
- Nylonnetze mit einer Maschenweite von 211 µm und 135 µm, beide Größen zu ca. 3 x 4 cm großen Taschen verschweißt, heißdampfsterilisiert bei 121 °C
- sterile Glaspipetten mit 10 ml, 5 ml, 1 ml
- Styroporbox mit Eis
- sterile Gewebekulturschalen 10 cm Durchmesser
- 1 Zentrifugenbecher 50 ml, steril
- 1 Glasflasche 500 ml steril
- Neubauer - Zählkammer
- sterile Deckgläschen 18 x 18 mm
- steriles Siliconfett
- neugeborene Ratten, maximal 24 h alt

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In 4 Kulturschalen wurden je 20 ml Puffer gegeben, 3 Schalen wurden auf Eis gestellt. Das Präparierbesteck wurde in Ethanol getaucht, abgeflammt und steril bereithalten.

Isolierung der Gehirne

Eine Ratte wurde mit der Pinzette am Schultergürtel festgehalten und kurz in Puck's D1 vollständig eingetaucht. Mit der Schere wurde rasch der Kopf dekapitiert und in eine Kulturschale fallen gelassen. Durch leichten Druck mit

der Schere auf das Hinterhaupt wurde das Gehirn durch das Cranialrohr gepresst. Das isolierte Gehirn wurde in die zweite Schale mit Puffer gegeben und auf Eis gestellt. Mit allen vorhandenen Tieren wurde in gleicher Weise verfahren. Die Kadaver wurden anschließend laut der geltenden Laborvorschrift entsorgt.

Gewebedissoziation durch Netzpassage

Eine Netztasche mit 211 μm Maschenweite wurde steril in die dritte Schale mit Puffer gelegt. Das Netz wurde mit einer Pinzette festgehalten und die Gehirne wurden nacheinander mit einer zweiten Pinzette in die Tasche gefüllt. Durch leichtes Drücken wurden die Gehirne vorsichtig durch das Netz in den Puffer passiert, das Netz wurde dann verworfen. Eine Netztasche mit 135 μm Maschenweite wurde mit einer Pinzette festgehalten und das Gewebedissoziat mit Puffer mittels einer Pipette aufgenommen und durch das Netz in den Zentrifugenbecher pipettiert. Aus der vierten Schale wurde der Puffer aufgenommen, damit wurde die zweite Schale gespült und zusammen mit der restlichen Zellsuspension durch das Netz pipettiert. Das Netz wurde verworfen, der Zentrifugenbecher verschlossen und bei 1500 rpm (300 g) 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 10 ml 37°C warmem Kulturmedium resuspendiert und in eine sterile Glasflasche zu 90 ml Kulturmedium dazugegeben.

Ansäen der Zellkultur

Ein kleines Volumen der Suspension wurde zur Zellzahlbestimmung entnommen, mittels Neubauerkammer ausgezählt und die Gesamtzellzahl bestimmt. Pro Gehirn wurde ein Richtwert von ca. 15 – 20 Mio Zellen angenommen. Je Zellkulturschale (\varnothing 10 cm) wurden, wenn nicht anders beschrieben, 6 Mio Zellen angesät. Je nach Experiment wurden entsprechend viele Kulturflaschen oder Kulturschalen bereitgestellt. Pro 10 cm Zellkulturschale wurden 10 ml Medium benötigt. Die Gesamtmenge an benötigtem Kulturmedium wurde berechnet und die Zellsuspension wurde auf die entsprechende Menge verdünnt. Die Zellsuspension wurde auf die Kulturschalen ausgebracht, dabei wurde die Lösung wiederholt vorsichtig

geschwenkt. Die Kulturschalen wurden im Inkubator bei 37°C mit 10% CO₂ im Gasgemisch aufbewahrt. Das Medium wurde bis zum Ende der Experimente alle 7 Tage erneuert. Als Richtwert lässt sich angeben, dass in den ersten 5 Tagen nach Anlegen der Kultur etwa 2/3 der ausgesäten Zellen absterben. Die überlebenden Zellen proliferieren, so dass etwa ab Tag 9, abhängig von der angesäten Zelldichte, eine konfluente Kultur erreicht wird (Daten nicht gezeigt).

Auszählen der Zellen

Die Zellen wurden mit Trypsin aus der Kulturschale abgelöst. Die Ränder der Neubauer-Zählkammer wurden befeuchtet und das Deckgläschen wurde auf der Kammer festgeschoben, bis Landousche Ringe sichtbar wurden. Dies gewährleistet das richtige Volumen der Kammer. Die Zellen aus der abtrypsinisierten Suspension wurden nativ oder 1:2 mit Trypanblau verdünnt mittels Pipette in die Kammer eingezogen. Unter einem Lichtmikroskop (10-fache Vergrößerung) wurden die Zellen ausgezählt. Zellkonglomerate konnten nicht ausgezählt werden, die Kammer musste dann gereinigt und neu befüllt werden, nachdem die Zellsuspension vorsichtig trituriert wurde. Die Zellzahl wurde nach dem Auszählen aller 4 Großquadrate wie folgt berechnet:

Zellzahl in den großen Quadranten

$$\frac{\text{Zellzahl in den großen Quadranten}}{4} \times 10\,000 = \text{Zellzahl pro ml Zellsuspension}$$

Wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt, wurde das Ergebnis noch mit dem Faktor 2 multipliziert. Trypanblau dient der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Die ungeschädigte Zellmembran der lebenden Zellen verhindert das Eindringen von Trypanblau ins Zytosol. Deshalb erscheinen die vitalen Zellen hell, während tote Zellen eine dunkelblaue Färbung aufweisen. Die Verdünnung der Zellsuspension sollte erst direkt vor Befüllung der Zellkammer erfolgen, um den toxischen Effekt von Trypanblau auf die Zellen zu minimieren.

Bestimmen der Reinheit der Zellkultur

Die astroglialen Zellen wurden auf Deckgläschen angesät und nach Konfluentwerden der Kultur an Tag 12 mit Methanol fixiert. Anschließend wurde

eine immunzytochemische Färbung mit GFAP und DAPI laut Protokoll durchgeführt (siehe III.3. Immunfluoreszenzanfärbungen). Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop photographiert. Dann wurde die Zahl der mit DAPI blau gefärbten Zellkerne bestimmt und in Relation mit der Anzahl der GFAP-positiven Zellen gebracht. Es konnten etwa 93 bis 97 GFAP-positive Zellen auf 100 Kerne bestimmt werden, so dass eine Reinheit von ca. 95% Astrozyten in der Kultur vorliegt (Daten und Abbildungen nicht gezeigt).

III.3. Immunfluoreszenzanfärbungen

III.3.1. Vorbereitung der immunzytochemischen Färbungen

Um die Zusammensetzung der astroglialen Zellkultur sowie apoptotische Vorgänge in Abhängigkeit des Zellalters, der Kulturbedingungen und der exogenen EPO-Gabe zu untersuchen, wurden die Zellen mittels immunzytochemischer Techniken gefärbt und untersucht.

Material

- Methanol 98% zur Analyse, –20 °C kalt
- PBS raumtemperiert
- PBS mit 0,5% Triton X-100, raumtemperiert
- Färbeschalen 10 cm Ø aus Kunststoff (unsterile Kulturschalen)
- 1 Kanüle, Gr. 18
- Eppendorfgefäße 2 ml
- Glasröhrchen 5 ml
- Parafilm, in 1,5 x 1,5 cm große Stücke geschnitten, 2 Stück pro Deckglas
- Pipetten 1000 µl, 100 µl, 10 µl, verstellbar und passende Pipettenspitzen
- DAPI - Eindeckmedium
- Primärantikörper gegen zu untersuchendes Antigen
- Sekundärantikörper, unterschiedlich konjugiert
- Objektträger und Mikroskopierkästen

Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Um den Eintritt der Antikörper in das Zellinnere zu ermöglichen, wurden die Zellen mit Methanol permeabilisiert. Um ein Ausfließen des Zellinhalts zu verhindern, müssen die Zellen fixiert werden. Sowohl für die Fixierung wie für

die Permeabilisierung eignet sich Methanol, so dass ein Arbeitsschritt genügt. Von den Schalen, in denen die Zellen auf Deckgläsern kultiviert wurden, wurde das Kulturmedium abgenommen. Die Schalen wurden dann mit raumtemperiertem PBS zweimal gewaschen. Das PBS wurde verworfen und sofort durch -20°C kaltes Methanol (98% rein) ersetzt. Die Schalen wurden im Methanol 10 min lang bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde das Methanol abgenommen und die Schalen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen. Zur Aufbewahrung für max. 1 Woche wurden die Zellen mit PBS beschichtet bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Pipettierschema der Primärantikörper

Wird eine Doppelmarkierung angestrebt, so ist bei der Auswahl der Primärantikörper darauf zu achten, dass diese aus zwei verschiedenen Spezies stammen, da sonst die Spezifität der Sekundärantikörperbindung nicht gegeben ist. Zudem wurde jeweils die Kombination eines monoklonalen (mab) und eines polyklonalen (pab) Primärantikörpers verwendet, da dadurch bessere Ergebnisse zu erzielen waren. Pro zu färbendem Deckglas wurden $100\ \mu\text{l}$ PBS in dem beschrifteten Eppendorfgefäß vorgelegt. Jeder Antikörper wurde in steriler 0,9-prozentiger NaCl-Lösung gelöst und in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung eingesetzt:

EPO pab	1 : 50	PCNA mab	1 : 25
GFAP mab	1 : 10	SMAA mab	1 : 100
GFAP pab	1 : 500	Nestin mab	1 : 500

Ein Pipettierschema kann wie folgt aussehen:

(Rot markiert bedeutet Cy3, Grün markiert steht für FITC)

Primärantikörperkombinationen: Sekundärantikörperkombinationen:

- | | |
|---|--|
| 1. anti-GFAP mouse mab / anti-EPO rabbit pab | anti-mouse Cy3 / anti-rabbit-FITC |
| 2. anti-GFAP mouse mab / TUNEL | anti-mouse Cy3 |
| 3. anti-PCNA mouse mab / anti-GFAP rabbit pab | anti-mouse Cy3 / anti-rabbit FITC |
| 4. anti-PCNA mouse mab / TUNEL | anti-mouse Cy3 |
| 5. anti-Nestin mouse mab / anti-GFAP rabbit pab | anti-mouse Cy3 / anti-rabbit FITC |
| 6. anti-SMAA mouse mab / anti-EPO rabbit pab | anti-mouse Cy3 / anti-rabbit FITC |
| 5. Kontrollen: | a. Cy3 / FITC
b. Labeling Solution (TUNEL-Kit) |

Für ein Deckglas wurden 100 µl Primärantikörperlösung und 100 µl Sekundärantikörperlösung benötigt. Verwendet man für den Apoptosenachweis den TUNEL-Kit, so wird nur ein Sekundärantikörper verwendet. Der TUNEL-Kit wurde nach Vorschrift vorbereitet: 450 µl der Labeling-Solution des TUNEL-Kits wurden zu 50 µl Enzymlösung gegeben. Pro Deckglas wurden 50 µl der Endlösung und 100 µl der einfachen Antikörperlösung, beispielsweise TUNEL 50 µl und EPO (pab) 100µl, verwendet.

Pipettierschema für die Sekundärantikörper

Das Endvolumen des je Probe zugegebenen Sekundärantikörpers betrug 100 µl. Entsprechend der Verdünnungsvorschrift wurde der Sekundärantikörper zu der sterilen 0,9%igen NaCl-Lösung gegeben:

Goat anti-mouse Cy3 mab 1 : 500

Goat anti-mouse Cy3 pab 1 : 500

Goat anti-rabbit Cy3 mab 1 : 500

Goat anti-rabbit FITC 1 : 100

Das Glasröhrchen musste lichtgeschützt mit Aluminiumfolie umwickelt werden.

III.3.2. Immunzytochemische Färbetechniken

Nach der Fixierung wurden die Zellen mittels einer Doppelmarkierungsmethode gefärbt. Dazu wurden die einzelnen Deckgläser nach Entfernen des PBS aus den Zellkulturschalen mittels einer Kanüle gelöst und je ein Deckglas wurde auf eine Färbeschale verteilt. Als Färbeschalen wurden große Kulturschalen benutzt, die mit der Antikörper-Kombination beschriftet waren. Beim Ablösen der Deckgläschen aus den Kulturschalen blieb die Seite des Deckglases mit den festgewachsenen Zellen oben. Auf jedes Deckglas wurden 100 µl der Primärantikörperlösung gegeben, es wurde mit einem passend zugeschnittenen Stück Parafilm gegen Austrocknung bedeckt und 2 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kontroll-Deckgläschen wurden nur mit PBS ohne Antikörper beschichtet. Nach 2 h wurde, nach Entfernung des Parafilms, jedes Deckglas in seiner Färbeschale 20 min lang mit je 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit der Sekundärantikörperlösung und einem weiteren Stück Parafilm beschichtet. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Sekundärantikörpers (bedingt

durch die Fluorochrom-Markierung) erfolgte die anschließende einstündige Inkubation im Dunkeln. Der überschüssige Sekundärantikörper wurde dann durch zwei nacheinander folgende Waschvorgänge mit je 10 ml PBS entfernt. Die Zellen wurden zur Beseitigung unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper für nochmals 20 min mit einer Lösung aus PBS und Triton X-100 (1 ml Triton X auf 1000 ml PBS) gewaschen. Die Deckgläser wurden schließlich mit der Zellseite nach unten auf den beschrifteten Objektträgern mit vorgelegtem Eindeckmedium (mit DAPI zur gleichzeitigen Kernfärbung, siehe III.3.4.) eingebettet. Die abschließende Konservierung und Archivierung erfolgten bei -20°C lichtgeschützt im Mikroskopierkasten. Die Objektträger wurden am Fluoreszenzmikroskop von Olympus betrachtet und mittels Digitalkamera und der Aufnahmesoftware von Analysis[®] fotografiert.

III.3.3. Apoptose – Nachweis in Zellen mittels TUNEL-Reaktion

Apoptotische Vorgänge wurden mit dem *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL-Kit) von Roche sichtbar gemacht. Die Spaltung genomischer DNS während der Apoptose führt sowohl zu Doppelstrang-DNS-Fragmenten mit niederem Molekulargewicht (Mono- und Oligonukleotide) als auch zu Einzelstrang-Brüchen („nicks“) in DNS mit hohem Molekulargewicht. Diese Brüche im DNS-Strang können anhand ihrer freien 3'-OH-Termini mittels modifizierten Nukleotiden unter Mithilfe einer Enzymreaktion identifiziert werden. Die immunzytochemische Darstellung der Apoptose findet in zwei Schritten statt. Im ersten Schritt werden Brüche im DNS-Strang durch die Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) gekennzeichnet, welche die Addition von markierten Nukleotiden an freie 3'-OH-DNS-Enden in einer Schablonen-unabhängigen Weise katalysiert (TUNEL-Reaktion). Im zweiten Schritt können die durch Bindung von Fluorescein markierten Nukleotid-Polymere mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Die TUNEL-Reaktion markiert spezifisch DNS-Strangbrüche, die während der Apoptose entstehen, so dass eine Unterscheidung zwischen einem Zelltod, der durch Apoptosevorgänge bedingt ist, von einem solchen, der durch Nekrose, Bestrahlung oder Zytostatika verursacht wurde, getroffen werden kann (Gorczyca et al. 1993; Gold et al. 1994).

III.3.4. DAPI - Kernfärbung:

Die Kerne der Zellen wurden mittels DAPI im Eindeckmedium gefärbt. Darin war DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) in einer Konzentration von 1,5 µg/ml enthalten. DAPI wird bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und emittiert Licht einer Wellenlänge von 460 nm (blau), wenn es an DNS gebunden ist. Durch diese Färbung kann die Anzahl an Zellen pro Bild einfach bestimmt werden.

III.4. ELISA

Vorbereitung der Proben für den ELISA und die rt-RT-PCR

Die endogene EPO-Produktion sollte für diese Arbeit 21 Tage lang untersucht werden. Dazu wurden zu Beginn der Experimente auf 10 cm-Zellkulturschalen unter Sterilbedingungen Astrozyten der Primärkultur angesät. Bei der Primärkultur waren dazu ca. 6 Mio Zellen pro Schale (10 cm) notwendig, um an Tag 7 (1. Messzeitpunkt) eine ausreichende Zellzahl für die RT-PCR (etwa 2-3 Mio Zellen notwendig) zu erhalten. 24 h vor den Versuchen wurden für jeden der 4 Messzeitpunkte (Tag 7, Tag 9, Tag 14, Tag 21) drei Serien vorbereitet: je 5 Zellkulturschalen für Hypoxie und Normoxie. Die Zellkulturen unter normoxischem Bedingungen wurden im Normalinkubator bei 37°C, 10% CO₂ und 18% O₂, die Kulturen für die Versuche unter hypoxischen Bedingungen wurden in der Hypoxiekammer bei 37°C, 10% CO₂, 1% O₂ und 89% N₂ inkubiert. An den 4 Messzeitpunkten wurden die in 10 cm-Zellkulturschalen nach jeweiligen Standardbedingungen kultivierten Zellen geerntet, zuvor wurde das Zellkulturmedium abgenommen und in 15 ml-Falcon-Röhrchen bei -20°C eingefroren. Es wurde mit Handschuhen unter Sterilbedingungen gearbeitet, da bakterielle RNAsen die Ergebnisse der mRNA-Messungen verfälschen können. Die Schalen wurden nach der Ernte sofort einmal mit sterilem PBS gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden dann mit 1 ml steriles Trypsin/EDTA abgelöst. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurde nun 1 ml DMEM/10% FCS zugefügt, die Zellsuspension dann in beschriftete 2 ml-Eppendorfgefäße gefüllt, 25 µl der Zellsuspension werden jeweils zur späteren Zellzählung beiseite gestellt und die Zellen in den Eppendorfgefäßen in der auf 4°C vorgekühlten

Zentrifuge bei 5000 g 5 min lang abzentrifugiert. Der Überstand über den Zellen wurde abgesaugt und die verbleibenden Zellpellets wurden sofort bei -80°C eingefroren. Die 25 μl Zellsuspension je Ansatz wurden einmal ohne Anfärbung, einmal mit Trypanblau gefärbt (1:2 verdünnt) mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Das eingefrorene Medium wurde nach dem Auftauen für die EPO-ELISA-Messungen, die Zellpellets für die rt-RT-PCR-Analysen mittels LightCycler verwendet.

Messung der EPO-Konzentration im Zellkulturmedium mittels ELISA

Um zu sehen, wieviel EPO von astroglialen Zellen unter 24-stündigem hypoxischem Stress innerhalb von 7, 14 und 21 Tagen produziert wird, wurde die EPO-Konzentration im Kulturüberstand der Zellen mittels ELISA gemessen.

Konzentrieren des Zellkulturüberstandes für die EPO-ELISA-Messung

Das aus den Zellen in das Zellkulturmedium (Gesamtvolumen 10 ml/Schale) freigesetzte EPO wurde mittels EPO-ELISA analysiert. Durch eine Serie von Vorversuchen wurde die EPO-Konzentration bei 7 Tage alten Zellkulturen analysiert. Diese Vorversuche zeigten, dass unter normoxischen Bedingungen eine große Anzahl von Proben die EPO-Konzentrationen unterhalb des Messbereichs aufwies. Um in den Messbereich des ELISA-Kits (EPO-ELISA Medac[®]) zu kommen, musste der Überstand zuerst konzentriert werden. Dies geschah mittels Amicon[®]-Ultra-15 PL-10-Zentrifugenfiltern von MILLIPORE[®]. Mit diesen Filtern war es möglich, das Kulturmedium mit dem EPO so einzuengen, dass man im Messbereich des verwendeten EPO-ELISA-Kits lag. Die Amicon Ultra-15 PL-10-Filter für eine Molekulargewicht-Grenze von 10 000 wurden mit dem gesamten 10 ml Zellkulturüberstand von einer 10 cm Platte je Filter beschickt. Die Filter wurden verschlossen in die Zentrifuge gestellt und bei 3345 g 40 min lang zentrifugiert. Über der Membran blieb die EPO-enhaltende Fraktion mit etwa 200 μl übrig. Diese Fraktion wurde abpipettiert und bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Dieser Arbeitsschritt erbrachte eine Konzentrierung von EPO im Überstand um den Faktor 50. Der EPO-ELISA-Kit ist gegen den „3rd International Standard for EPO, rDNA derived“ kalibriert. Das Funktionsprinzip basiert auf 2 monoklonalen Antikörpern in Sandwichtechnik

(Sawyer et al. 1987). Hierbei sind die ELISA-Platten mit einem Anti-EPO-Antikörper beschichtet. Die Probe wird aufgetragen, dabei bindet das EPO aus dem Serum (in dieser Arbeit aus dem Zellkulturüberstand) an den Antikörper. Der zweite, mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelte Antikörper wird zugegeben und setzt sich an das am Erstantikörper fixierte EPO. AP katalysiert die Reaktion von p-Nitrophenylphosphat zu gelbem p-Nitrophenol, dessen Konzentration photometrisch bei 405 nm bestimmt wird.

Der EPO-ELISA-Kit von Medac[®] enthält:

1. Mikrotiterplatten: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen, beschichtet mit monoklonalem Anti-EPO-Antikörper.
2. Standards: 6 Fläschchen à 1 ml, rHuEPO in folgenden Verdünnungen:
 - Standard 1: 160 mU / ml rHuEPO
 - Standard 2: 80 mU / ml rHuEPO
 - Standard 3: 40 mU / ml rHuEPO
 - Standard 4: 10 mU / ml rHuEPO
 - Standard 5: 2,5 mU / ml rHuEPO
 - Standard 6: 1,5 mU / ml rHuEPO
3. Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,5 ml humanes Serum, lyophilisiert
4. Konjugat: 1 Röhrchen à 0,25 ml Anti-EPO-Antikörper, Maus-monoklonal, AP-konjugiert (41 x), sowie FCS und Natriumazid (>0,1%).
5. 30 ml Probenverdünnungspuffer
6. 13 ml Konjugatverdünnungspuffer, enthält Maus-IgG.
7. 10 ml Substrat, enthält p-Nitrophenylphosphat und Diethanolamin.

Ansetzen der Reagenzien

Alle Kitkomponenten wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Der 10-fach konzentrierte Waschpuffer wurde 1:10 mit 0,9-prozentiger NaCl-Lösung verdünnt. Für 8 Mikrotitervertiefungen wurden 20 ml Waschpuffer benötigt. Die Kontrolle, bestehend aus lyophilisiertem humanem Serum, wurde mit 0,5 ml Aqua ad injectabilia rekonstituiert. Das Konjugat, bestehend aus je 0,25 ml monoklonalem, AP-konjugiertem Anti-EPO-Antikörper, wurde 1:41 mit Konjugat-Verdünnungspuffer verdünnt (z.B. 75 µl Konjugat mit 3 ml Puffer). Für acht Mikrotitervertiefungen wurden 0,4 ml verdünntes Konjugat benötigt. Die

Reaktion wurde mit Natronlauge gestoppt. Dafür wurden pro Mikrotiterplatte etwa 5 ml 3 M NaOH-Lösung benötigt.

Durchführung des EPO-ELISA

Die Mikrotiterplatten wurden in der erforderlichen Zahl bereitgelegt, pro Platte können max. 64 Proben gemessen werden, die restlichen 16 Vertiefungen werden für die Leerproben und die Standards benötigt. Die Vertiefungen A1 und A2 dienen der Ermittlung der Leerproben. Je 50 µl Probenverdünnungspuffer wurden hier zugegeben. Je 50 µl der Standards und je 25 µl des Probenverdünnungspuffers wurden pro Vertiefung für Überstandbestimmungen und Kontrollen pipettiert. Anschließend wurden jeweils 25 µl Probe pro Vertiefung pipettiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm abgeklebt und bei 37°C 60 min lang inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Vertiefungen dreimal mit je 300 µl Waschpuffer für 1 min gewaschen. 50 µl Konjugat wurden in jede Vertiefung pipettiert und bei 37°C 60 min lang in verschlossenem Zustand inkubiert. Nach der Inkubation wurde jede Vertiefung viermal mit je 300 µl Waschpuffer für 1 min gewaschen. 50 µl Substrat wurden in jede Vertiefung pipettiert, erneut abgeklebt und 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl Natronlauge als Stopplösung wurde die Reaktion gestoppt. Als Ergebnis der Enzym-Substrat-Reaktion entsteht das gelbe p-Nitrophenol. Nach 30 min Substratinkubation erfasst man in der Regel den EPO-Konzentrationsbereich 2,5 bis 160 mU pro ml. Zur Feindifferenzierung im Bereich 1,25 bis 10 mU pro ml kann die Substratinkubation auf 60 min verlängert werden. Man erfasst dann einen Messbereich von 1,25 bis 80 mU/ml. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 405 nm. Die Extinktion (OD-Wert) der Leerproben wurde von den anderen Werten subtrahiert. Die Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des chargenspezifischen Sollbereichs liegen, dieser wird bei jeder Charge im Datenblatt mitgeteilt – der Kit ist für die medizinische Diagnostik validiert und zugelassen.

III.5. Real-time-RT-PCR

III.5.1. RNA – Extraktion mittels RNeasy-Kit[®]

Die Extraktion der RNA wurde mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits[®] von Qiagen durchgeführt. Dieser ist speziell auf RNA-Extraktionen von tierischen Zellen ausgelegt und ermöglicht die Isolation von bis zu 100 µg RNA mit mehr als 200 Basen mittels einer speziellen Silikatgel-Membran. Die Proben wurden dazu zuerst lysiert und homogenisiert, dabei dient Guanidin-Isothiocyanat-haltiger Puffer als Inaktivator von RNAsen in der Probe, so dass die Isolation von intakter RNA möglich war. Das zugegebene Ethanol diente der Sicherung optimaler Bindungsbedingungen an der Silikatgel-Membran. Durch mehrere Waschschrte wurde sichergestellt, dass lediglich RNA an die Membran bindet und später auch nur diese von der Membran eluiert wurde. Im Einzelnen enthält der RNeasy-Mini[®]-Kit:

45 ml RLT-Lyse-Puffer (enthält Guanidin-Isothiocyanat)

45 ml RW-Puffer (enthält Ethanol)

11 ml RPE-Puffer (enthält Guanidin-Salz hochkonzentriert)

10 ml RNase-freies Wasser

50 x 1,5 ml Sammelbehälter

50 x 2,0 ml Sammerbehälter

50 x Zentrifugiersäulen mit Silikatgelmembran

Zur Fertigstellung des RLT-Lyse-Puffers müssen zu je 1 ml des RLT-Puffers 10 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) zugeben werden. Zur RNA-Extraktion wurde folgendes Protokoll angewandt: Die bei –80 °C aufbewahrten Zellpellets wurden auf Eis mit je 350 µl RLT-Lyse-Puffer versetzt und gut trituriert. Dann wurde jede Probe mittels einer feinen Kanüle (0,9 mm) und einer RNase-freien Spritze sorgfältig homogenisiert. Nun wurden 350 µl 70% Ethanol je Probe zugegeben und gut vermischt. Jede Probe wurde dann auf eine der im Kit enthaltenen RNeasy-Mini-Säulen gegeben. Es passen 700 µl Probematerial auf die Säule (350 µl RLT-Lyse-Puffer/Zellgemisch und 350 µl Ethanol). Diese Säulen wurden dann auf die dazu passenden, im Kit enthaltenen Röhrchen aufgesetzt und 15 s lang bei 8000 g (10 000 rpm) in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde verworfen. Auf jede Säule wurden nun 700 µl

RW-Puffer gegeben und die RNeasy-Mini-Säule wurde sorgfältig verschlossen. Die Säulen wurden wieder bei 8000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Dieser Schritt dient zum Waschen der RNA. Als zweiter Waschschrift wurde die Säule nun auf ein neues 2 ml Sammelgefäß aufgesetzt und 500 µl fertiger RPE-Puffer wurden auf die Säule gegeben. (Der RPE-Puffer liegt als Konzentrat vor. Vor Erstgebrauch muss er 1:4 mit Ethanol (96 – 100%) verdünnt werden.) Nach Verschließen der Säulen wurden diese 15 s lang bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand wurde erneut verworfen. Nach dem zweiten Waschen wurde erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert, und wiederum bei 8000 g, jedoch 2 min lang zentrifugiert. Dies dient dem Trocknen der Silikat-Membran der RNeasy-Säulen. Danach muss darauf geachtet werden, dass sofort mit dem nächsten Schritt fortgefahren wird. Zum Eluieren der RNA wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml-Sammelgefäß aufgesetzt. Dann wurde nacheinander zweimal 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Säulenmembran gegeben. Die Säulen wurden verschlossen und für 1 min bei 8000 g zentrifugiert, dadurch wurde RNA eluiert. Die RNA befindet sich jetzt nicht länger auf der Membran, sondern am Boden des 1,5 ml-Sammelgefäßes.

III.5.2. Bestimmung der RNA-Menge je Probe

Zu 4 µl RNA wurde 76 µl RNase-freies Wasser gegeben (1:20 verdünnt). Dann wurde am Spektrophotometer die Konzentration der RNA gemessen. Dazu wurde im Programm „Nukleotid“ das Unterverzeichnis „RNA“ gewählt, der Verdünnungsfaktor im vorgegebenen Feld eingetragen und als erstes der Leerwert (Wasser) gemessen. Alle Proben wurden nacheinander gemessen und eine Liste der einzelnen Konzentrationen in µg/ml gedruckt.

III.5.3. Umschreiben der RNA in cDNA

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde jeweils 500 ng RNA benötigt. Aus der gemessenen RNA-Konzentration wurde mittels Dreisatz eine RNA-Konzentration von 250 ng/µl eingestellt. Für das Umschreiben wurde je Probe benötigt:

0,5 µl AMV-Reverse Transkriptase (AMV-RT)

0,5 µl Oligo dT₁₅ Primer

- 0,5 µl Random Primer
- 2 µl MgCl₂ Stammlösung 25mM
- 2 µl 10-fach PCR-Puffer (AMV-RT-Puffer)
- 2 µl dNTPs
- 1 µl H₂O RNasefrei

Die benötigte Menge der oben angegebenen Reagenzien wurde berechnet. Zu je 8,5 µl dieses Mastermixes wurden 2 µl (500 ng) der Proben-RNA und 9,5 µl H₂O RNasefrei gegeben, das Endvolumen je Probe/Eppendorfgefäß[®] betrug 20 µl. Die Proben wurden 1 h bei 42°C im Wasserbad inkubiert, anschließend wurden sie 5 min lang auf 95°C im Heizblock erhitzt. Nach den 5 min im Heizblock wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und das Kondensat wurde abzentrifugiert. Wurden die Proben nicht sofort im LightCycler vermessen, wurden sie bei –80°C eingefroren.

III.5.4. Messen der cDNA mittels real-time-RT-PCR

Pro Lauf können im LightCycler[®] 14 Proben gemessen werden. Die cDNA-Proben wurden auf Eis stehend vorbereitet. Zur Durchführung wurden die Reagenzien des LightCycler[®] FastStart-DNA-Master-SYBR-GREEN Kits[®] von ROCHE verwendet. Dieser enthält:

- 1a LightCycler FastStart Enzym[®] (Taq Polymerase)
- 1b ReactionMIX[®] SYBR Green I, 10fach konzentriert
- 2 MgCl₂ 5 mM Stammlösung
- 3 H₂O PCR Grade

Standard Stabilisator grün, Standard rot. Hinzu kommen Primer Sense und anti-Sense für EPO, Primer Sense und anti-Sense für Cyclophilin. Es wurden folgende Primer verwandt:

EPO Sense: 5'-GGC TGT TGC CAG TGG TAT TT-3'

EPO anti-Sense: 5'-CAC GAA GCC ATG AAG ACA GA-3'

Cyclophilin Sense: 5'-GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA-3'

Cyclophilin anti-Sense: 5'-ACA TGC TTG CCA TCC AGC C-3'

Alle Primer stammten von THERMO ELECTRON, Ulm. Die Angabe der Basenabfolge der Primer stammte ebenfalls von THERMO ELECTRON. Die Reagenzien aus Gefäß 1b wurden zu Gefäß 1a dazugegeben und sofort auf Eis

gestellt (ergibt nun Tube 1). Die Menge in Tube 1 war für insgesamt 32 Proben ausreichend, davon 14 cDNA(EPO)-Proben, 14 Cyclophilin(House-keeping-Gen)-Proben, 3 Standards und etwas Überhang.

III.5.5. Herstellung des MasterMix und der Verdünnungsreihe

Die MgCl₂ -Stammlösung aus Gefäß 2 wurde gut gemischt. In ein leeres Gefäß (Tube E) wurden Primer Sense und anti-Sense für EPO (je 6 µl pro Probe) geben, hinzu kamen 12,6 µl H₂O, 2,4 µl MgCl₂ und 2 µl des Reaktionsgemischs aus 1a und 1b. Es ergaben sich 29 µl Reaktionsgemisch je Probe. In einem zweiten Gefäß wurde das Gleiche mit Cyclophilin Sense und anti-Sense bereitgestellt (Tube C). 22,8 µl H₂O PCR Grade, 6,5 µl Primer gelb (im Kit enthalten) und 6,5 µl SYBR Green wurden durch Triturieren gut gemischt. 9 µl Standard Stabilisator grün wurden für jeden der 3 Standards in je ein Tube gegeben und 11 µl des Standard rot hinzugegeben. Das Tube des ersten Standards wurde auf Eis gestellt. 1 µl des Reaktionsgemisches aus 1a und 1b wurden in das Tube des zweiten Standards gegeben und auf Eis gestellt. 2 µl des Reaktionsgemisches aus 1a und 1b wurden dann in das Tube des dritten Standards gegeben und ebenfalls auf Eis gestellt.

III.5.6. Vorbereitung der LightCycler®-Kapillaren

31 Kapillaren wurden in den gekühlten Metall-Adapter (4 °C) des LightCyclers vorsichtig eingesetzt. Jeweils 18 µl aus Tube E (EPO) wurden in die Kapillaren 1 – 14, je 18 µl aus Tube C in die Kapillaren 15 – 28 gegeben. Aus den auf Eis stehenden EPO-cDNA-Proben wurden nach dem Vortexen je 2 µl in je eine der Kapillaren 1 – 28 geben. Für die Standards wurden je 11 µl des Standard-MasterMixes in die Kapillaren 29 – 31 gegeben. Danach wurden 9 µl Standard-Lösung aus Tube 1 – 3 zugegeben.

III.5.7. Start des LightCyclers®

Der Deckel des Metall-Adapters wurde auf diesen aufgesetzt und bei 3000 U 1 min lang zentrifugiert. Nun wurden die Kapillaren in das LightCycler®-Karussell eingesetzt – dabei blieb ein Loch frei. Das Karussell wurde in den LightCycler® eingesetzt und der Deckel geschossen. Am Computer wurde die Anzahl der Proben eingeben. Mit „Done“ wurde der LightCycler gestartet.

III.5.8. Auswertung nach Beendigung des LightCycler®-Laufs

Gemessen wird im Light-Cycler die Kopienzahl der EPO-mRNA. Über Menü „RUN“ und „Quantification“ wurde die Standardkurve ausgedruckt. Über „Select a program“ und „Melting curve“ wurde die erscheinende Schmelzkurve ebenfalls gedruckt. Es wurden die Daten der Proben und die Streuung der Schmelzkurve erfasst. Die Auswertung der LightCycler®-Ergebnisse erfolgte mit Microsoft®-Excel®. Jedem EPO-Messwert wurde der zugehörige Cyclophilin-Wert zugeordnet (Kapillare 1 EPO 1 zu Kapillare 15 Cyclophilin 1). Der Wert entspricht der Kopienzahl (mRNA) des EPO-Gens bezogen auf das Housekeeping-Gen Cyclophilin.

III.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Untersuchungsmethode, die es erlaubt, verschiedene Eigenschaften einer Zelle gleichzeitig zu messen. Es können die Zellgröße, die Zellgranularität und die Intensität mehrerer Fluorochrome simultan gemessen werden. Die Messungen werden an Zellen durchgeführt, die in einem Flüssigkeitsstrom fokussiert werden und senkrecht einen Laserstrahl passieren. Durch das Licht des Lasers werden die Fluorochrome angeregt, mit deren Hilfe die zu untersuchenden Zellbestandteile zuvor markiert wurden. Der Laser regt die Fluoreszenzfarbstoffe an und registriert gleichzeitig die durch die Anregung entstandenen Streulichtsignale. Auf diese Weise können Zellen einzeln gezählt und zelluläre Parameter über Streulicht- und Fluoreszenzsignale analysiert werden. Die Bindung der Fluorochrome (z.B. FITC) an Antikörper, die gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet sind, ermöglicht sowohl die Untersuchung von Strukturen auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma. Die Fluorochrom-Menge ist proportional der Anzahl der Bindungsstellen der Antikörper an den Antigenen. Die von den Fluorochromen emittierte Intensität nach der Anregung durch den Laser stellt somit ein Maß für die Anzahl an Bindungsstellen des gewählten Antikörpers dar. Fluorochrome zeichnen sich dadurch aus, dass sie Licht einer charakteristischen Wellenlänge (Anregungs- oder Exzitationsspektrum) absorbieren und, durch Wärmeverlust bedingt, energieärmeres, langwelligeres Licht emittieren (Emissionsspektrum).

III. Methoden – Durchflusszytometrie

Bei Verwendung eines Argonlasers mit der Emissionswellenlänge von 488 nm können solche an Antikörper gekoppelten Fluorochrome verwendet werden, deren Anregungsbereich bei dieser Wellenlänge liegt. Dies trifft u.a. für Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Emissionswellenlänge 525 nm) und Phycoerythrin (PE, Emissionswellenlänge 575 nm) zu. Neben den Fluoreszenzsignalen wird in der Durchflusszytometrie auch das Streulicht des Lasers registriert. Sowohl die Größe als auch Form, Oberfläche und Granularität der Zellen beeinflussen das gestreute Licht, so dass sich vom Charakter der Streuung Rückschlüsse auf Zelleigenschaften machen lassen. Die Lichtstreuung ist zudem vom Winkel des auftreffenden Laserlichts abhängig. Die Lichtstreuung wird entlang der Achse des einfallenden Lichts als Vorwärtsstreulicht (Forward Angle Light Scatter), im 90°-Winkel zum einfallenden Licht als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) bezeichnet. Das Vorwärtsstreulicht hat die stärkste Intensität und kann ohne Verstärkung registriert werden. Das Vorwärtsstreulicht informiert über die Querschnittsfläche der gemessenen Zelle, darüber lässt sich die Zellgröße errechnen (in Diagrammen entspricht dies später häufig der Ordinate). Das Seitwärtsstreulicht (in Diagrammen meist auf der Abszisse dargestellt) gibt Informationen über das Reflexionsverhalten, das sich proportional zur Zellgranularität verhält. Für Messungen mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen wie gewohnt mit Trypsin/EDTA aus den Kulturschalen abgelöst und die Trypsin/EDTA-Lösung wurde nach Ablösen der Zellen mit Kulturmedium blockiert. Die Zellen wurden dann zu je 1×10^6 in 5 ml Glasröhrchen pelletiert, mit 250 µl Fix/Perm-Lösung (Permeabilization Kit[®], CALTAG) beschichtet und resuspendiert. Diese Suspension wurde 20 min lang bei 4°C inkubiert und im Anschluss mit ca. 4 ml der Wash/Perm-Lösung des Kits gewaschen. Darauf wurde der erste Antikörper (50 µl Antikörper in Wash/Perm-Lösung verdünnt) zu den Zellen zugegeben und 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendeten Antikörper waren die gleichen, die auch für die immunzytochemischen Färbungen gebraucht wurden. Um den Überschuss des Antikörpers zu entfernen, wurde im Anschluss an die Inkubation zweimal mit Wash/Perm-Lösung gewaschen. Das Pellet wurde mit dem Sekundärantikörper

(in gleicher Verdünnung wie der Erstantikörper) beschichtet und 45 min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Der Überschuss des Sekundärantikörpers wurde durch zweimaliges Waschen mit WashPerm-Lösung entfernt, das Pellet in 400 µl PBS/1% FCS resuspendiert und im Durchflusszytometer untersucht. Das Gerät zählt die Zellen und sortiert diese nach Größe und Granulationsgrad. Die Zellzahlen können am Gerät auf einen festen Wert eingestellt werden, das Gerät zählt dann diese Zellenzahl ab und bezieht die Ergebnisse darauf (siehe Teil IV. Ergebnisse). Die in dieser Arbeit verwendete Methode der PCNA-Detektion mittels Durchflusszytometrie wurde von Erlanson et al. 1997 an hämatopoetischen Zellen beschrieben.

III.7. ATP-Biolumineszenz (Cell Viability Assay)

Das Überleben astroglialer Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen wurde mit dem CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay von Promega untersucht. Als Marker für die Zellproliferation und das Überleben der Zellen wurde Adenosintriphosphat (ATP), das nur von lebendigen Zellen produziert werden kann, verwendet. Die ATP-Produktion wurde dabei mittels der Luciferin-Luciferase-Reaktion quantifiziert, wie von Crouch et al. 1993 beschrieben. Die Methode basiert auf der Quantifizierung der Zellzahl durch die Menge des produzierten ATP. Wie durch den Hersteller empfohlen, wurde eine Standardkurve erstellt, indem lebende, durch Trypanblau nicht anfärbbare Zellen und die Menge an ATP in 6 Verdünnungen (Originallösung und 5 entsprechende Verdünnungen) mit unterschiedlicher Zelldichte gemessen und gegeneinander aufgetragen wurden. Die Standardkurve, die sich aus den Messpunkten der 6 Verdünnungen ergab, war linear und zeigte eine hohe Korrelation zwischen der Menge an produziertem ATP und der entsprechenden Zelldichte. Die Experimente wurden auf 96-well-Platten (10 000 Zellen je well) durchgeführt. 5 Tage nach dem Ansäen der Zellen wurde das Zellkulturmedium erneuert und die Platten wurden 48 h lang im Zellinkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurde den wells die gleiche Menge Celltiter-Glo-Reagens wie Kulturmedium zugegeben und die Platte wurde auf dem Schüttler bewegt, um die Lyse der Zellen zu induzieren. Die Proben wurden 10 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Lumineszenz erfolgte anschließend im Lumineszenzdetektor (Wallac[®] Victor 1420 MultiLabel Counter von Perkin Elmer, Finnland). Die Hintergrund-Lumineszenz wurde detektiert, indem lediglich die Kontrollwells ohne Zellen gemessen wurden. Bei der Auswertung wurden die Messdaten der Versuche unter Normoxie und Hypoxie mit den entsprechenden Kontrollgruppen verglichen.

III.8. LDH-Messung mittels CytoTox 96[®]-Assay

Mit Hilfe der ATP-Biolumineszenz kann die Anzahl an lebenden Zellen (wie unter III.7. beschrieben) bestimmt werden. Er erlaubt jedoch keine Unterscheidung zwischen überlebenden Zellen und Zellen, die durch Proliferation neu entstanden sind. Um zwischen Zellen, die lediglich nicht proliferieren, und überlebenden Zellen, die nicht zugrunde gegangen sind, zu unterscheiden, eignet sich die Messung von LDH. LDH wird aus zerstörten Zellen freigesetzt und kann dann im Kulturmedium nachgewiesen werden. In den Kulturen, in denen die Zellen lediglich in ihrer Proliferation stagnieren, findet sich hingegen keine LDH-Aktivität im Kulturmedium. Dazu wurden Zellen in 96-well-Platten kultiviert und mit dem CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay von Promega untersucht. Wie auch bei den Untersuchungen für den „Cell Viability Assay“ wurde das Zellkulturmedium 5 Tage nach dem Ansäen der Zellen erneuert und die Zellen wurden 48 h lang mit beziehungsweise ohne 5 U/ml EPO unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert. Vom Kulturüberstand wurden dann 50 µl entnommen und mit 50 µl des Substrat-Mixes und 50 µl Assay-Puffers auf die Enzym-Assay-Platte übertragen und bei Raumtemperatur 30 min lang inkubiert. In den Kontrollproben wurde LDH lediglich in frischem DMEM mit 10% FCS gemessen. Die enzymatische Umwandlung des Tetrazolium-Salzes in ein rotes Formazan-Produkt, auf dem die Messmethode beruht, wurde durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet. Die Absorption des roten Reaktionsproduktes wurde bei 490 nm im Vergleich zu den Kontrollen im ELISA-Reader bestimmt.

III.9. Caspase-3/7-Assay

Caspasen spielen eine wichtige Rolle bei apoptotischen Vorgängen in der Zelle (siehe Einleitung). Insbesondere die Caspasen 3 und 7 haben eine zentrale Rolle bei Reaktionen der Zellen auf Hypoxie-induzierte Apoptose inne, wie in der Abbildung 5 der Einleitung dargestellt. Daher wurden die astroglialen Zellen auch auf ihre Caspase-3/7-Aktivität hin untersucht. Dies erfolgte mit dem Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay vom Promega. Wie für die anderen Assays wurden dazu astrogliale Zellen in 96-well-Platten kultiviert. Auch hier wurden die Zellen 5 Tage nach dem Ansäen und nach einem Wechsel des Kulturmediums mit 5 U/ml EPO 48 h lang inkubiert. Dann wurde das Caspase-3/7-Reagens des Kits zugegeben und die Mikrotiterplatten wurden 30 s lang auf den Schüttler gestellt. Die Zellen wurden 24 h lang mit dem Reagens bei Raumtemperatur inkubiert und die Fluoreszenz (Apo-ONE[®] Assay) wurde bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 535 nm im ELISA-Reader (Tecan) gemessen.

III.10. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung und die Diagramme dieser Arbeit wurde mit der Software von GraphPad Prism, Version 4.03 (2005) gearbeitet. Dazu wurden die Rohdaten mit One-Way-Anova und dem Dunnett-Comparison Test oder einem unpaaren T-Test analysiert. Es wurde dazu bei allen Versuchen mit $n \geq 5$ gearbeitet und $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) als statistisch signifikant betrachtet. Beim T-Test wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% gearbeitet. Die Messwerte wurden dabei auf den Mittelwert der zu jedem Experiment gehörenden Kontrolle (meist Normoxie ohne EPO) bezogen und in Relation zur Kontrolle (diese wurde gleich 100% gesetzt) dargestellt.

IV. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde bei astroglialen Primärkulturen der Zusammenhang zwischen astrogliaeigener EPO-Produktion und dem Differenzierungszustand, der Proliferation und der Überlebensrate von Astroglia unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen untersucht. Darüber hinaus wurde die protektive Wirkung des exogen zugegebenen Erythropoietins auf Astroglia in Bezug auf Überlebensrate, Apoptose und Proliferation charakterisiert. Ein Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit liegt auf den Zeitreihenexperimenten, bei denen die astroglialen Kulturen an den Tagen 7, 9, 12, 15, 18 und 21 untersucht wurden. Die Untersuchungen an astroglialen Primärkulturen über eine Zeitdauer von 21 Tagen unter Berücksichtigung des Differenzierungszustandes und der eigenen EPO-Produktion sowie der Reaktion auf exogene EPO-Gabe wurden für diese Arbeit erstmalig durchgeführt. Die einzelnen Experimente und Untersuchungen lassen sich dabei folgenden Hauptpunkten zuordnen:

IV.1. EPO-Expression und EPO-Sekretion von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie

- IV.1.1. EPO-Produktion in Astrozyten unter Normoxie in Abhängigkeit vom Zellalter: Untersuchungen mittels PCR und Durchflusszytometrie
- IV.1.2. EPO-Genexpression in Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie in Abhängigkeit vom Zellalter: Untersuchungen mittels PCR
- IV.1.3. EPO-Sekretion von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie in Abhängigkeit vom Zellalter: Untersuchungen mittels EPO-ELISA

IV.2. Einfluss von exogenem EPO auf Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie

- IV.2.1. Zellzahlen und LDH-Aktivitäten unter Normoxie und Hypoxie bei unterschiedlichen EPO-Dosierungen
- IV.2.2. Zellzahlen und LDH-Aktivitäten unter Normoxie und Hypoxie bei Astrozyten verschiedenen Alters
- IV.2.3. Einfluss von exogenem EPO auf Proliferation und Apoptose bei Zellen unterschiedlichen Alters unter Normoxie und Hypoxie
- IV.2.4. Einfluss von exogenem EPO auf die Proliferation von Astrozyten: Durchflusszytometrische Messungen
- IV.2.5. Einfluss von EPO auf das Apoptoseverhalten von Astrozyten: Untersuchungen zu Zellzahlen, LDH- und Caspasen-3/7-Aktivität

IV.3. Korrelation zwischen der EPO-Expression und dem Differenzierungszustand von Astrozyten sowie deren Ansprechen auf exogene EPO-Gabe

- IV.3.1. Korrelation zwischen dem Differenzierungszustand und der astrozytären EPO-Expression
- IV.3.2. Auswirkungen von exogenem EPO auf den Differenzierungszustand von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie

IV.1. EPO-Expression und EPO-Sekretion von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie

IV.1.1. EPO-Produktion in Astrozyten unter Normoxie in Abhängigkeit vom Zellalter: Untersuchungen mittels PCR und Durchflusszytometrie

Es wurde zunächst untersucht, ob die endogene EPO-Genexpression in astroglialen Zellkulturen vom Alter der Zellen abhängt. Dazu wurden astrogliale Zellen der Primärkultur 21 Tage lang kultiviert und mittels real-time-RT-PCR auf ihre EPO-Genexpression hin untersucht. Angesät wurden für jeden Messtag 5 Schalen pro Kulturbedingung. An den Kulturtagen 7, 9, 12, 15, 18 und 21 wurden die Zellen geerntet und es wurde eine rt-RT-PCR zur Messung der EPO-mRNA-Expression durchgeführt (siehe Teil III. Methoden). Die Ergebnisse der EPO-Expression in astroglialen Primärkulturen unterschiedlichen Alters zeigt Diagramm 1. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ist für jede Säule eingezeichnet, die Signifikanzen beziehen sich auf Tag 7.

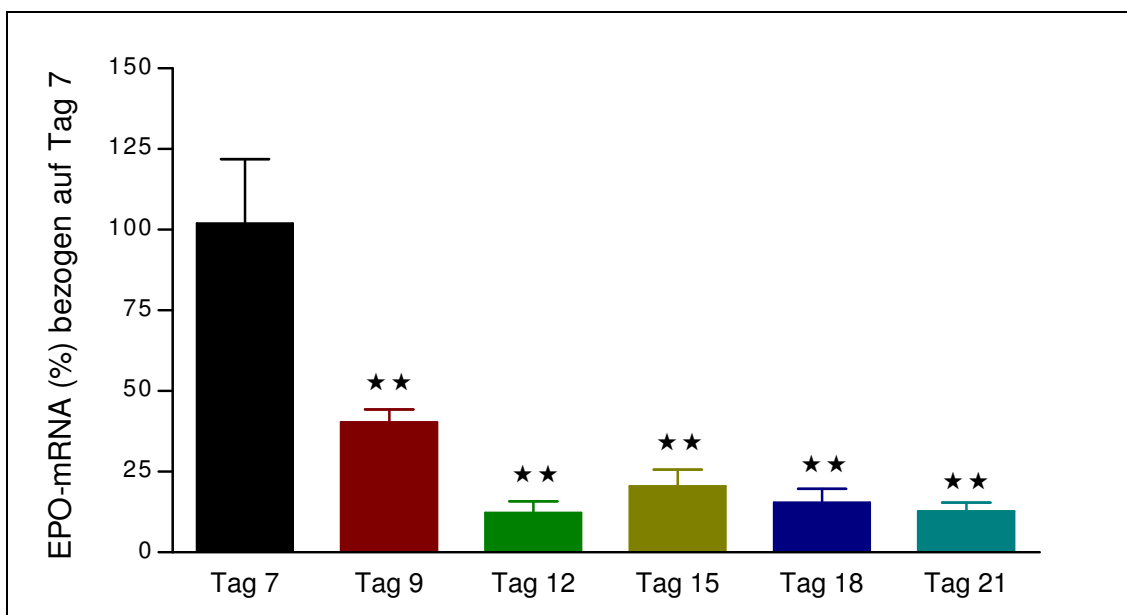


Diagramm 1 EPO-Genexpression in astrogliareichen Primärkulturen an den Kulturtagen 7, 9, 12, 15, 18 und 21 unter Normoxie

Die Ergebnisse der mRNA-Messungen sind in Prozent bezogen auf den Kulturtag 7 angegeben. Es wurde versucht, EPO-mRNA aus Zellen der Kulturtag 3 und 5 zu isolieren, die Mengen reichten aufgrund der geringen Zellzahl der Primärkultur jedoch nicht aus. Es zeigt sich in Diagramm 1 eine Abnahme der EPO-mRNA-Expression bei Tag 9 um etwa 60% und an den

IV. Ergebnisse

Kulturtagen 12, 15, 18 und 21 zwischen 81% und 89% gegenüber dem Tag 7. Dies bedeutet, dass mit steigendem Alter der Zellen in der Kultur die EPO-mRNA-Expression stark zurückgeht. Diagramm 1 gibt wieder, dass astrogliale Zellen höheren Alters weniger EPO exprimieren. EPO wird offenbar von jungen astroglialen Zellen sehr viel stärker exprimiert als von alten astroglialen Zellen. Die endogene EPO-Produktion in Astrozyten wurde auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Mit dieser Methode ist es möglich, Zellen abhängig von ihrer Größe und ihrem Granulationsgrad in verschiedene Populationen einzuteilen und die Fluoreszenzmesswerte auf diese Populationen zu beziehen. Dies wurde für Astrozyten aus der Primärkultur für die Kulturtage 7 und 21 durchgeführt. Die Abbildungen 1.1 bis 1.4 geben die Ergebnisse des Experiments für Zellen des Kulturtags 7 wieder. In Abbildung 1.1 sind die Zellen nach Größe (Ordinate) und nach Granulationsgrad (Abszisse) aufgetragen. Die Zuordnung der Zellen zu verschiedenen Populationen erfolgte mit der Definition von Gate 1 und Gate 2. Gate 1 (entsprechend Population 1) repräsentierte die kleinen, wenig granulierten Zellen, die an Tag 7 stark vertreten sind. Daher wurde angenommen, dass es sich hier um die jungen, wenig differenzierten Zellen handelt. Gate 2 (Population 2) enthielt die großen, stärker granulierten Zellen. Dies entsprach den älteren, mehr differenzierten Zellen. Die Messergebnisse für die EPO-Positivität sind sowohl für die Gesamtpopulation (Abb. 1.2) als auch für die beiden Subpopulationen (Abb. 1.3 und 1.4) dargestellt. Die schwarze Kurve in den Abb. 1.2 bis 1.4 zeigt die unspezifische Kontrolle mit FITC. Die grünen Abschnitte unter der Kurve zeigen die spezifischen Proben mit dem EPO-Antikörper. Da Mikrogliazellen kein EPO produzieren (Bernaudin et al. 2000; siehe Einleitung I.5.5.), werden bei der Messung lediglich astrogliale Zellen erfasst. Quantifiziert wird der Bereich innerhalb des grünen Areals ab der Markierung M2. Das gesamte Areal unter M1 bezeichnet die unspezifischen Anteile und wird daher subtrahiert. In Abbildung 1.2 ist dies nochmals exemplarisch beschriftet.

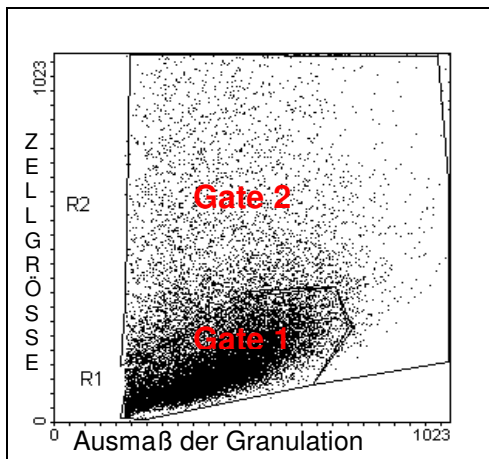


Abb. 1.1 Tag 7 Gate 1 und 2

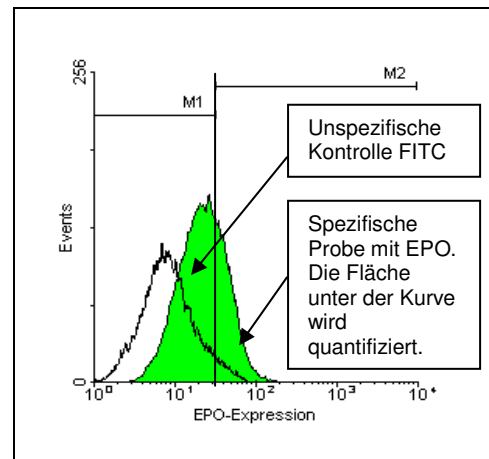


Abb. 1.2 Tag 7 Gesamtpopulation

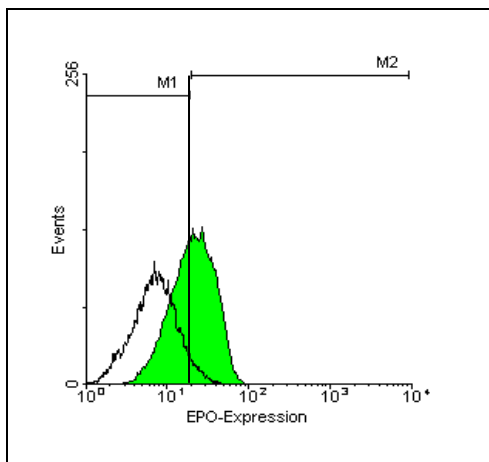


Abb. 1.3 Tag 7 Population/Gate 1

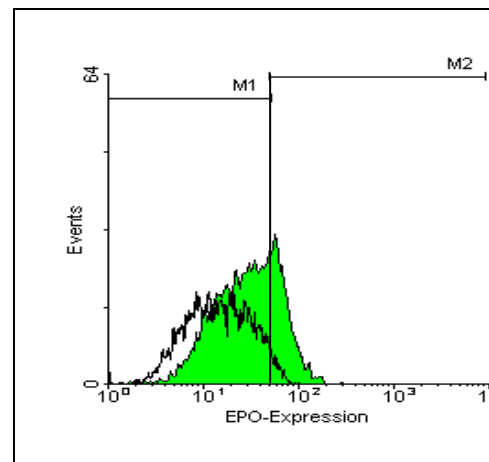


Abb. 1.4 Population/Gate 2

Abb. 1 EPO-Intensitätsverteilung in der Gesamtpopulation (Gate 1 und 2) und in den Populationen 1 und 2 bei astroglialen Kulturen des Kulturtages 7

Vergleicht man die Flächen unter der Kurve zwischen Abb. 1.3 und Abb. 1.4, die spezifisch für EPO sind, so zeigt sich, dass in Abb. 1.3 diese Fläche größer ist als in Abb. 1.4. Dies bedeutet, dass die in Abb. 1.3 gezeigte Population an kleinen und wenig granulierten Zellen (entsprechen der jungen Population) des Kulturtages 7 mehr EPO produziert als die in Abb. 1.4 dargestellte Population größerer und stärker granulierter Zellen (entsprechen der älteren, mehr differenzierten Population) des Kulturtages 7. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der EPO-Genexpression wie in Teil IV.1.1. gezeigt: Auch dort produzierten die jungen Astrozyten mehr EPO-mRNA als die älteren Zellen. In den folgenden Abbildungen 2.1 bis 2.4 sind die Ergebnisse der EPO-

Expression in der Durchflusszytometrie für Astrozyten des Kulturtags 21 gezeigt.

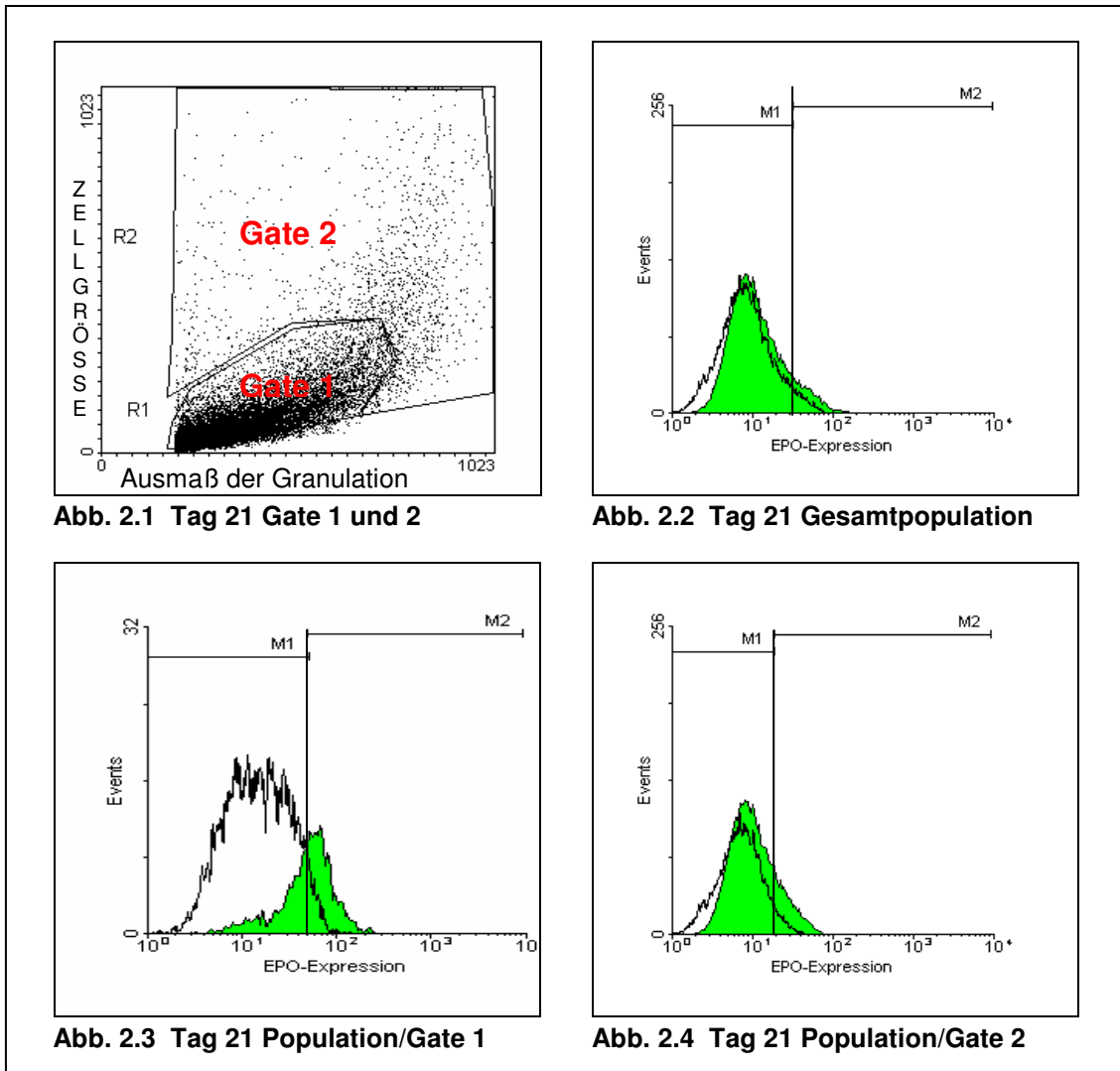


Abb. 2 EPO-Intensitätsverteilung in der Gesamtpopulation (Gate 1 und 2) und in den Populationen 1 und 2 bei astroglialen Kulturen des Kulturtages 21

Auch hier entspricht die Ordinate der Zellgröße, die Abszisse dem Granulationsgrad. Gate 1 (= Population 1) enthält auch hier die kleinen, wenig granulierten Zellen, Gate 2 (= Population 2) die großen, stark granulierten Zellen. Aus Abb. 2.1 ist ersichtlich, dass sich die Punktwolke verglichen zur Abb. 1.1 weiter nach rechts verlagert hat – dies ist ein Zeichen der weiteren Ausdifferenzierung der Zellen des Kulturtages 21, die den Punkten entsprechenden Zellen sind hier offenbar kleiner, dafür jedoch stärker granuliert. Das Durchflusszytometer war auf 50 000 Zellen normiert, sowohl an Kulturtag 7

IV. Ergebnisse

als auch an Kulturtag 21 wurde daher dieselbe Anzahl Zellen untersucht, so dass die Rechtsverschiebung der Zellen aus Abb. 2.1 gegenüber Abb. 1.1 nicht auf unterschiedlichen Zellzahlen beruht. Es zeigen sich in den Abbildungen 2.3 und 2.4 vergleichbare Ergebnisse zu jenen aus den Abbildungen 1.3 und 1.4: Die kleineren, weniger granulierten Zellen des Kulturtages 21 tragen gegenüber den größeren, stärker granulierten Zellen des Kulturtages 21 den Hauptteil an der EPO-Expression. Es handelt sich bei den Zellen eindeutig um Astrozyten, da nur GFAP-positive Zellen vom Zytometer erfasst wurden (Doppelmarkierung mit GFAP und EPO). Der Anteil an EPO-positiven Zellen kann für jede Zellpopulation in Prozent angegeben werden. Für die Kulturtage 7 und 21 wurde der Anteil an EPO-positiven Zellen sowohl für die Gesamtpopulation als auch für die Populationen 1 und 2 mittels Durchflusszytometrie bestimmt und in Tabelle 1 eingetragen.

Kulturalter	Gesamtpopulation	Population 1 (kleine, wenig granulierte Zellen)	Population 2 (große, stärker granulierte Zellen)
Tag 7	14,3%	41,8%	14,3%
Tag 21	4,0%	11,8%	7,7%

Tab. 1 Anteil der EPO-positiven Zellen in Prozent in den verschiedenen Populationen an den Kulturtagen 7 und 21

Aus Tabelle 1 wird Folgendes deutlich: Der Anteil an EPO-positiven Zellen an der Gesamtpopulation nimmt von 14% an Tag 7 auf 4% an Tag 21 ab. An beiden Kulturtagen findet sich der größere Anteil der EPO-positiven Zellen in Population 1, nämlich bei den kleinen, wenig granulierten Zellen. Die Gesamtzellpopulation von 7-tägigen Kulturen exprimiert damit etwa 3,5-mal so viel EPO wie die Gesamtpopulation der 21-tägigen Kultur. Zudem zeigt sich, dass eine Selektion der Zellpopulationen sinnvoll ist, da die Population 1 sowohl bei der 7 Tage alten als auch bei der 21 Tage alten Kultur statistisch signifikant mehr EPO exprimiert. Auch dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung aus der Untersuchung der EPO-Genexpression, dass alte Zellen weniger EPO produzieren als die jüngeren Zellen. Das Fazit der Untersuchungen zur endogenen EPO-Expression lautet: EPO wird von jungen Astrozyten stärker

produziert als von alten Zellen. Dies wurde durch EPO-rt-RT-PCR-Messungen sowohl auf Transkriptionsebene als auch durch Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie auf Translationsebene gezeigt.

IV.1.2. EPO-Genexpression in Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie in Abhängigkeit vom Zellalter

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit lautet, ob ein altersabhängiger Unterschied bei der Synthese von EPO in Astrozyten unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie auftritt. Unter normoxischen Bedingungen hatte sich gezeigt, dass Astrozyten höheren Alters (Kulturtag 15 und 21) weniger EPO produzieren als die jungen Zellen des Kulturtages 7 (vgl. IV.1.1.). Zur Beantwortung der Frage, welcher Effekt sich unter hypoxischen Kulturbedingungen zeigt, wurde untersucht, wie sich 24-stündige Hypoxie auf die EPO-Genexpression in Astrozyten auswirkt. Als Kontrollen dienten normoxischen Kulturbedingungen. Es wurde die EPO-mRNA-Expression in jungen (Kulturtag 9), mittelalten (Kulturtag 15) und alten (Kulturtag 21) astroglialen Zellen der Rattenprimärkultur gemessen. Die EPO-mRNA-Expression für die Kulturtage 9, 15 und 21 unter Normoxie und Hypoxie ist in Diagramm 2 dargestellt.

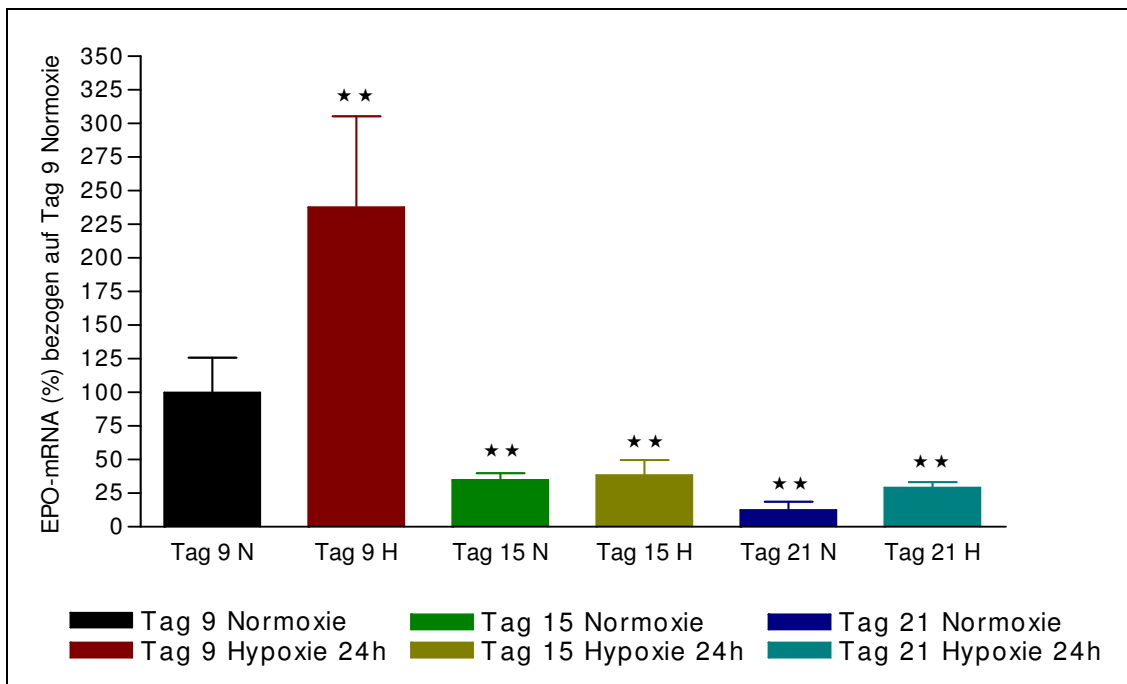


Diagramm 2 EPO-Genexpression von Astrozyten an den Kulturtagen 9, 15 und 21 unter Normoxie (N) und 24-stündiger Hypoxie (H)

IV. Ergebnisse

Die Messdaten wurden auf Tag 9 Normoxie (schwarze Säule entspricht 100%) normiert. Der SEM ist für jede Säule eingezeichnet, die Signifikanzen beziehen sich auf Tag 9 Normoxie. Versuchsreihen mit Zellen des Kulturalters Tag 7 wurden ebenfalls angelegt, nach Isolation der mRNA zeigte sich jedoch, dass die gewonnenen mRNA-Mengen für die Messung mittels LightCycler (mindestens 500 ng RNA je Probe) aufgrund der hohen Absterberate der Zellen in den ersten 7 Tagen der Zellkultur sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie nicht ausreichten, weshalb 9 Tage alte Kulturen verwendet wurden.

In Diagramm 2 ist auf der Ordinate die mRNA-Menge in Prozent bezogen auf Tag 9 unter Normoxie aufgetragen. Die Abszisse gibt das Kulturalter und die Kulturbedingung der Zellen wieder. Wie bereits in Diagramm 1 für Astrozyten unter Normoxie dargestellt, zeigt sich in Diagramm 2 für Zellen unter Hypoxie, dass die EPO-mRNA-Expression mit dem Alter der Zellen nachlässt. Für die einzelnen Kulturtage lässt sich Folgendes feststellen: Nach 24-stündiger Hypoxie findet sich in den Zellen des Tages 9 ein Anstieg der EPO-Genexpression um 140% gegenüber der normoxischen Kontrolle. Am Kulturtag 15 war der Unterschied in der EPO-mRNA-Expression zwischen Normoxie und Hypoxie statistisch signifikant geringer - die EPO-Genexpression der Zellen unter Hypoxie entsprach beinahe der Genexpression der Zellen unter Normoxie. Die EPO-Genexpression der normoxischen Kontrolle des Kulturtages 15 betrug lediglich ein Drittel der Genexpression der normoxischen Zellen des Kulturtages 9. Diese abnehmende Tendenz zeigte sich auch bei den Zellen des Kulturtages 21: Die Genexpression der 21 Tage alten Zellen unter Normoxie betrug noch etwa 10% der Genexpression der Zellen der Normoxie des Kulturtages 9 und weniger als 40% der Genexpression der Zellen des Kulturtages 15. Die Zellen des Tages 21 unter Hypoxie zeigten einen Anstieg der EPO-mRNA-Expression um das 2,3-fache gegenüber der 21-tägigen normoxischen Kontrolle. Obwohl also die EPO-mRNA-Expression mit dem Alter der Zellen zurückging, blieb das Verhältnis der EPO-mRNA-Expression zwischen Hypoxie und Normoxie bei Zellen der Kulturtage 7 und 21 in etwa gleich: Am Kulturtag 7 entsprach das Verhältnis Hypoxie zu Normoxie etwa 2,5 zu 1, am Kulturtag 21 entsprach das Verhältnis Hypoxie zu Normoxie 2,3 zu 1. Bei Tag 15 fand sich aus unklaren

Gründen kein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturen bei normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Aus den in Diagramm 2 gezeigten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass hypoxische Kulturbedingungen eine Steigerung der EPO-Expression auf der Transkriptionsebene verursachen. Es lässt sich aus den Ergebnissen der Durchflusszytometrie aus Teil IV.1.1., in denen sich die Zellkulturen des Tages 7 und des Tages 21 innerhalb der Kulturtage nach jungen und alten Zellen aufteilen lassen, vermuten, dass der EPO-mRNA-Anstieg unter Hypoxie in den 21-Tage alten Kulturen durch den jungen Zellanteil dieses Kulturtages bedingt ist. Da eine Aufteilung in junge, wenig differenzierte Zellen und alte, ausdifferenzierte Zellen aus der gleichen Kultur für die Untersuchungen mittels rt-PCR nicht möglich war, muss dies jedoch Hypothese bleiben.

IV.1.3.EPO-Sekretion von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie in Abhängigkeit vom Zellalter: Untersuchungen mittels EPO-ELISA

Die bisherigen Untersuchungen stellen die intrazelluläre Gen- und Proteinexpression von EPO dar. In weiteren Untersuchungen wurde auch die EPO-Sekretion von Astrozyten in das Kulturmedium untersucht. Es wurde angenommen, dass die Astrozyten das von ihnen produzierte EPO ins Kulturmedium abgeben und dass es dort quantifiziert werden kann. Daher wurde die EPO-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA an den Kulturtagen 7, 9, 15 und 21 jeweils bei Kulturen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gemessen (zur Durchführung siehe III.4. ELISA). Die Ergebnisse dieser Zeitreihe sind in Diagramm 3 zu sehen. Auf der Ordinate wurde die EPO-Konzentration in mU/ml Kulturmedium aufgetragen. Die Abszisse entspricht den Experimentbedingungen, die Beschriftung der Säulen ist in der Legende gegeben. Der Standardfehler des Mittelwertes ist für jede Säule eingezeichnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf Tag 7 Normoxie. Es lässt sich in Diagramm 3 erkennen, dass die EPO-Konzentrationen bei normoxischen Bedingungen an allen Kulturtagen bei etwa 14 mU pro ml Kulturmedium liegen. Es fällt zudem auf, dass an allen Messtagen die EPO-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen (24 h) signifikant höher ist als in der jeweiligen normoxischen Kontrollgruppe.

IV. Ergebnisse

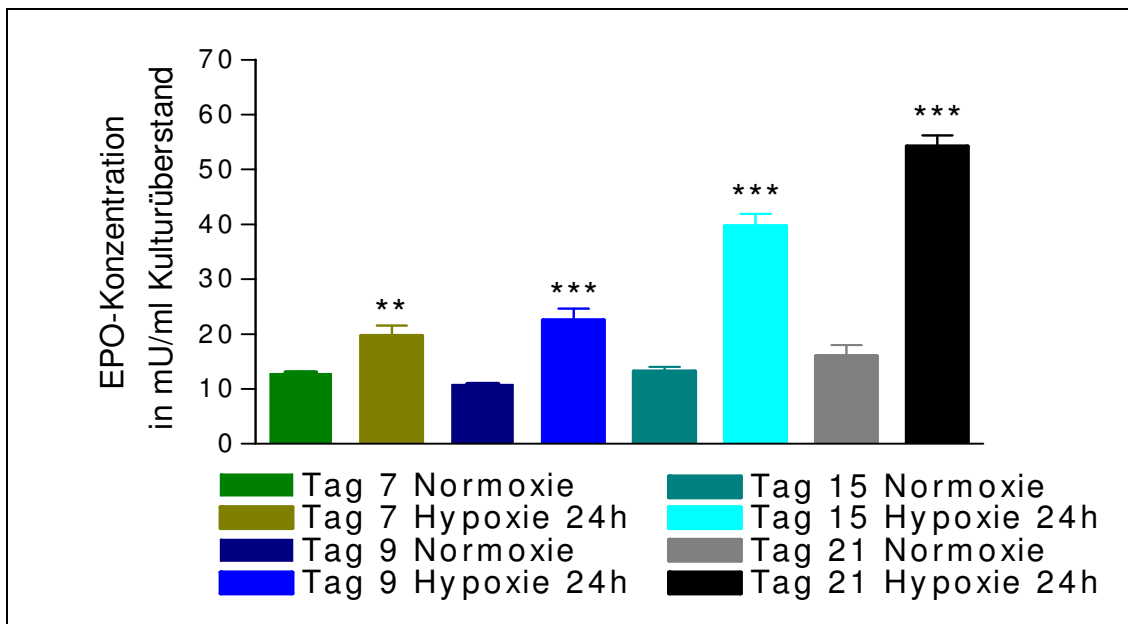


Diagramm 3 EPO-Konzentration im Kulturmedium von Astrozyten unter Normoxie und 24-stündiger Hypoxie an den Tagen 7, 9, 15 und 21

Der stärkste Anstieg der EPO-Konzentration ist nach 24-stündiger Hypoxie am Tag 21 (Verhältnis Hypoxie zu Normoxie 3,6 zu 1) zu sehen. Dies scheint Aussagen zu widersprechen, in denen dargestellt wird, dass die EPO-Expression mit zunehmendem Alter der Zellen nachlässt (Danielyan et al. 2002a,b und 2003b; Schneider et al. 2003). Hier muss jedoch beachtet werden, dass es sich beim Wachstum der Zellen um einen dynamischen Prozess handelt: Die Zellen proliferieren, an den Kulturtagen 14 und 21 befinden sich sehr viel mehr Zellen in den Kulturschalen, die daher auch in der Summe mehr EPO produzieren können. Es ist aus diesem Grund sinnvoll, die Messergebnisse auf die Zellzahl zu beziehen. Deshalb wurden bei der Ernte der Zellen der jeweiligen Kulturtag diese mittels Zählkammer ausgezählt. Bezieht man die Messdaten aus Diagramm 3 nun jeweils auf 1 Mio Zellen, so ergibt sich Diagramm 4. Der Standardfehler des Mittelwertes ist für jede Säule eingezeichnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf Tag 7 Normoxie. Betrachtet man in Diagramm 4 die dargestellten EPO-Konzentrationen bezogen auf die Zellzahl bei normoxischen Bedingungen, so findet sich ein leichter Anstieg der EPO-Sekretion bei Kulturen unter normoxischen Bedingungen zum Tag 21 hin. An Kulturtag 7 wurde mit 8 mU/ml die höchste EPO-Konzentration gemessen. Auch aus Diagramm 4 geht hervor, dass die EPO-Konzentrationen bei

IV. Ergebnisse

hypoxischen Kulturbedingungen zu allen Zeitpunkten größer sind als die EPO-Konzentrationen bei normoxischen Kulturbedingungen.

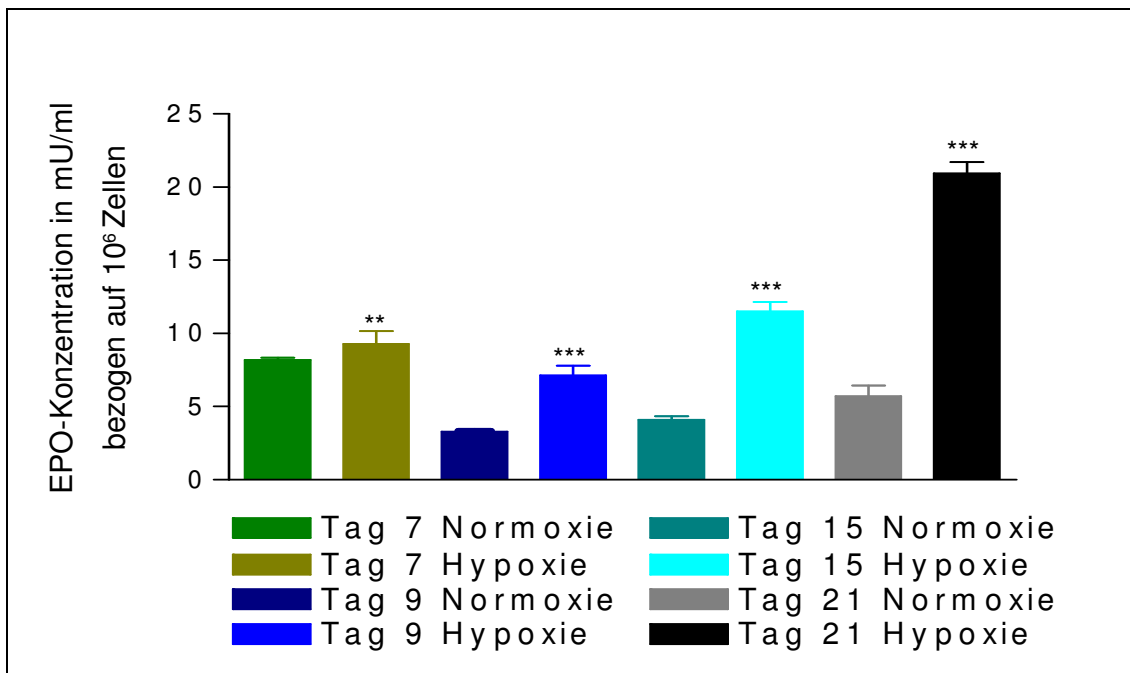


Diagramm 4 EPO-Konzentration im Kulturmedium unter Normoxie und Hypoxie an den Tagen 7, 9, 15 und 21 bezogen auf die Zellzahl

Dies ist besonders am Tag 21 der Fall, hier ist eine 3,6-fache Steigerung der EPO-Konzentration bei hypoxischen Bedingungen gegenüber den normoxischen Bedingungen des gleichen Kulturalters zu verzeichnen. Die EPO-Konzentration an Tag 21 bei normoxischen Bedingungen ist mit knapp 6 mU/ml geringer als die EPO-Konzentration an Tag 7, dies liegt noch im Bereich des Messfehlers. Gut ersichtlich ist aus Diagramm 4 der geringe Anstieg der EPO-Konzentration bei Kulturen unter hypoxischen Bedingungen an Tag 7: Die Werte unter 24-stündigen hypoxischen Bedingungen fallen mit etwa 9 mU/ml bei Bezug auf die Zellzahl kaum größer aus als die normoxische Kontrolle mit 8 mU/ml. Aus Diagramm 4 lässt sich daher ableiten, dass hypoxische Einflüsse eine Stimulation der EPO-Sekretion bewirken. Besonders die Astrozyten des Kulturalters Tag 21 reagieren offenbar mit einem starken Anstieg der EPO-Sekretion auf den hypoxischen Reiz. Fasst man die Aspekte der EPO-mRNA- und der EPO-Sekretionsmessungen zusammen, so bewirken hypoxische Bedingungen für 24 h eine vermehrte Expression der EPO-mRNA in den jungen Kulturen (Kulturtag 7 und 9) und eine vermehrte EPO-Sekretion ins

IV. Ergebnisse

Kulturmedium unter Hypoxie in den alten Kulturen (Tag 15 und Tag 21), während die EPO-Sekretion ins Kulturmedium unter normoxischen Bedingungen in etwa gleich bleibt. Es zeigt sich somit auch bei der Untersuchung der EPO-Sekretion eine Abhängigkeit der extrazellulären EPO-Konzentration vom Zellkulturalter unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Je älter die Zellen sind, desto weniger sekretieren sie EPO unter normoxischen Bedingungen und desto sensitiver reagieren sie bei hypoxischen Reizen mit einer vermehrten EPO-Sekretion.

IV.2. Einfluss von exogenem EPO auf Astrozyten

IV.2.1. Zellzahlen und LDH-Aktivitäten unter Normoxie und Hypoxie bei unterschiedlichen EPO-Dosierungen

Ein weiterer Teil dieser Arbeit untersucht die Reaktion von astroglialen Zellen auf die exogene Gabe von Erythropoietin. Um eine Vorstellung davon zu bekommen, welche Dosierungen von EPO im Kulturmedium für die weiteren Versuche sinnvoll sein würden, wurden Dosis-Wirkungskurven sowohl bei normoxischen als auch bei hypoxischen Bedingungen erstellt. Dazu wurden 7 Tage alte astrogliale Primärkulturen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 48 h mit EPO-Konzentrationen zwischen 0,01U und 10U pro ml Kulturmedium kultiviert. Als Kontrollen dienten EPO-freie Zellkulturen unter gleichen Bedingungen. Es wurde die Anzahl an lebenden Zellen durch Trypanfärbung und anschließendes Auszählen in der Neubauer-Kammer bestimmt. Zudem wurde die LDH-Aktivität als Maß für die Zellzerstörung im Kulturmedium dieser Zellen gemessen. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Zellzahl und der LDH-Aktivitäten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und bei unterschiedlichen EPO-Dosierungen sind in den Diagrammen 5 bis 8 zu sehen. Diagramm 5 zeigt die Anzahl der lebenden Zellen bei den verschiedenen EPO-Dosen unter normoxischen Bedingungen, Diagramm 6 zeigt die Anzahl der lebenden Zellen nach 48-stündiger Hypoxie. Die Zellzahlen bei den verschiedenen EPO-Dosierungen wurden in Prozent bezogen auf die Kontrolle unter Normoxie ohne EPO (Säule N in Diagramm 5) angegeben. Es lässt sich folgende Feststellung zu Diagramm 5 machen: Die Gabe von EPO in Konzentrationen von 0,01U bis 10U pro ml Kulturmedium bewirkt einen Anstieg an lebenden Zellen unter normoxischen Bedingungen. Dies kann als proliferativer Effekt von EPO auf Astrozyten unter normoxischen Bedingungen gewertet werden. Eine Dosisabhängigkeit bezüglich des proliferativen Effekts von EPO lässt sich unter normoxischen Bedingungen nicht ableiten: Bei den in Diagramm 5 dargestellten Versuchen bewirken EPO-Dosierungen zwischen 0,25U und 10U pro ml Kulturmedium eine durchschnittliche Steigerung der Zellzahl um etwa 12% verglichen zur Kontrolle ohne EPO-Gabe. EPO-Konzentrationen unter 0,25U pro ml erwiesen sich als

IV. Ergebnisse

nicht wirksam. Der Standardfehler des Mittelwertes ist für jede Säule eingezeichnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf Tag 7 Normoxie.

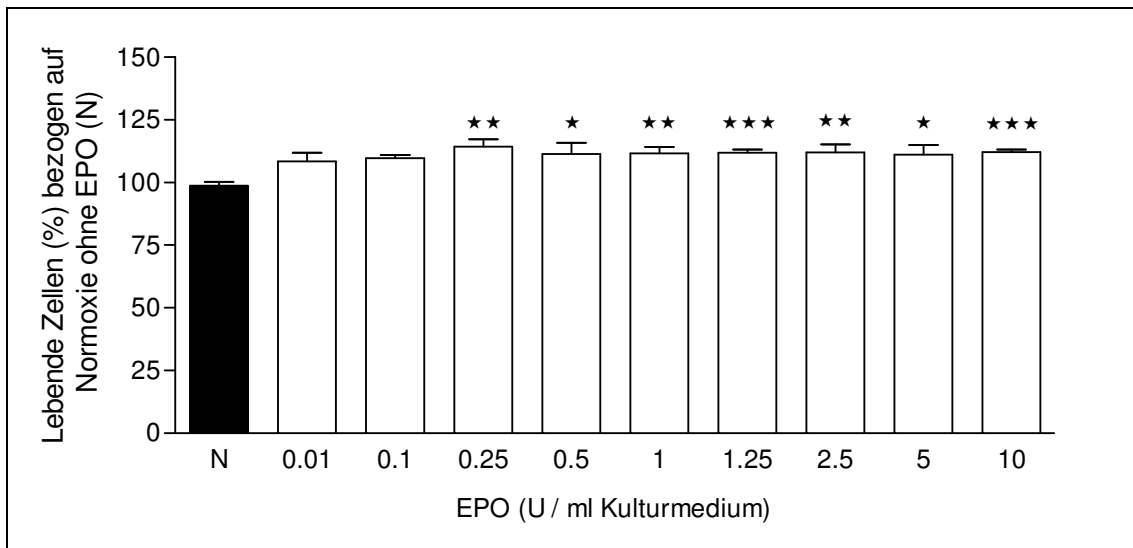


Diagramm 5 Zellzahl in % unter Normoxie bei EPO-Gaben von 0,01U bis 10U bezogen auf Normoxie ohne EPO (Säule N); 7 Tage alte APK

Zusammenfassend lässt sich sagen: EPO scheint einen proliferativen Effekt auf Astrozyten unter normoxischen Kulturbedingungen zu haben, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen EPO-Konzentrationen von 0,25U bis 10U bezüglich ihres proliferativen Effekts gibt. Wie verhält sich nun die Zellzahl bei unterschiedlichen EPO-Dosierungen unter 48-stündiger Hypoxie? Diagramm 6 zeigt die Ergebnisse.

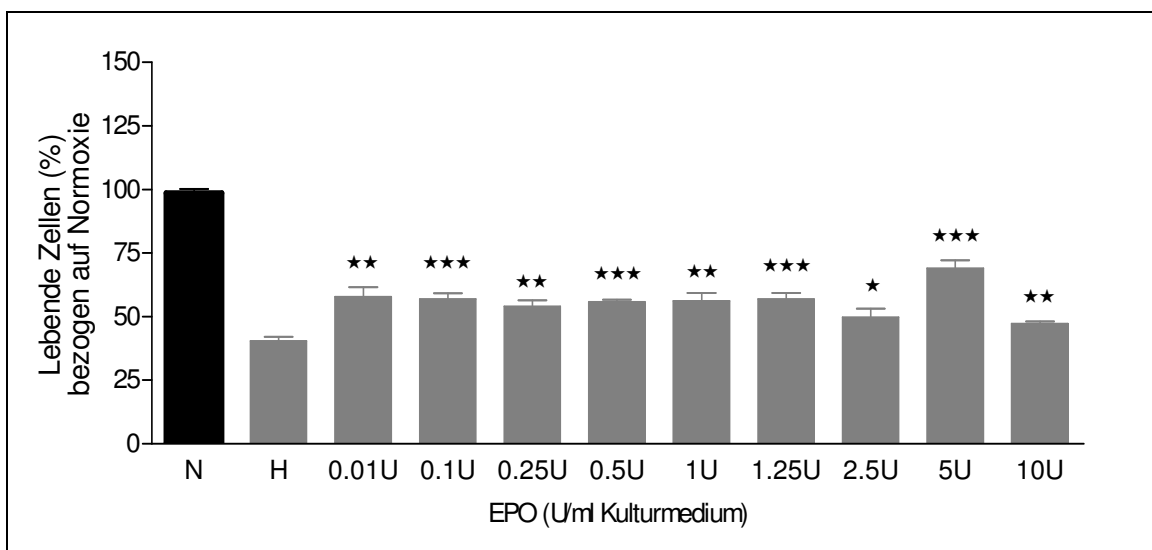


Diagramm 6 Zellzahl in % nach 48 h Hypoxie bei EPO-Gaben von 0,01U bis 10U bezogen auf Normoxie ohne EPO (Säule N); 7 Tage alte APK

IV. Ergebnisse

Es wurden die Zellzahlen in Bezug zur normoxischen Kontrolle ohne EPO (Säule N entspricht 100%) gesetzt. Auch hier ist der Standardfehler des Mittelwertes für jede Säule eingezeichnet. Die Signifikanzen beziehen sich ebenfalls auf Tag 7 Normoxie. Es zeigt sich in Diagramm 6 ein deutlicher Abfall der Zellzahlen unter den hypoxischen Kulturbedingungen, da durch den O₂-Mangel Zellen absterben. Am stärksten ausgeprägt war die Abnahme der Zellzahl bei den Kulturen unter Hypoxie, bei denen kein EPO zugegeben wurde (Säule H). Bei den weiteren Kulturen unter hypoxischen Bedingungen erhielten die Zellen während der Hypoxie zwischen 0,01U und 10U EPO je ml Kulturmedium. Es ist in Diagramm 6 zu sehen, dass die Zellzahlen trotz der hypoxischen Schädigung unter allen EPO-Dosierungen weniger zurückgehen, als wenn kein exogenes EPO den Zellen zur Verfügung stand. Am meisten Zellen überlebten die Hypoxie allerdings bei einer Dosierung von 5 U je ml Kulturmedium. Unter hypoxischen Bedingungen für 48 h scheint also die effektivste Konzentration 5U EPO pro ml Medium in Bezug auf die Anzahl der überlebenden Zellen (Diagramm 6) zu betragen. Aus diesem Grund wurde in allen späteren Experimenten eine Konzentration von 5 U je ml Medium verwendet. Desweiteren zeigte die Studie mit Schlaganfallpatienten von Ehrenreich et al. 2002, dass nach Gabe von einer therapeutischen Dosis von 100000 Units EPO eine Serumkonzentration von 5,1 U/ml erreicht wird.

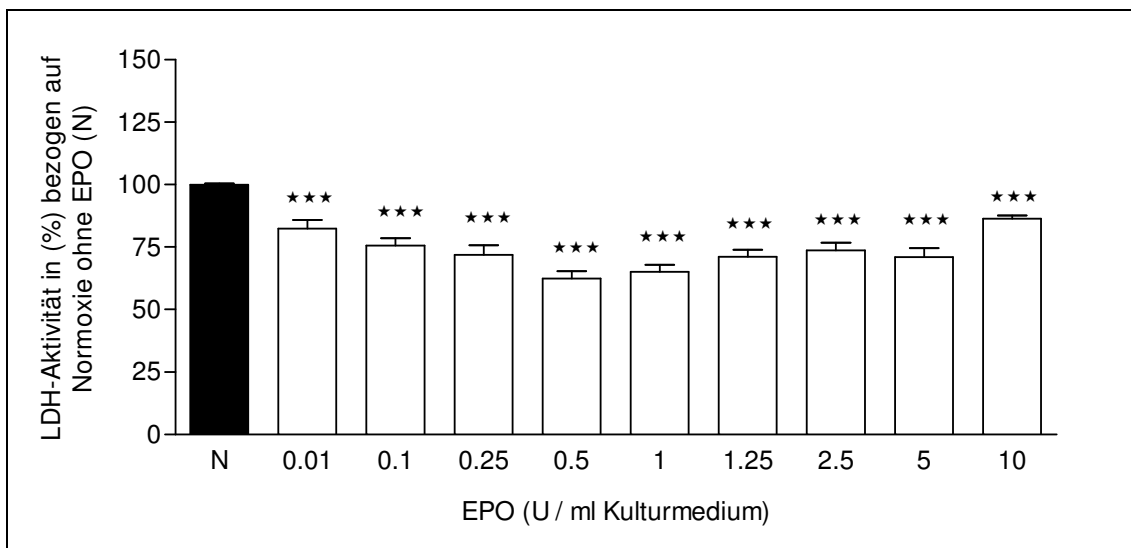


Diagramm 7 LDH-Aktivität im Medium in % unter Normoxie bei EPO-Gaben von 0,01U bis 10U bezogen auf Normoxie ohne EPO; 7 Tage alte APK

IV. Ergebnisse

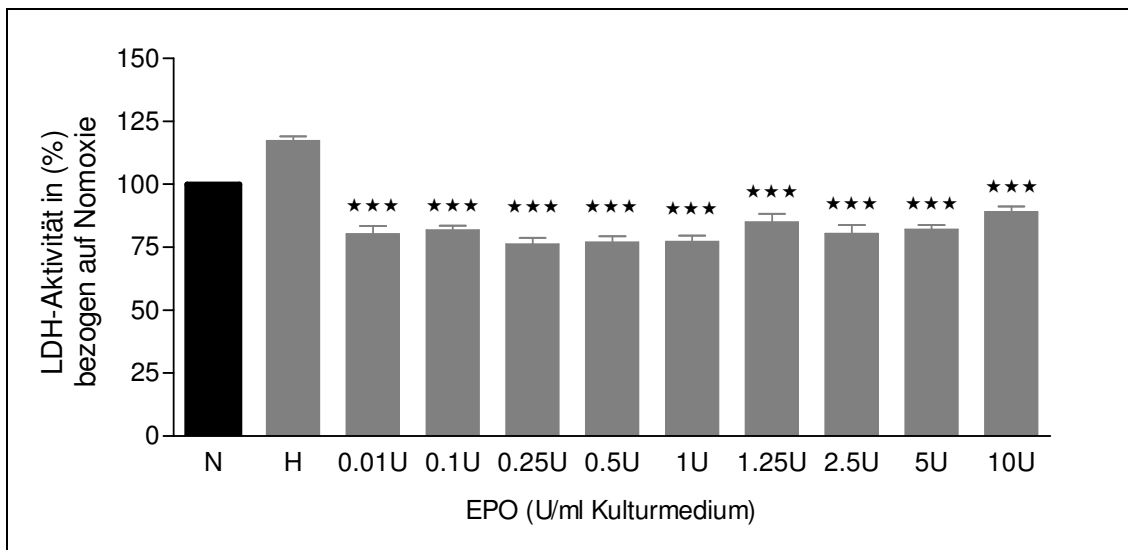


Diagramm 8 LDH-Aktivität im Medium in % nach 48-stündiger Hypoxie bei EPO-Gaben von 0,01U bis 10U bezogen auf Normoxie ohne EPO; 7 Tage alte APK

Es wurden nun analog zu den Zellzahlen die LDH-Aktivitäten im Medium bestimmt. Diagramm 7 zeigt die LDH-Aktivitäten im Medium bei Zellen unter Normoxie, Diagramm 8 die LDH-Aktivitäten nach 48 h Hypoxie. Es wurden beide Diagramme auf die normoxische Kontrolle ohne EPO-Zusatz bezogen (Säule N). Der Standardfehler des Mittelwertes ist für jede Säule eingezeichnet. Die Signifikanzen beziehen sich wiederum auf Tag 7 Normoxie. Da die LDH-Aktivität ein Maß für die Zellzerstörung ist, bedeuten niedrigere LDH-Aktivitäten, dass weniger Zellen zerstört wurden, wohingegen hohe LDH-Aktivitäten auf eine starke Zellschädigung schließen lassen. Es zeigt sich in Diagramm 7, dass exogen zugegebenes EPO unter normoxischen Kulturbedingungen einen Rückgang der LDH-Aktivität verglichen zur Kontrolle ohne EPO-Gabe bewirkt. EPO im Kulturmedium verringert also bereits unter Normoxie Zellschäden, die durch die Kulturbedingungen selbst auftreten. Dies ist ein Indiz für einen zellprotektiven Effekt von EPO auf astrogliale Zellen. In Diagramm 7 ist der stärkste Rückgang der LDH-Aktivität bei 0,5U EPO zu verzeichnen, jedoch auch bei 5U ist eine signifikante Reduktion der LDH-Aktivität gegeben, so dass in den späteren Experimenten mit 5U EPO pro ml Medium gearbeitet wurde. In Diagramm 8 sind die LDH-Aktivitäten bei den verschiedenen EPO-Konzentrationen unter Hypoxie dargestellt. Wieder wurde die normoxische

Kontrolle ohne EPO (schwarze Säule) gleich 100% gesetzt und die Werte der hypoxischen Versuchsreihe darauf bezogen. Für jede Säule wurde der Standardfehler des Mittelwertes eingezeichnet, die Signifikanzen beziehen sich auf Tag 7 Normoxie. Wie zu erwarten ist die LDH-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen ohne EPO-Gabe größer als bei der Kontrolle unter normoxischen Bedingungen, da die Hypoxie verstärkt Zellen schädigt und es somit zu dem LDH-Anstieg kommt. Wird nun EPO dem Kulturmedium während der Hypoxie beigegeben, ist der Effekt beeindruckend: Unabhängig von der EPO-Konzentration ist bei allen hypoxischen Kulturen deutlich weniger LDH-Aktivität zu verzeichnen, und zwar sowohl verglichen mit den Kulturen unter normoxischen Bedingungen ohne EPO. Zusammenfassend zeigt Diagramm 8, dass bei Gabe von EPO – gleich welcher Konzentration – die LDH-Aktivität im Kulturmedium kleiner ist als ohne EPO-Gabe. Wie bereits beschrieben, wurde für alle weiteren Experimente mit exogener EPO-Gabe eine Konzentration von 5U EPO pro ml Kulturmedium gewählt, da bei dieser Konzentration auch unter hypoxischen Bedingungen die Zellzahl am größten (Diagramm 5 und 6) und die LDH-Aktivität im Medium am geringsten war (Diagramm 7 und 8). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte nun untersucht werden, ob die Effekte von EPO (Erhöhung der Zellzahl und Verringerung der LDH-Aktivität) mit dem Alter der astroglialen Zellen zusammenhängen.

IV.2.2.Zellzahlen und LDH-Aktivitäten unter Normoxie und Hypoxie bei Astrozyten verschiedenen Alters

Der Versuchsansatz für das Experiment zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen einem Effekt von exogenem EPO und dem Alter der Zellen sah wie folgt aus: Rattenastrozyten aus der Primärkultur wurden für die Kulturtage 7 und 21 angesät und 24 h lang unter hypoxischen Kulturbedingungen kultiviert. Je die Hälfte der Kulturschalen wurde zudem mit 5U EPO je ml Kulturmedium inkubiert. Nach Ende des Experiments wurde die LDH-Aktivität im Kulturmedium bestimmt. In Diagramm 9 sind die LDH-Aktivitäten für den Kulturtag 7, in Diagramm 11 für den Kulturtag 21 darstellt. Die Ordinaten geben die LDH-Aktivität in U/ml Kulturmedium wieder, auf der Abszisse sind die Versuchsansätze dargestellt. Der Standardfehler des Mittelwertes ist für jede

IV. Ergebnisse

Säule verzeichnet, die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige normoxische bzw. hypoxische Kontrolle.

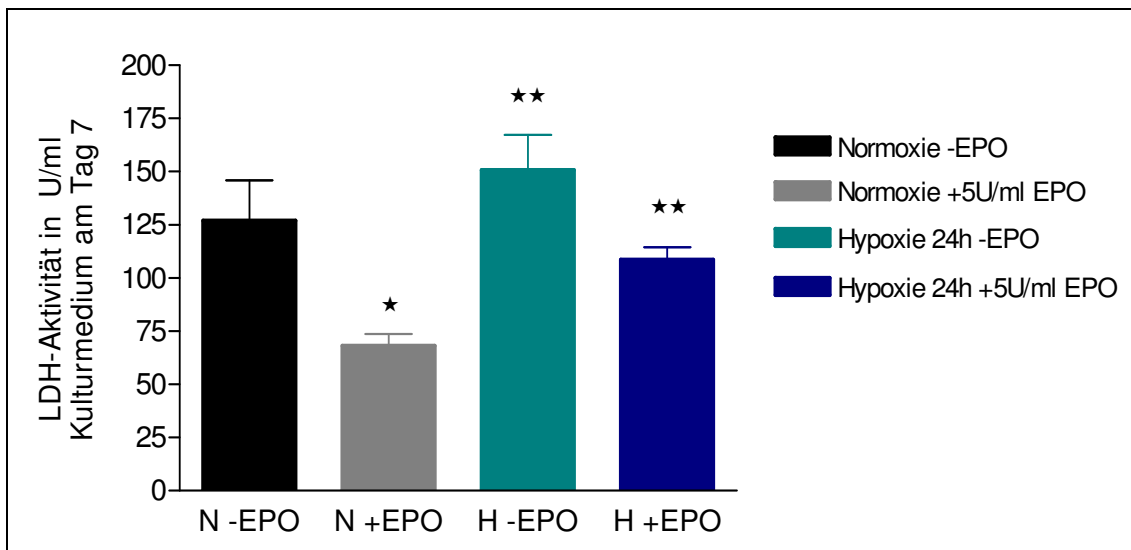


Diagramm 9 LDH-Aktivität (in U pro ml Kulturmedium) in der astroglialen Primärkultur am Tag 7

An Tag 7 wurde im Medium der normoxischen Proben ohne EPO-Gabe eine mittlere LDH-Aktivität von etwa 127 U/ml gemessen. Bei der Gabe von 5 U/ml EPO betrug die LDH-Aktivität 68 U/ml. Während 24-stündiger Hypoxie wurden die Zellen offenbar geschädigt: Die LDH-Aktivität stieg bei den Proben ohne EPO-Gaben auf durchschnittlich 150 U/ml an. Bei Gabe von 5 U EPO pro ml Kulturmedium war die LDH-Aktivität während der 24-stündigen Hypoxie im Mittel 108 U/ml – dies ist sogar eine geringere Aktivität als in der normoxischen Kontrolle ohne EPO. Dieser Effekt wurde bereits in Teil IV.2.1. bei Diagramm 8 beschrieben. Auch aus diesen Ergebnissen kann ein positiver Effekt von EPO auf das Ausmaß der Zellschädigung abgeleitet werden. Ist diese Annahme richtig, sollten sich daher auch mehr überlebende Zellen in den Kulturschalen finden. Daher wurden bei dem oben durchgeführten Experiment die adhärennten Zellen in den Kulturschalen abtrypsiniert, mit Trypanblau gefärbt und in der Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahlen bei den verschiedenen Bedingungen sind für den Tag 7 in Diagramm 10, für den Tag 21 in Diagramm 11 graphisch dargestellt. Der Standardfehler des Mittelwertes ist für jeden Versuchsansatz eingezeichnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige normoxische bzw. hypoxische Kontrolle ohne EPO. Alle oben beschriebenen Beobachtungen

IV. Ergebnisse

betrafen astrogliale Zellen aus der Rattenprimärkultur des Kulturtages 7. Um zu untersuchen, ob sich Zellen unterschiedlichen Alters gleich oder verschieden zu den Zellen des Kulturtages 7 verhalten würden, wurde der gleiche Versuchsansatz auch für Zellen des Kulturtages 21 durchgeführt.

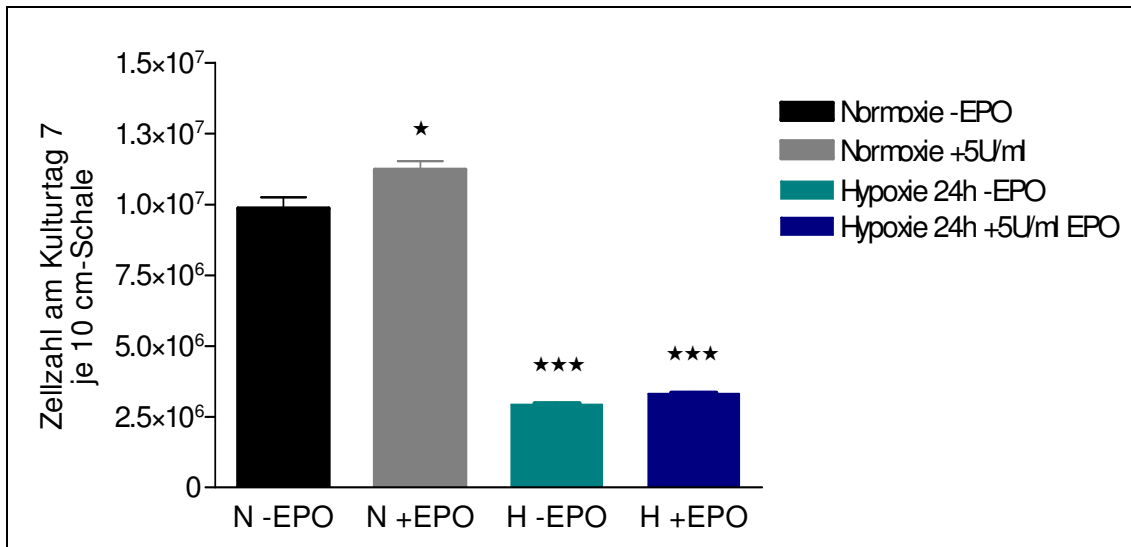


Diagramm 10 Zellzahl in der astrogliareichen Primärkultur am Kulturtag 7

Das Diagramm 11 gibt die LDH-Aktivitäten im Kulturmedium bei den verschiedenen Kulturbedingungen wieder. Die Ordinate gibt wiederum die LDH-Aktivität in U/ml Medium an, die Abszisse die Kulturbedingungen. Der Standardfehler des Mittelwertes ist für jeden Versuchsansatz eingezeichnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf die normoxische bzw. hypoxische Kontrolle ohne EPO.

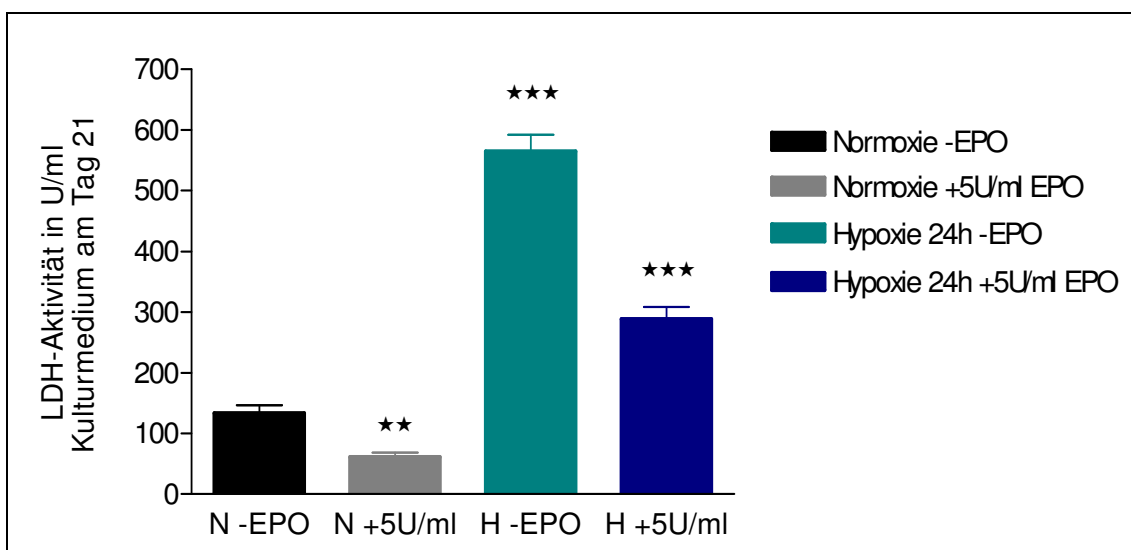


Diagramm 11 LDH-Aktivität (in U pro ml Kulturmedium) in der astroglialen Primärkultur am Tag 21

Es fällt auf, dass bei den Proben unter Normoxie ohne EPO-Gabe der Wert der LDH-Aktivität mit 133 U/ml in etwa der LDH-Aktivität von Tag 7 (127 U/ml) unter denselben Kulturbedingungen entspricht (vgl. Diagramme 9 und 11). Auch unter der Gabe von 5 U/ml EPO verändert sich die LDH-Aktivität zwischen Tag 21 (61 U/ml) und Tag 7 (68 U/ml) kaum. Unter der Hypoxie verändern sich ähnlich wie bei Tag 7 die LDH-Aktivitäten: Am Tag 21 wurde in den Proben der Hypoxie ohne Gabe von EPO ein durchschnittlicher Wert von 565 U/ml gemessen – dies entspricht einer Steigerung um das 3,7-fache gegenüber dem Vergleichswert von Tag 7. Bei Gabe von 5 U/ml EPO ins Kulturmedium für 24 h unter hypoxischen Bedingungen reduziert sich am Tag 21 die LDH-Aktivität auf 288 U/ml. Unter normoxischen Bedingungen findet sich eine 59-prozentige Reduktion der LDH-Aktivität unter EPO-Gabe im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (N-EPO, Diagramm 11). Für Rattenastrozyten von Tag 21 lässt sich damit ein sehr viel stärkeres Ausmaß der durch Messung der LDH erfassbaren Zellschädigung unter Hypoxie feststellen. Auch für den Kulturtag 21 wurden die Zellzahlen ermittelt und in Diagramm 12 dargestellt.

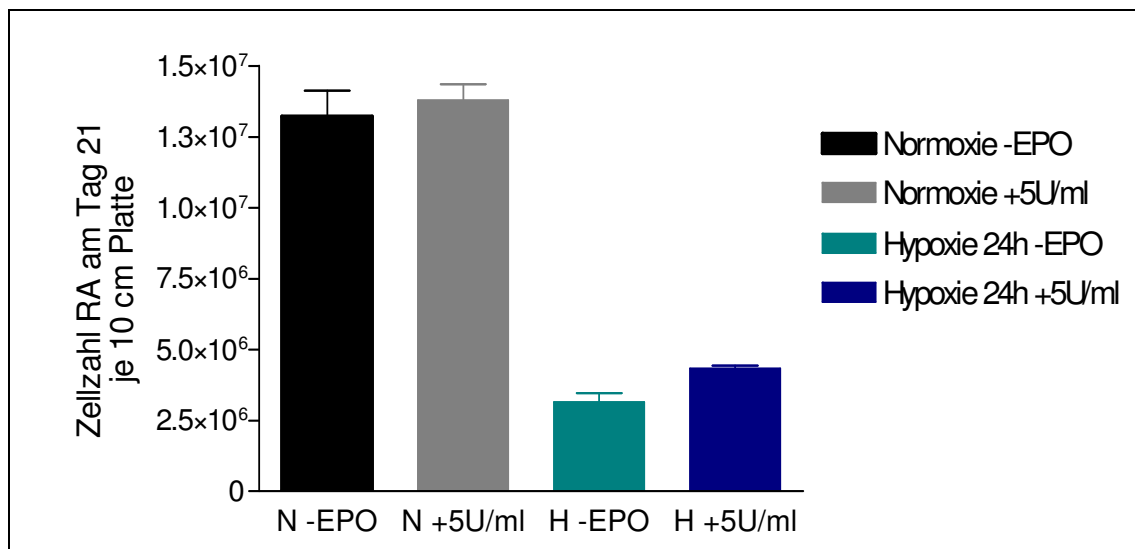


Diagramm 12 Zellzahl in der astroglialen Primärkultur am Tag 21

Am Tag 21 finden sich pro 10 cm-Schale unter normoxischen Bedingungen etwa 13,2 Mio Zellen je Kulturschale, unter EPO-Gabe werden es sogar noch mehr Zellen, durchschnittlich 13,9 Mio. Wie am Tag 7 gehen die Zellzahlen

unter 24-stündiger Hypoxie deutlich zurück: Ohne die Gabe von EPO auf 3,1 Mio, mit EPO-Gabe jedoch nur auf 4,3 Millionen Zellen je Schale. Aus den Daten dieser Versuchsreihe lassen sich somit zwei Effekte von EPO auf Rattenastrozyten ableiten: Erstens lässt sich ein proliferativer Effekt von EPO für die frühe, 7-tägige Kultur und für die späte, 21-tägige Kultur aus dem Vergleich der Zellzahlen unter der Normoxie ohne und mit EPO-Gabe von 5U je ml Kulturmedium nachweisen. Zweitens verringert EPO das Ausmaß des durch Hypoxie verursachten LDH-Anstiegs. Nimmt man die LDH als Maßstab für eine Zellschädigung, so dämmt EPO diese Schädigung ein. Dieser Effekt lässt sich für die Kulturtage 7 und 21 bei 24-stündiger Hypoxie als Abnahme der LDH-Aktivität beobachten. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse nur noch eine EPO-Konzentration von 5U je ml Kulturmedium verwendet. Selbstverständlich wäre es interessant, als weitere Versuchsbedingung mit verschiedenen EPO-Konzentrationen zu experimentieren. Bei zwei verschiedenen Kulturbedingungen und mehreren Kulturtagen hätte die Variation der EPO-Konzentration in weiteren Experimenten den Rahmen dieser Arbeit jedoch gesprengt. Aus den Zellzahl-Diagrammen 10 und 12 lässt sich zusätzlich zu den überlebenden Zellzahlen bei unterschiedlichen EPO-Konzentrationen Folgendes ableiten: Vergleicht man die Normoxie ohne EPO-Gabe (N -EPO) mit der Hypoxie ohne EPO Gabe (H - EPO), so ging die Zellzahl von ca. 13 Mio auf ca. 3 Mio Zellen unter Hypoxie zurück. Unter der Gabe von EPO überlebten hingegen deutlich mehr Zellen: Bei Gabe von 5 U/ml überlebten hingegen ca. 4,5 Mio Zellen die hypoxischen Kulturbedingungen, unter der Normoxie erhöhte sich die Zellzahl bei Gabe von EPO auf ca. 13,4 Millionen Zellen. Dies entspricht einer deutlichen Steigerung der Überlebensrate unter der Hypoxie bei Gabe von EPO.

IV.2.3. Einfluss von exogenem EPO auf Proliferation und Apoptose bei Zellen unterschiedlichen Alters unter Normoxie und Hypoxie

Der folgende Teil der Arbeit untersucht EPO als proliferativen Faktor in astroglialen Primärkulturen. Wie bei den vorangegangenen Experimenten wurden Astrogliazellen der Primärkultur 7 bzw. 21 Tage lang sowohl bei normoxischen als auch hypoxischen Kulturbedingungen (48 h bei 1% O₂) einmal

IV. Ergebnisse

mit, einmal ohne 5 U EPO pro ml Kulturmedium kultiviert. Dann wurden die Astrozyten u.a. immunzytochemisch auf ihre Proliferation und auf die in ihnen ablaufenden apoptotischen Vorgänge hin untersucht. Als Proliferationsmarker wurde PCNA (proliferation cell nuclear antigen) verwendet, die Apoptose wurde mittels TUNEL-Reaktion (siehe Kapitel III.3.3.) sichtbar gemacht. PCNA ist ein Protein, das von proliferierenden Zellen gebildet wird (Schlatt und Weinbauer 1994). PCNA ist ein 36 kDa schweres Protein, das sich zwischen Spezies kaum unterscheidet. PCNA ist ein Co-Faktor der DNS-Polymerase δ in der S-Phase der Mitose und ist während der DNS-Synthese an Reparaturvorgängen beteiligt. Da es spezifisch für den Zeitraum der mitotischen S-Phase ist, eignet es sich als Proliferationsmarker (Tan et al. 1987). PCNA reichert sich während der G1-Phase an, erreicht seine höchste Konzentration in der S-Phase und schwindet während der G2/M-Phase des Zellzyklus (Kurki et al. 1988). Die Halbwertszeit von PCNA beträgt 20 Stunden, so dass es durchaus möglich ist, PCNA in nicht mehr proliferierenden Zellen innerhalb des genannten Zeitfensters zu detektieren. Die folgenden Abbildungen 3 bis 6 zeigen diese immunzytochemischen Färbungen. In Abb. 3 sind 7 Tage alte Astrozyten (die GFAP-Färbung ist in Kapitel IV.3.2. gezeigt) unter normoxischen Bedingungen ohne exogene EPO-Gabe zu sehen. Die Kerne sind blau gefärbt (DAPI), PCNA als Proliferationsmarker ist rot gefärbt, die TUNEL-Färbung zur Darstellung apoptotischer Vorgänge ist grün. Vergleicht man Abb. 3 mit Abb. 4, so finden sich in Abb. 4 mehr PCNA-positive Zellen und weniger TUNEL-Reaktionen als in Abb. 3. In den Abbildungen 5 und 6 sind 7 Tage alte Zellen der Rattenprimärkultur nach 48-stündiger Hypoxie dargestellt. Eindrucksvoll sind in Abb. 5 die ausgeprägten Apoptosevorgänge als grüne TUNEL-Färbungen zu sehen. Eine PCNA-Markierung ist praktisch nicht vorhanden – in den Zellen laufen die TUNEL-markierbaren Apoptosevorgänge ab, zu proliferativen Prozessen kommt es nicht. Die Zellen aus der Kultur in Abb. 5 waren der Hypoxie ohne exogene EPO-Gabe ausgesetzt. Abb. 6 zeigt ebenfalls Astrozyten nach 48-stündiger Hypoxie, hier enthielt jedoch das Kulturmedium je ml 5U EPO. Der Unterschied zu Abb. 5 ist eindrucksvoll: Es fanden in den Zellen trotz Hypoxie kaum Apoptosevorgänge statt. Im Gegenteil, es lassen sich bei

IV. Ergebnisse

mehreren Zellen deutlich PCNA-positive Proliferationsvorgänge erkennen. Die Abnahme der TUNEL-Reaktion als Apoptose-Marker spricht für den antiapoptotischen Effekt von EPO, die Zunahme der PCNA-Positivität sogar unter hypoxischen Bedingungen spricht für einen ausgeprägten proliferativen Effekt von EPO.

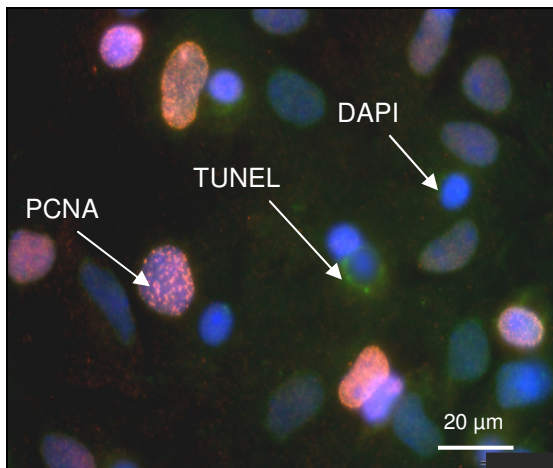


Abb. 3 Tag 7 Normoxie ohne EPO
PCNA (rot), TUNEL (grün), DAPI (blau)

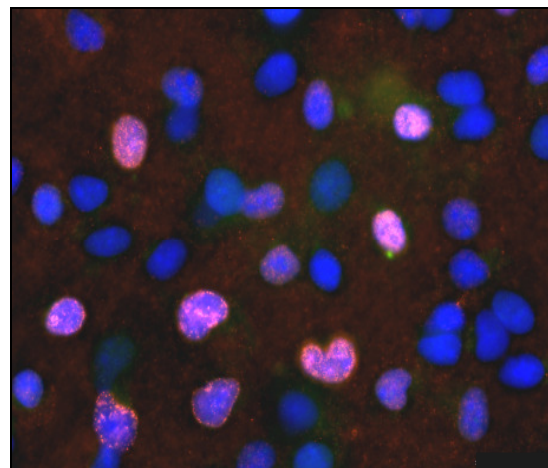


Abb. 4 Tag 7 Normoxie mit EPO
PCNA (rot), TUNEL (grün), DAPI (blau)

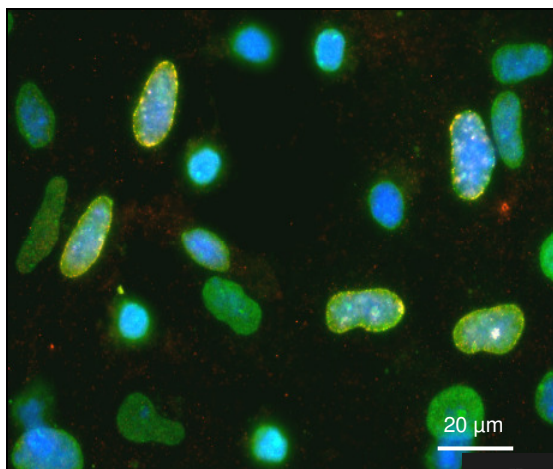


Abb. 5 Tag 7 Hypoxie ohne EPO
PCNA (rot), TUNEL (grün), DAPI (blau)

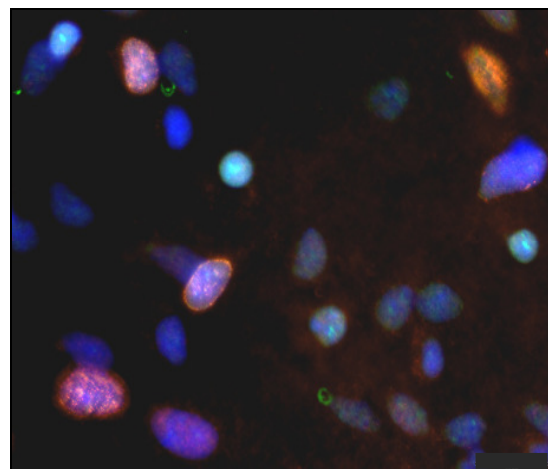


Abb. 6 Tag 7 Hypoxie mit EPO
PCNA (rot), TUNEL (grün), DAPI (blau)

Eine These dieser Arbeit lautet, dass der antiapoptotische und proliferative Effekt von EPO abhängig vom Alter der Zellen ist. Aus diesem Grund wurden die gleichen immunzytochemischen Versuche auch an 21 Tage alten astroglialen Kulturen durchgeführt. Das Ergebnis ist in den folgenden Abbildungen 7 bis 10 zu sehen. Abb. 7 zeigt 21 Tage alte Zellen unter normoxischen Kulturbedingungen ohne exogene EPO-Gabe. Mehrere dieser

IV. Ergebnisse

Zellen zeigen die grüne TUNEL-Reaktion, manche stellen sich aber auch schwach PCNA-positiv (rot) dar. Den Zellen in der Kultur der Abb. 8 stand hingegen exogenes EPO (5U/ml Medium) zur Verfügung. Wie bei den Zellen des Kulturtags 7 geht auch bei den 21 Tage alten Kulturen unter Normoxie und exogener EPO-Gabe die TUNEL-Reaktion zurück. Hingegen zeigt sich auch bei den 21 Tage alten Zellen eine verstärkte Proliferationsaktivität der Zellen durch eine verstärkte Anfärbbarkeit für PCNA.

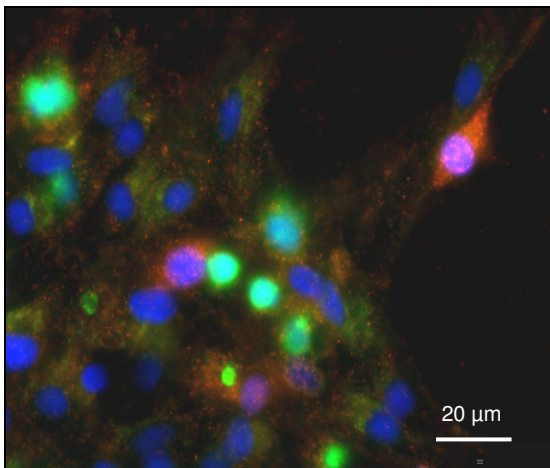


Abb. 7 Tag 21 Normoxie ohne EPO
PCNA (rot), TUNEL (grün), DAPI (blau)

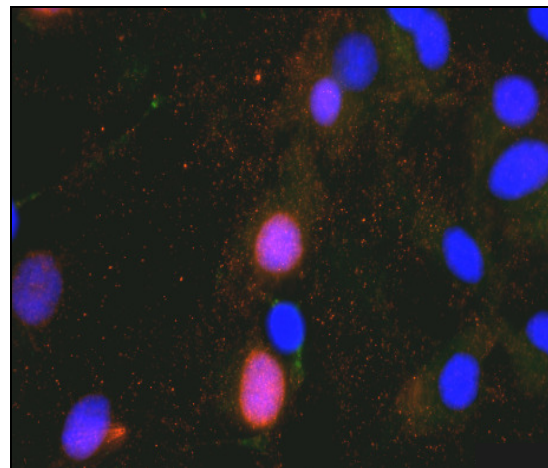


Abb. 8 Tag 21 Normoxie mit EPO
PCNA (rot), TUNEL (grün), DAPI (blau)

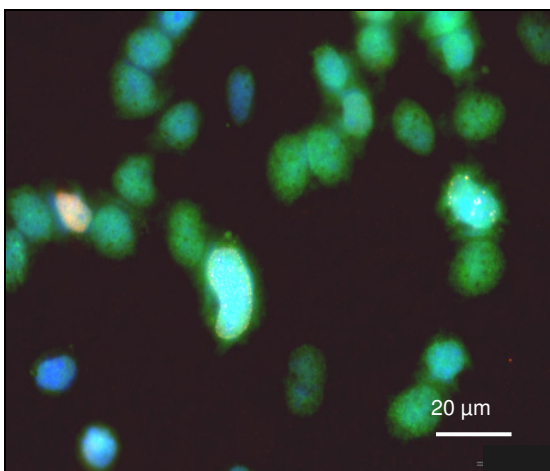


Abb. 9 Tag 21 Hypoxie ohne EPO
PCNA (rot), TUNEL (grün), DAPI (blau)

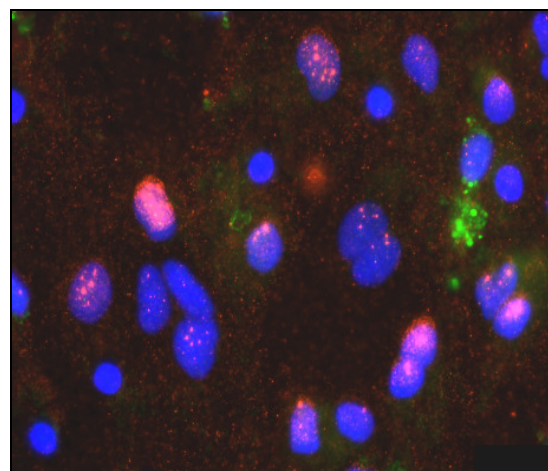


Abb.10 Tag 21 Hypoxie mit EPO
PCNA (rot), TUNEL (grün), DAPI (blau)

Auch die 21 Tage alten Kulturen wurden 48-stündiger Hypoxie mit und ohne EPO ausgesetzt. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Färbungen. Abb. 9 zeigt praktisch nur noch apoptotische Zellen in der TUNEL-Reaktion (grün). PCNA (rot) lässt sich hier hingegen nur noch erahnen. Dies entspricht dem Bild, das

IV. Ergebnisse

die 7 Tage alte Kultur unter der Hypoxie ohne EPO-Gabe zeigt. Und auch die 21 Tage alten Zellen, die in Abb. 10 zu sehen sind, verhalten sich analog bei Gabe von EPO zum Kulturmedium: Die grüne TUNEL-Reaktion verschwindet fast vollständig, dafür lassen sich vermehrt Zellen mit PCNA (rot) darstellen. Somit lässt sich auch für die 21 Tage alten Zellen ein antiapoptotischer und proliferationsfördernder Effekt von EPO unter Hypoxie in den immunzytochemischen Untersuchungen zeigen.

IV.2.4. Einfluss von exogenem EPO auf die Proliferation von Astrozyten – Durchflusszytometrische Messungen

Um zu untersuchen, ob EPO tatsächlich einen proliferativen Effekt auf Astrozyten hat, wurden nicht nur Zellzahldiagramme erstellt und Zellen immunzytochemisch dargestellt, sondern es wurden Astrozyten auch mittels Durchflusszytometrie auf ihre PCNA-Expression hin quantifiziert. Als These wurde formuliert, dass Astrozyten, in deren Kulturmedium sich pro ml 5U EPO befindet, den Proliferationsmarker PCNA stärker exprimieren würden als diejenigen Zellen, die keiner EPO-Gabe ausgesetzt waren. Dies wurde sowohl für normoxische als auch für hypoxische Kulturbedingungen postuliert. Diagramm 13 zeigt die Ergebnisse der PCNA-Messungen an Astrozyten.

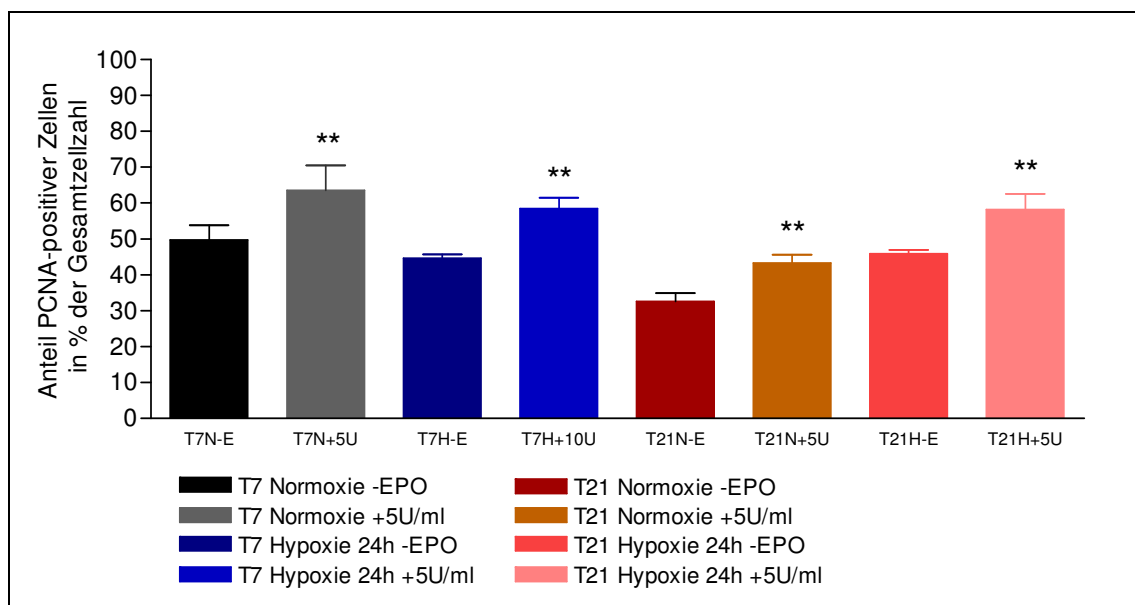


Diagramm 13 Anteil PCNA-positiver Astrozyten der Kulturstage 7 und 21 mit und ohne EPO-Gabe

In Diagramm 13 sind die Ergebnisse für die Gesamtzellzahl aufgetragen. Hierbei entspricht die Ordinate dem Anteil der PCNA-positiven Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl, auf der Abszisse sind das Alter und die Kulturbedingungen der Zellen eingetragen. Nach oben ist für jede Säule der Standardfehler des Mittelwertes verzeichnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige normoxische bzw. hypoxische Kontrolle. Die Legende gibt die Versuchsbedingungen wieder. Zu sehen ist in Diagramm 13, dass die Anzahl der proliferierenden Zellen bei der Normoxie ohne EPO am Tag 21 gegenüber Tag 7 geringer ist (T21N vs T7N-E). An Tag 7 (T7N-E) sind etwa 50% der Zellen PCNA-positiv, an Tag 21 (T21N-E) nimmt der Anteil der PCNA-positiven Zellen auf etwa 35% ab. Vergleicht man nun die Kulturen unter EPO-Gabe an den Tagen 7 und 21 unter Normoxie (T7N+5U und T21N+5U), so ist am Tag 7 eine Zunahme der PCNA-positiven Zellen auf über 70% an der Gesamtpopulation zu sehen, an Tag 21 nimmt die PCNA-Positivität auf über 45% zu (T21N). Dies bedeutet, dass EPO sowohl bei 7 Tage alten Zellen als auch bei 21 Tage alten Kulturen unter normoxischen Bedingungen die PCNA-Expression signifikant erhöht. Bei 24-stündiger Hypoxie ist der Anteil der PCNA-positiven Zellen mit ca. 45% bei Tag 7 und Tag 21 in etwa gleich groß (T7H-E und T21H). Und auch unter hypoxischen Kulturbedingungen bestätigt sich die Beobachtung aus den normoxischen Versuchen: Sowohl an Tag 7 als auch an Tag 21 führt die Gabe von EPO zu einem starken Anstieg der PCNA-Expression auf etwa 60% (T7H+5U und T21H+5U).

IV.2.5. Einfluss von EPO auf das Apoptoseverhalten von Astrozyten: Untersuchungen zu Zellzahlen, LDH- und Caspase-3/7-Aktivität

Da für einen angenommenen protektiven Effekt von EPO insbesondere die Wirkungen von EPO auf apoptotische Vorgänge der Zellen wichtig sind, wurden für die vorliegende Arbeit nicht nur apoptotische Vorgänge mittels TUNEL-Reaktion dargestellt, sondern auch die für die Apoptose wichtigen Caspase-3/7. Die Arbeitsgruppe von Yu et al. 2001 zeigte, dass eine gewisse Apoptoserate, gemessen mittels TUNEL-Reaktion und Caspase-3-Assay, durch die Zellkultur bedingt auftritt und unter ischämischen Bedingungen ansteigt.

IV. Ergebnisse

In einer weiteren Versuchsreihe wurden daher parallel die Anzahl der überlebenden Astrozyten, die LDH-Aktivität im Medium sowie die Caspase-3/7-Aktivität in 7 Tage alten astrogliareichen Primärkulturen gemessen. Wie in den früheren Versuchen wird die Zahl der überlebenden Zellen als ein Maß für den durch EPO vermittelten Schutz vor der hypoxischen Schädigung angenommen. Die LDH-Aktivität repräsentiert das Ausmaß der Zellschädigung, die Aktivität der Caspase-3/7 korreliert mit der Apoptoserate der Zellen. Die Fragestellung dieses Experiments war, ob exogen zugegebenes EPO eine antiapoptotische Wirkung auf Astrozyten unter Hypoxie ausübt. In diesem Fall müsste die Zahl der überlebenden Zellen steigen, die Aktivität der LDH als auch der Caspasen-3/7 abnehmen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in den Diagrammen 14, 15 und 16 dargestellt. In jedem Diagramm ist für jede Säule der Standardfehler des Mittelwertes eingezeichnet. Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige normoxische bzw. hypoxische Kontrolle ohne EPO. In Diagramm 14 sind die lebenden Zellen unter Normoxie und Hypoxie jeweils mit und ohne 5U EPO je ml Kulturmedium dargestellt. Die Messungen wurden mit dem ATP-Biolumineszenz-Test durchgeführt (Methoden III.7.).

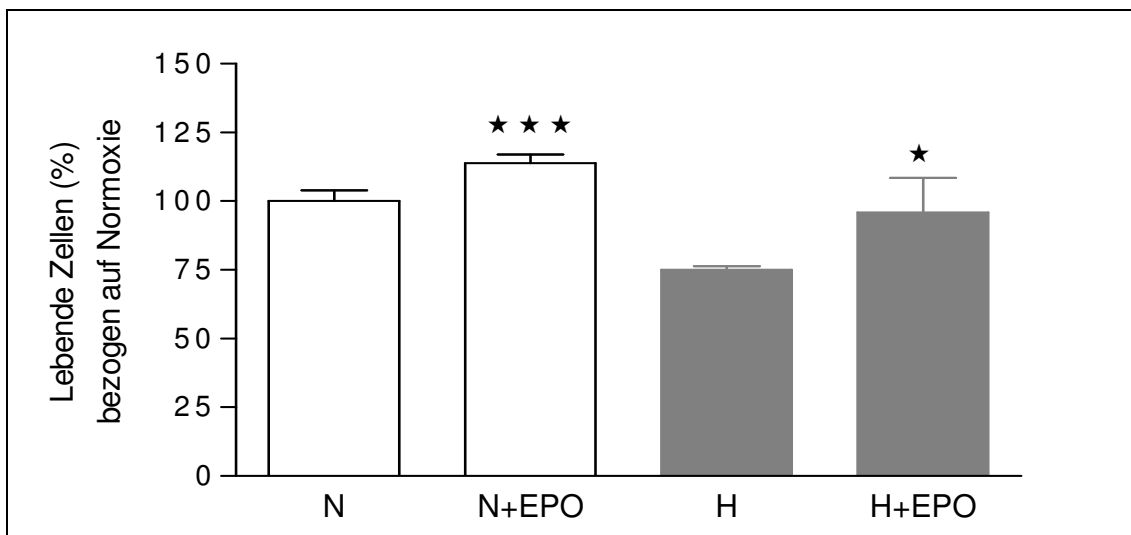


Diagramm 14 Lebende Zellen unter Normoxie und Hypoxie (48 h) mit und ohne EPO-Gabe in Prozent bezogen auf Normoxie; 7 Tage alte APK

Gibt man 5U/ml EPO zu normoxischen Kulturen, so ist hier die Zellzahl höher als bei Kulturen, die keiner exogenen EPO-Gabe ausgesetzt waren. Dies spricht für einen proliferativen Effekt von EPO, kann jedoch auch als eine

IV. Ergebnisse

Verminderung der zellkulturbedingten Zytotoxizität gewertet werden. Unter den hypoxischen Kulturbedingungen nimmt die Zellzahl gegenüber normoxischen Bedingungen deutlich ab. Bei der Gabe von 5U/ml EPO sterben jedoch unter der Hypoxie deutlich weniger Zellen ab, es überleben beinahe so viele Zellen wie unter der Normoxie. Dies kann als eindeutiger Hinweis für einen protektiven Effekt von EPO gewertet werden. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus den Experimenten in Teil IV.2.2. dieser Arbeit. Betrachtet man nun die LDH-Aktivität und die Aktivität der Caspasen-3/7 (Diagramme 15 und 16), so korrelieren die Ergebnisse mit der eben gemachten Beobachtung: Sowohl unter normoxischen wie unter hypoxischen Bedingungen sinkt die LDH-Aktivität bei den exogenen EPO-Gaben deutlich ab (Diagramm 15).

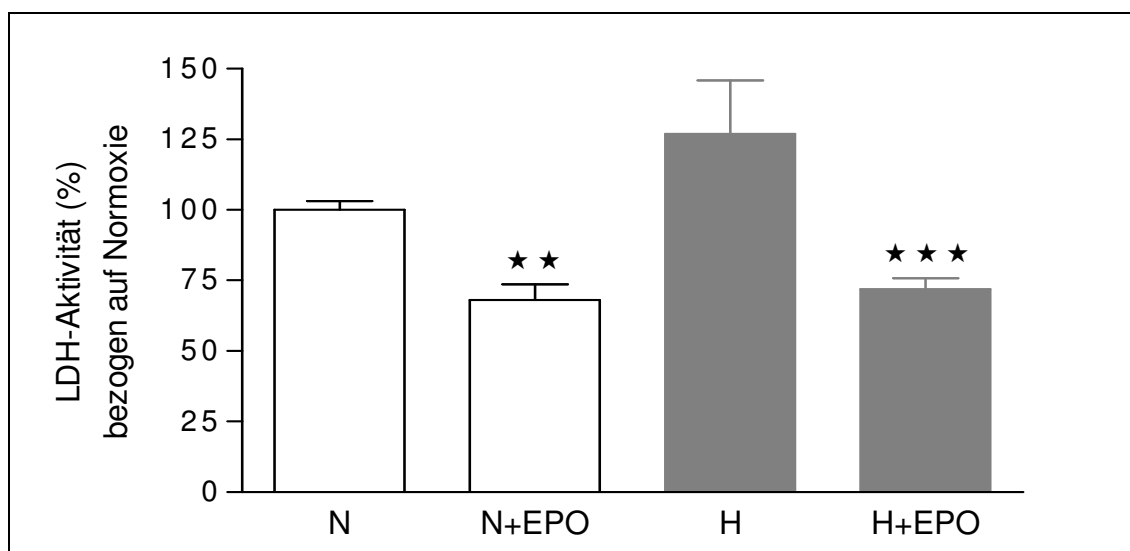


Diagramm 15 LDH-Aktivität unter Normoxie und Hypoxie (48 h) mit und ohne EPO-Gabe in Prozent bezogen auf Normoxie; 7 Tage alte APK

Dies spricht für eine geringere Schädigung der Zellen und unterstützt die These zellschützenden Effektes von EPO. Betrachtet man nun das Verhalten der Caspasen-3/7-Aktivität unter den verschiedenen Kulturbedingungen, so zeigt sich hier ein Rückgang der Caspasen-vermittelten Apoptose (Diagramm 16). Normiert man die Caspasen-3/7-Aktivität unter normoxischen Kulturbedingungen auf 100%, so zeigt sich unter der Gabe von EPO bei Normoxie keine signifikante Veränderung. Unter hypoxischen Bedingungen ohne EPO steigt die Caspasenaktivität verglichen zur Normoxie analog der Apoptosezunahme deutlich an.

IV. Ergebnisse

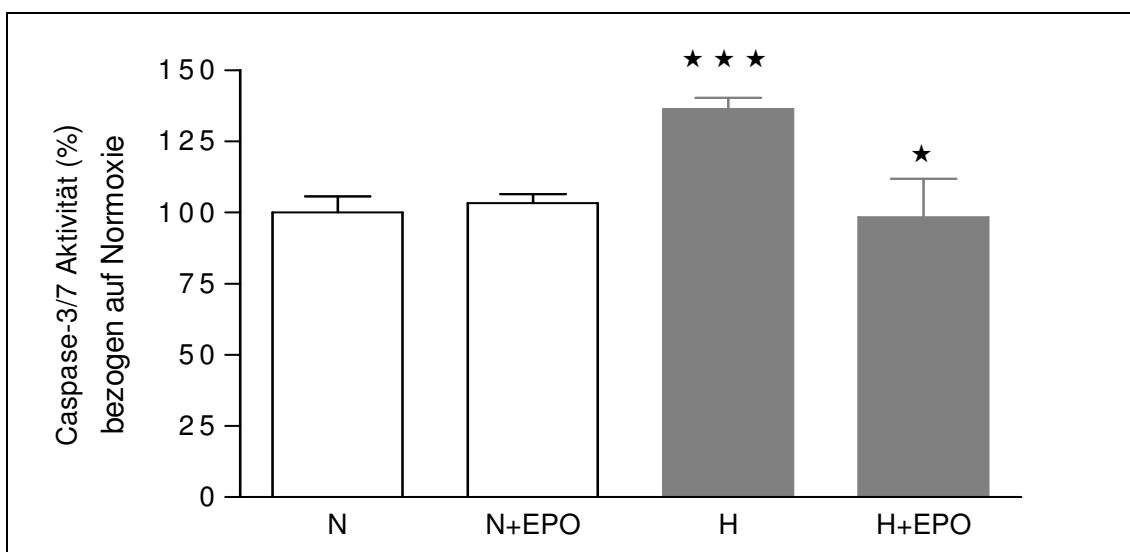


Diagramm 16 Caspasen-3/7-Aktivität in Astrozyten in Prozent unter Normoxie und Hypoxie mit und ohne EPO-Gabe

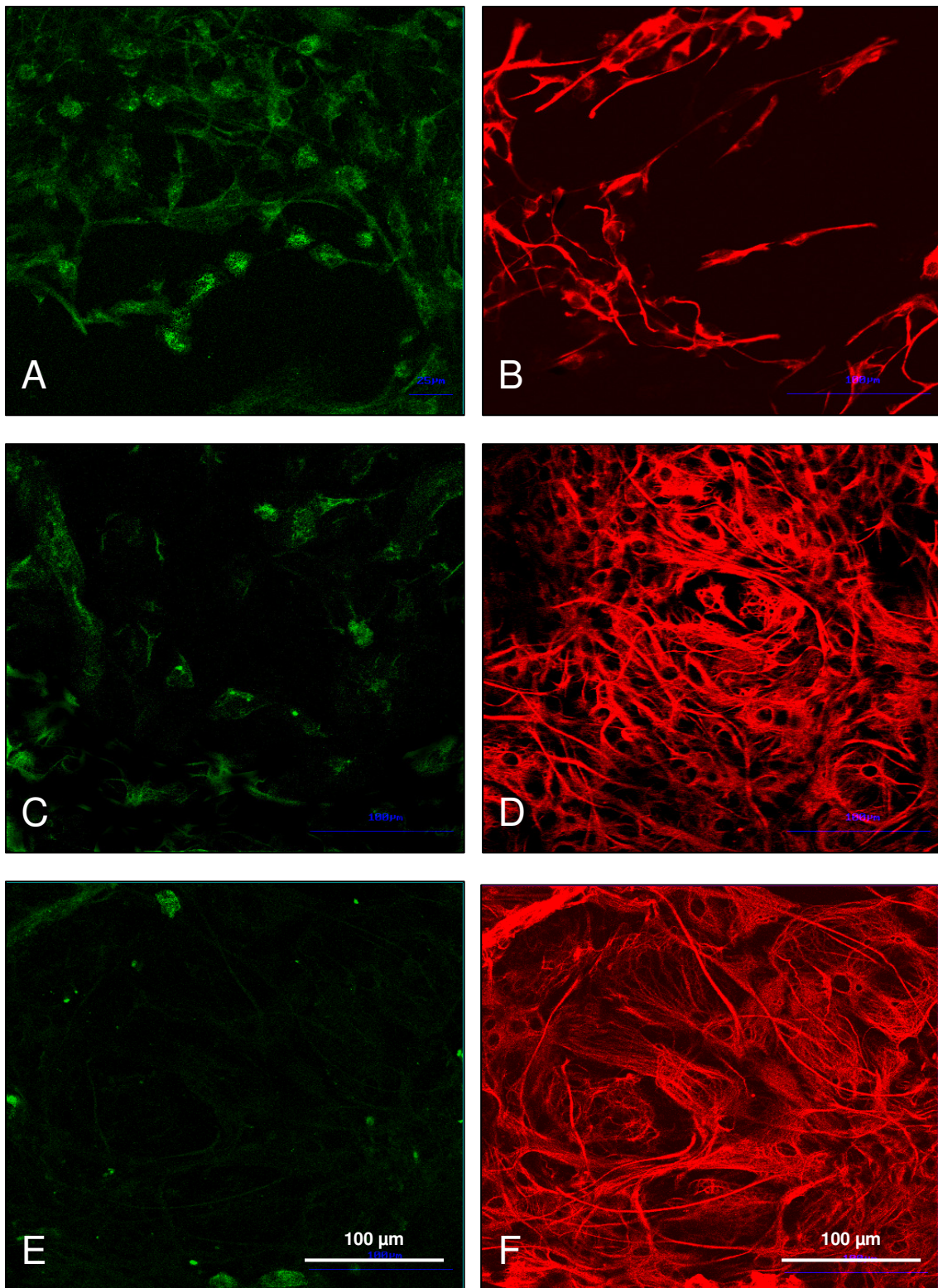
Bei Gabe von EPO (5U/ml Kulturmedium) hingegen nimmt die Aktivität der Caspasen-3/7 unter der Hypoxie-bedingten Schädigung signifikant auf das Niveau der Zellen unter Normoxie ab. Dies lässt sich ebenfalls im Sinne eines antiapoptotischen protektiven Effekts von EPO auf astrogliale Zellen werten. Welche Aussagen lassen sich aus den bisherigen Untersuchungen über Wirkungen von EPO auf Astrozyten machen?

1. EPO hat einen proliferativen Effekt auf Astrozyten: Die Zellzahl und die PCNA-Expression steigen sowohl unter normoxischen wie hypoxischen Kulturbedingungen an.
2. EPO hat einen protektiven und antiapoptotischen Effekt auf Astrozyten: Die Zellzahl steigt unter hypoxischer Schädigung bei gleichzeitiger Gabe von EPO an. Die LDH-Aktivität als Ausmaß der Zellschädigung geht unter EPO zurück, ebenso die Caspasen-3/7-Aktivität als Ausdruck des apoptotischen Zelluntergangs. Die Wechselwirkungen zwischen EPO und dem Differenzierungszustand der Zellen wird in Abschnitt IV.3. näher untersucht.

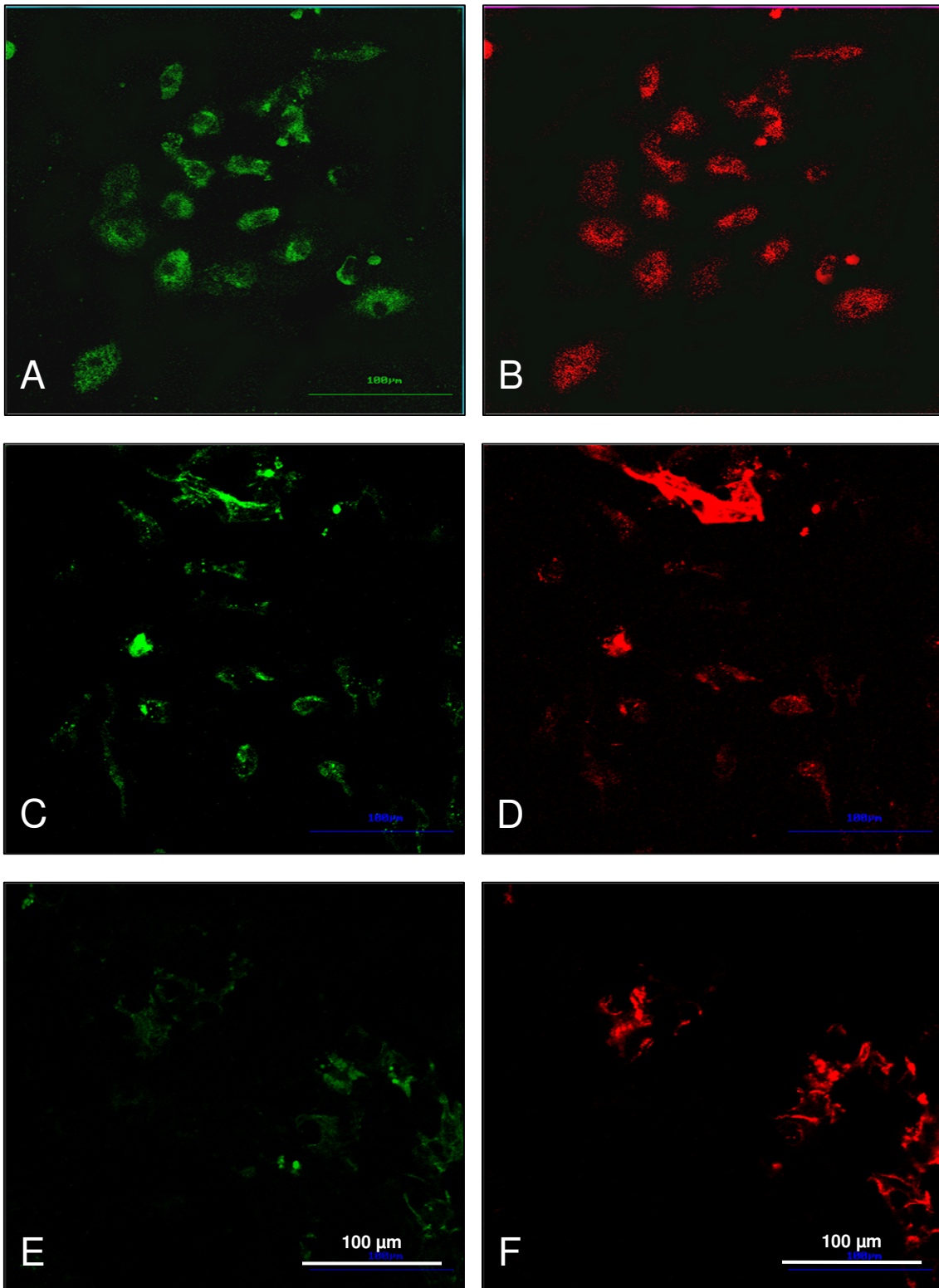
IV.3. Korrelation zwischen der EPO-Expression und dem Differenzierungszustand von Astrozyten sowie deren Ansprechen auf exogene EPO-Gabe

IV.3.1. Korrelation zwischen dem Differenzierungszustand und der astrozytären EPO-Expression

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob der Differenzierungszustand von Astrozyten einen Einfluss auf die endogene EPO-Expression hat. Dazu wurden junge, undifferenzierte Astrozyten des Kulturtages 5 mit 15 Tage alten und 21 Tage alten, ausdifferenzierten Zellen verglichen. Die Zellen des jeweiligen Kulturalters wurden auf die Expression von EPO und GFAP mittels immunzytochemischer Anfärbung untersucht. In den Abbildungen A bis F in Bildtafel 1 sind die immunzytochemisch angefärbte Expression von EPO (grün) und GFAP (rot) bei 5 Tage- (A, B), 15 Tage- (C, D) and 21 Tage alten (E, F) astrogliareichen Primärkulturen zu sehen. Am Tag 5 in Kultur zeigen Astrozyten eine starke EPO-Expression (Bild A), während sich GFAP nur gering darstellen lässt (Bild B). Die Expression von EPO in 15 Tage alten und in 21 Tage alten astroglialen Kulturen (Bilder C und E) war gegenüber dem Tag 5 geringer, hingegen stellt sich GFAP in den älteren Kulturen der Tage 15 und 21 (Bilder D und F) stärker dar. Dies bestätigt zwei Aspekte dieser Arbeit: Zum einen unterstreicht es die durchflusszytometrischen Untersuchungen aus Teil IV.1.1., dass EPO in alten Kulturen weniger exprimiert wird. Zum zweiten unterstützt es die These, dass die EPO-Produktion in Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad der Zellen steht: Je mehr GFAP die Zellen aufweisen (es handelt sich dabei um die älteren Kulturen), umso weniger EPO lässt sich auch in den immunzytochemischen Untersuchungen nachweisen. Als weiterer immunzytochemischer Marker wurde SMAA (smooth muscle α -actin) verwendet. SMAA dient als Marker für astrogliale Zellen in der Primärkultur. Zudem wird SMAA von jungen, weniger differenzierten astroglialen Zellen stärker exprimiert als von weiter ausdifferenzierten älteren Zellen. Die SMAA-Expression verhält sich damit gegenläufig zu GFAP-Expression in Astrozyten: Je jünger die Zellen, umso mehr SMAA, aber umso weniger GFAP wird exprimiert. Je älter die Zellen werden, umso weniger SMAA, aber umso mehr GFAP wird produziert.



Bildtafel 1 EPO- und GFAP-Färbungen bei Astrozyten verschiedenen Alters
Vergrößerung 40-fach; EPO grün, GFAP rot. Altersangaben der Kultur im Text



Bildtafel 2 EPO- und SMAA-Färbungen bei Astrozyten verschiedenen Alters
Vergrößerung 40-fach; EPO grün, SMAA rot. Altersangaben der Kultur im Text

Analog der Versuche in Bildtafel 1 zeigt Bildtafel 2 astrogliale Zellen, die 21 Tage lang kultiviert und an den Kulturtagen 5, 15 und 21 auf ihre EPO- und SMAA-Expression hin untersucht wurden. Es ist zu sehen, dass die jungen Zellen an Tag 5 (Bildtafel 2: Bild A und B) deutlich EPO- und SMAA positiv sind. Sie zeigen zudem einen deutlich runden Phänotyp. Betrachtet man nun die älter werdenden Kulturen (Tag 15: Bild C und D, Tag 21: Bild E und F), so nimmt sowohl die EPO-Positivität (wie auch in Bildtafel 1 gezeigt) als auch die SMAA-Expression ab. Aus diesen Versuchen lässt sich ableiten: SMAA-positive, GFAP-negative junge Zellen produzieren viel EPO. SMAA-negative, GFAP-positive Zellen ältere Zellen produzieren wenig EPO. Bei den SMAA-positiven, GFAP-negativen Zellen handelt es sich um die jungen, wenig differenzierten Zellen, bei den GFAP-positiven, SMAA-negativen um die älteren, ausdifferenzierteren Zellen. Der Differenzierungszustand astroglialer Zellen steht also in Zusammenhang mit der EPO-Expression: Je weniger differenziert die Zellen sind, umso mehr EPO produzieren sie, je weiter sie ausdifferenzieren, umso stärker geht die EPO-Expression zurück. Was geschieht nun, wenn man zu astroglialen Zellen exogenes EPO zugibt und diese auf ihren Differenzierungszustand hin untersucht? Und welche Folgen haben hypoxische Kulturbedingungen auf den Differenzierungszustand von Astrozyten? Diese Fragestellungen waren die Grundlage für die folgenden Untersuchungen.

IV.3.2. Auswirkungen von exogenem EPO auf den Differenzierungszustand von Astrozyten unter Normoxie und Hypoxie

Eine Hypothese dieser Arbeit lautete, dass die EPO-Produktion in Astrozyten in Zusammenhang mit deren Differenzierungszustand stehe. Welche Auswirkungen zeigen sich jedoch durch exogene Gabe von EPO in das Kulturmedium auf den Differenzierungszustand unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen? Um dies näher zu untersuchen, wurden Astrozyten sowohl unter Normoxie als auch unter 48-stündiger Hypoxie mit 5 U EPO/ml Kulturmedium inkubiert und anschließend immunzytochemisch gefärbt. Als Marker für die Zelldifferenzierung diente GFAP (grün), als Marker für junge, wenig differenzierte Zellen wurde Nestin (rot) angefärbt. Die Zellkerne wurden

IV. Ergebnisse

mit DAPI blau markiert. Bei Nestin handelt es sich um einen Marker, der sich sowohl in differenzierten Astrozyten als auch in undifferenzierten astrozytären und neuronalen Progenitoren findet (Lendahl et al. 1990; Koyama et al. 2003; Danielyan et al. 2003b und 2005). Die folgenden Abbildungen 11 bis 14 zeigen immunzytochemische Doppelmarkierungen mit GFAP und Nestin bei 7 Tage alten astrogliareichen Primärkulturen.

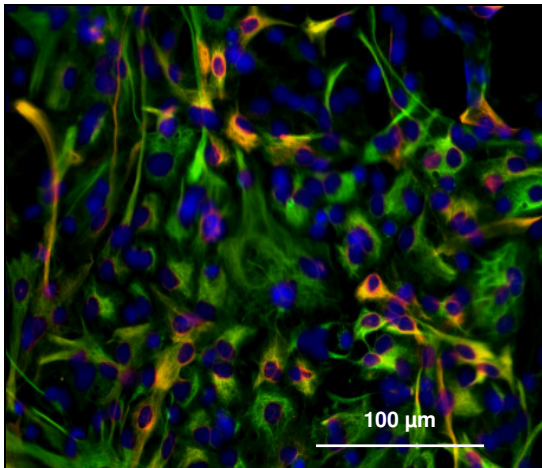


Abb. 11 Tag 7 Normoxie ohne EPO
GFAP (grün), Nestin (rot), DAPI (blau)

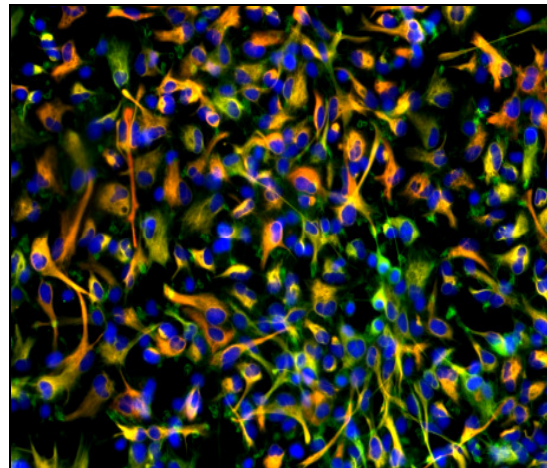


Abb. 12 Tag 7 Normoxie mit EPO
GFAP(grün), Nestin (rot), DAPI (blau)

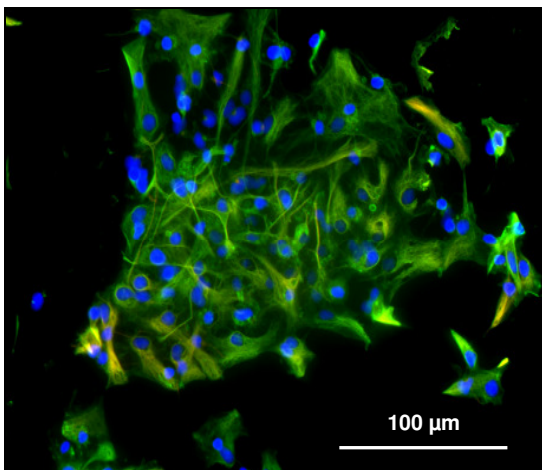


Abb. 13 Tag 7 Hypoxie ohne EPO
GFAP (grün), Nestin (rot), DAPI (blau)

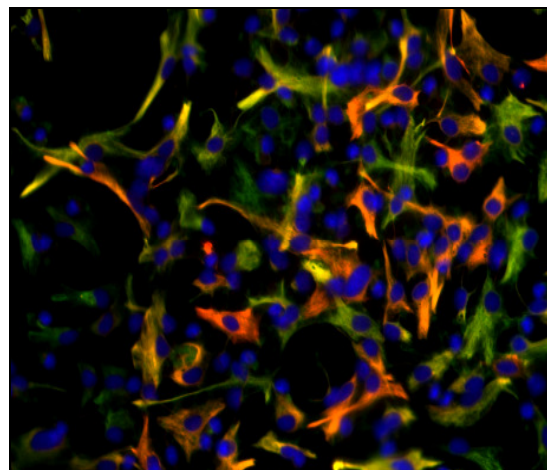


Abb. 14 Tag 7 Hypoxie mit EPO
GFAP (grün), Nestin (rot), DAPI (blau)

Betrachtet man Zellen des Kulturalters Tag 7 in einer immunzytochemischen Färbung mit Nestin und GFAP, so lässt sich Folgendes beschreiben: Unter Normoxie ist GFAP (grün) bei 7-Tage alten Zellen in Kultur stärker ausgeprägt, wenn kein exogenes EPO im Kulturmedium vorhanden ist (Abb. 11). Ist EPO im Kulturmedium vorhanden (5U pro ml), so nimmt die GFAP-Expression in der

IV. Ergebnisse

immunzytochemischen Färbung ab (Abb. 12). Die Nestin-Expression unter normoxischen Kulturbedingungen nimmt hingegen unter exogener EPO-Gabe zu (Abb. 12 zeigt mehr rote Anteile als Abb. 11). Dies lässt sich auch in der Quantifizierung belegen. Ähnlich verhält es sich bei den 7-tägigen Kulturen unter Hypoxie: Die GFAP-Expression ist unter hypoxischen Bedingungen ohne EPO stark positiv (Abb. 13) und nimmt in Kulturen mit exogen zugegebenem EPO ab (Abb. 14). Umgekehrt verhält es sich mit der Nestin-Expression: Diese ist in Kulturen unter Hypoxie ohne EPO kaum nachweisbar (Abb. 13), nimmt jedoch unter Hypoxie bei exogener EPO-Gabe stark zu (Abb. 14). Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten: Offenbar beschleunigt die Hypoxie die Differenzierung der Zellen, so dass aus dem Nestin-positiven/GFAP-negativen Phänotyp der Nestin-negative/GFAP-positive Phänotyp entsteht. EPO scheint diese beschleunigte Differenzierung zu bremsen, da, wie in Abb. 14 gezeigt, sich deutlich mehr Nestin-positive Zellen finden als in Kulturen, die ohne exogene EPO-Gabe der Hypoxie ausgesetzt waren. Betrachtet man die Anzahl der GFAP-positiven/Nestin-negativen Zellen (d.h. die Population ausdifferenzierter Astrozyten) in den Abbildungen 11 bis 14, so zeigt sich eine Abnahme der Anzahl dieser Zellen bei EPO-Gabe unter normoxischen (Abb. 12) und hypoxischen (Abb. 14) Bedingungen im Vergleich zu den normoxischen (Abb. 11) und hypoxischen Kontrollen (Abb. 13). Diese beiden Beobachtungen, dass EPO den Anteil an Nestin-positiven Zellen erhöht, den Anteil an GFAP-positiven Zellen jedoch verringert, können dafür gewertet werden, dass EPO einen proliferativen Effekt (wiedergegeben durch die Zunahme Nestin-positiver Zellen) auf Astrozyten hat und die Zelldifferenzierung (Reduktion der GFAP-Positivität) verlangsamt. Zudem lässt sich die These aufstellen, dass EPO „zellverjüngend“ wirkt, da Nestin nicht nur Marker der Proliferation ist, sondern auch als Marker für neurale Progenitoren dient. Die gleichen Versuche wie bei 7 Tage alten Kulturen wurden auch an 21 Tage alten astroglialen Zellkulturen vorgenommen. Die Abbildungen 15 bis 18 zeigen 21 Tage alte Rattenastrozyten, bei denen immunzytochemisch GFAP (grün), Nestin (rot) sowie die Kerne (DAPI, blau) markiert wurden.

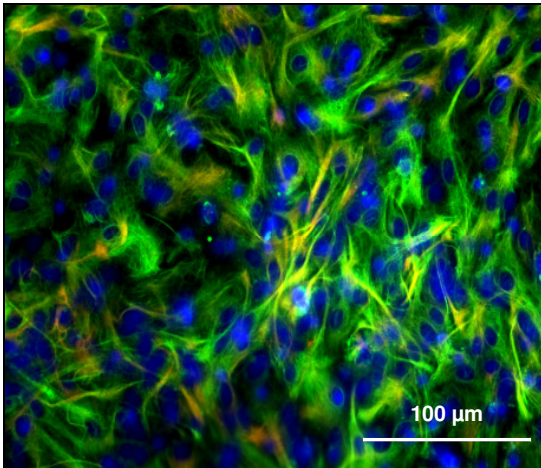


Abb. 15 Tag 21 Normoxie ohne EPO
GFAP (grün), Nestin (rot), DAPI

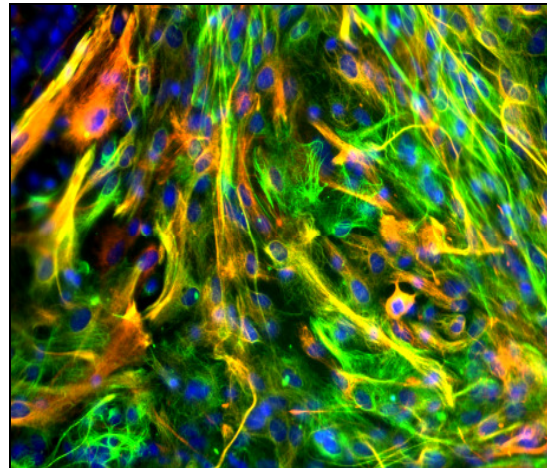


Abb. 16 Tag 21 Normoxie mit EPO
GFAP (grün), Nestin (rot), DAPI (blau)

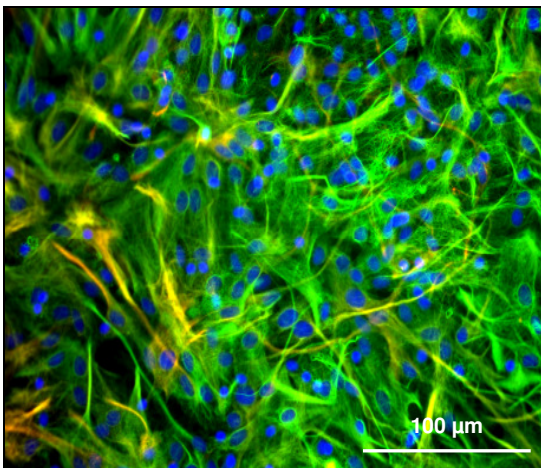


Abb. 17 Tag 21 Hypoxie ohne EPO
GFAP (grün), Nestin (rot), DAPI (blau)

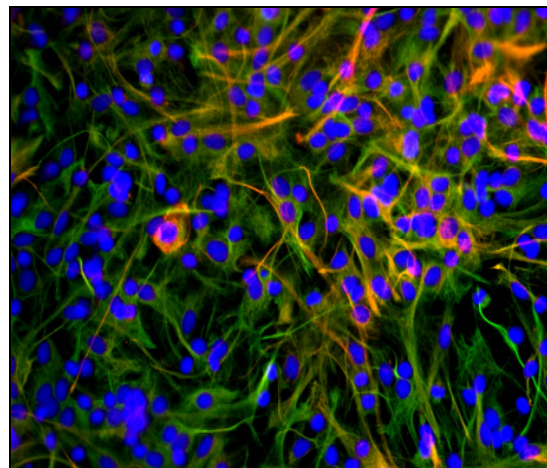


Abb. 18 Tag 21 Hypoxie mit EPO
GFAP (grün), Nestin (rot), DAPI (blau)

Allgemein lässt sich sagen: GFAP ist in den 21 Tage alten Kulturen stärker vorhanden als bei den 7 Tage alten Kulturen, die alten Kulturen sind also stärker ausdifferenziert. In den 21 Tage alten Kulturen besteht zwischen den Kulturen bei normoxischen Bedingungen ohne EPO-Gabe und den Kulturen bei normoxischen Bedingungen mit 5U EPO pro ml Kulturmedium in der GFAP-Expression immunzytochemisch kein Unterschied (vgl. Abb. 15 und 16). Ein deutlicher Unterschied in der GFAP-Expression ist hingegen bei den Kulturen bei hypoxischen Bedingungen für 24 h zu sehen: Die Kulturen unter exogener EPO-Gabe und Hypoxie exprimieren weniger GFAP (Abb. 18) als die hypoxischen Kulturen ohne exogene EPO-Gabe (Abb. 17). Betrachtet man nun die Nestin-Expression in 21 Tage alten Kulturen, so lässt sich Folgendes feststellen: Unter Normoxie ohne EPO-Gabe ist praktisch kein Nestin

IV. Ergebnisse

nachweisbar, sehr wohl jedoch bei Gabe von EPO zu den normoxischen Kulturen. Gleiches gilt für die Zellen unter hypoxischen Bedingungen: In Kulturen ohne exogenes EPO ist nur wenig Nestin vorhanden (Abb. 17), jedoch kann in Kulturen unter Hypoxie mit EPO im Kulturmedium Nestin verstärkt nachgewiesen werden (Abb. 18). Aus den oben dargestellten Untersuchungen lässt sich folgender Schluss ziehen: Exogene Gabe von EPO verringert die Expression von GFAP und erhöht den Anteil an Nestin-positiven Zellen. Dies spricht dafür, dass EPO die Differenzierung von Astrozyten verlangsamt und eine Proliferation wenig differenzierter Zellen fördert, und dies sowohl unter normoxischen wie hypoxischen Bedingungen als in jungen und alten Kulturen. Es lässt sich somit ein „zellverjüngender“ Effekt von EPO postulieren. EPO scheint neben einem proliferativen Effekt auf junge Astrozyten gleichzeitig eine differenzierungsverlangsamende Wirkung zu haben. Der proliferative Effekt auf Astrozyten zeigt sich auch, wenn man quantitativ Nestin-positiv und zugleich GFAP-positiv Zellen unter Normoxie und Hypoxie jeweils ohne exogene EPO-Gabe und mit 5U EPO pro ml Kulturmedium vergleicht (Diagramm 17).

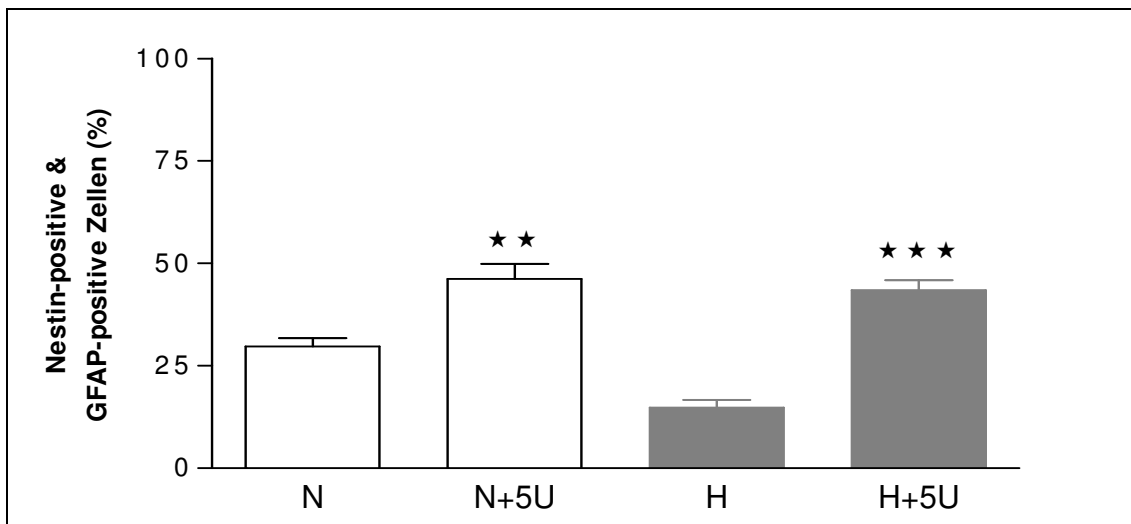


Diagramm 17 Anteil der Nestin-positiven / GFAP-positiven Zellen unter Normoxie und Hypoxie mit und ohne EPO-Gabe; 7 Tage alte APK

Sowohl bei den Kulturen unter normoxischen wie unter hypoxischen Kulturbedingungen sieht man anhand von Diagramm 17 deutlich, dass EPO einen Anstieg an Nestin-positiven/GFAP-positiven Zellen verursacht. Dies ist eine weitere Bestätigung für die These, dass EPO stärker auf die jungen Zellen (Nestin-positiv) wirkt als auf die alten Zellen und offenbar besonders unter

IV. Ergebnisse

Hypoxie auch einen protektiven Effekt hat, da der Anteil der Nestin-positiven Zellen unter Hypoxie mit 5U EPO pro ml (H+5U) gleich stark ist wie für Zellen unter normoxischen Bedingungen mit EPO-Gabe. Quantifiziert man nun die Anzahl der GFAP-positiven/Nestin-negativen Zellen (diese Population stellt ausdifferenzierte Astrozyten dar), so zeigt sich eine Minderung der GFAP-positiven Zellen (Diagramm 18).

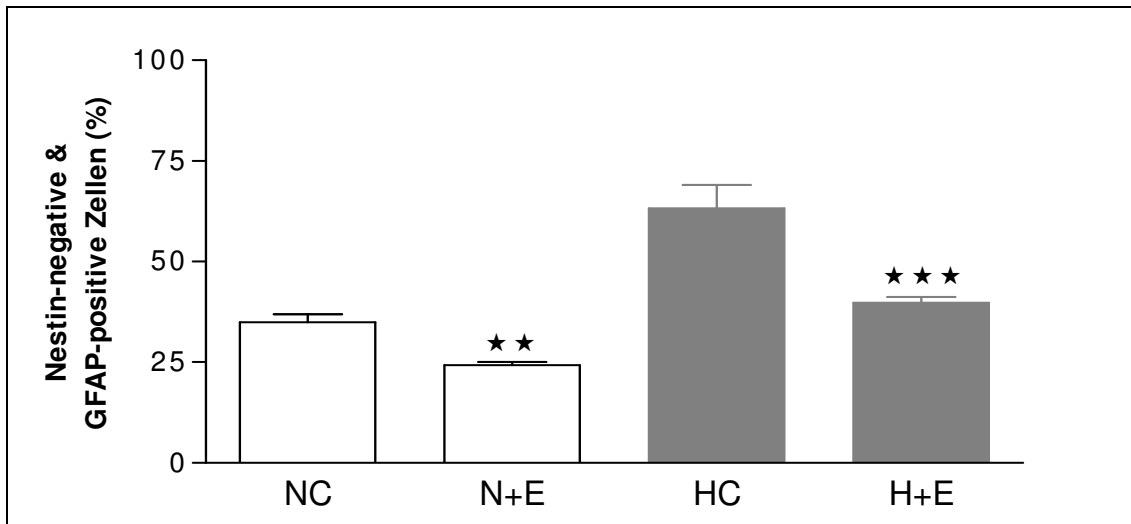


Diagramm 18 Anteil der Nestin-negativen und GFAP-positiven Zellen unter Normoxie und Hypoxie mit und ohne EPO-Gabe; 7 Tage alte APK

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Gesamtzahl der Zellen bei EPO-Gabe ansteigt, lässt sich daraus schließen, dass die Verringerung des prozentualen Anteils von GFAP-positiven/Nestin-negativen Zellen durch Steigerung des Anteils von jungen, Nestin-positiven Progenitoren, die noch keine GFAP-Expression aufweisen, zustande kommt. Zusätzlich wird der differenzierungsverlangsamende Effekt von EPO aus dem Vergleich der GFAP-Intensitäten in den Abbildungen 16 und 18 zur entsprechenden Kontrolle ohne EPO-Gabe unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen ersichtlich (Abbildungen 15 und 17). Zusammenfassend lässt sich über die Wechselwirkungen zwischen EPO und dem Differenzierungszustand von Astrozyten Folgendes sagen: Je mehr GFAP von astroglialen Zellen exprimiert wird, umso weniger produzieren sie EPO. Exogenes EPO führt in der Zellkultur zu einem veränderten Phänotyp astroglialer Zellen: Unter EPO-Gabe tritt der weniger differenzierte Nestin-positive/GFAP-negative Phänotyp verstärkt auf, wohingegen der Nestin-negative/GFAP-positive Phänotyp zurückgeht.

V. Diskussion

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von Erythropoietin auf astrogliale Zellen unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit EPO als *neuroprotektivem* Faktor, darunter Bernaudin et al. 1999; Chikuma et al. 2000; Marti et al. 2000; Siren et al. 2001a,b; Gorio et al. 2002; Ruscher et al. 2002; Chavez et al. 2006 und Liu et al. 2006. EPO wird im Gehirn jedoch nicht von Neurone, die lediglich den EPO-Rezeptor besitzen, sondern von Astrozyten produziert (Ruscher et al. 2002), weshalb EPO als autokriner Faktor von Astrozyten und parakriner Faktor zum Schutz von Neurone gesehen wird (Masuda et al. 1994; Ruscher et al. 2002; Sasaki 2003).

Die vorliegende Arbeit beschreibt das komplexe molekulare Geschehen, das sich abspielt, wenn astrogliale Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden. Die oben zitierten Arbeitsgruppen beschäftigen sich vorwiegend mit der protektiven Wirkung von EPO auf Neurone oder auf das ZNS im Allgemeinen. Wenn in diesen Arbeiten auf Astrogliazellen eingegangen wird, so wird deren Differenzierungszustand außer Acht gelassen. In vivo befinden sich jedoch alle Zellen des ZNS beim Eintreten eines ischämischen Ereignisses in einem unterschiedlichen Differenzierungszustand. Hinzu kommt, dass einige Zellen proliferieren, während andere dies zum entsprechenden Zeitpunkt nicht tun. Um daher Aussagen über Reaktionen von astroglialen Zellen machen zu können, die einen Rückschluss auf das in-vivo-Geschehen zulassen, wurden für diese Arbeit erstmals „Zeitreihenexperimente“ über drei Wochen durchgeführt. Dabei wurden die Abhängigkeiten zwischen dem Zellalter, dem Proliferations- und Apoptoseverhalten und dem Differenzierungszustand der Astrogliazellen unter normoxischen wie hypoxischen Kulturbedingungen sowohl auf die EPO-Sekretion wie auf das Ansprechen unter exogener EPO-Gabe untersucht.

Die Arbeitsgruppe um Masuda hat nach Durchsicht der üblichen Datenbanken (PubMed und Medline, Stand: Dezember 2006) als einzige weitere Arbeitsgruppe Astrogliazellen in Zusammenhang mit Erythropoietin über einen längere Zeitraum (30 Tage) kultiviert. Daher wird wiederholt auf die Ergebnisse von Masuda et al. (1994) Bezug genommen, obwohl diese Arbeitsgruppe

lediglich die EPO-Produktion astroglialer Zellen unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen untersucht hat, nicht jedoch auf mögliche apoptotische Abläufe, Proliferationsvorgänge oder Differenzierungsvorgänge eingeht. Die vorliegende Arbeit hingegen geht insbesondere auf diese Punkte ein, wobei sowohl die endogene EPO-Produktion der Zellen untersucht wurde als auch eine exogene Zugabe von EPO ins Kulturmedium. Es gibt daher sieben verschiedene Untersuchungsgrößen: 1. das Alter der astroglialen Zellen in Kultur; 2. der Differenzierungszustand der Zellen; 3. das Proliferationsverhalten der Zellen; 4. das Apoptoseverhalten der Zellen; 5. die Menge an EPO, das die Zellen selbst produzieren; 6. die Reaktion auf EPO im Kulturmedium; 7. die Kulturbedingungen (Normoxie oder Hypoxie). Die Berücksichtigung all dieser Punkte bei einer gleichzeitigen Kulturdauer von 21 Tagen und mehreren Messzeitpunkten (Tag 7, Tag 9, Tag 12, Tag 15, Tag 18 und Tag 21) ist bisher einmalig (Stand: Dezember 2006).

Es muss beachtet werden, dass die astrogliale Primärkultur bis zu etwa 10% aus anderen Zellen des Gehirns wie Oligodendrogliazellen oder Mikrogliazellen bestehen kann. Theoretisch ist es daher denkbar, dass die mittels rt-RT-PCR detektierte EPO-mRNA nicht allein von Astrozyten stammt. Für Mikrogliazellen wurde bisher jedoch lediglich der EPO-Rezeptor nachgewiesen, Oligodendrogliazellen produzieren laut einer Arbeit von Nagai et al. (2001) kein EPO (siehe auch Einleitung I.5.3.). Zwar produzieren Neurone selbst EPO, jedoch in deutlich geringerem Umfang als Astrozyten (Bernaudin et al. 2000). Neurone besitzen EPO-Rezeptoren (Masuda et al. 1994; Sasaki 2003) und gelten daher als „Erfolgsorgane“ des von Astrozyten produzierten EPOs. Neurone sollten jedoch aufgrund ihrer Größe bei der Herstellung der Primärkultur (siehe unter Methoden III.2.) „aussortiert“ werden und in der astroglialen Primärkultur nicht vorkommen, zumal sie besondere Anforderungen (u.a. Zytokine im Medium) an die Kulturbedingungen stellen und in den hier verwendeten Kulturen kaum überleben dürften. Zählt man zudem immunzytochemisch mit GFAP und DAPI gefärbte Kulturen aus, so lassen sich zu 100 DAPI-positiven Zellkernen etwa 93 bis 97 GFAP-positive Zellen zuordnen, die astrogliale Kultur besteht also zu etwa 93 – 97% aus Astrozyten

(Daten nicht gezeigt). Es wurde somit angenommen, dass das gemessene EPO (EPO im Kulturüberstand, EPO-mRNA) tatsächlich von Astrozyten stammt. Auch immunzytochemisch wurde durch die GFAP-Färbung der Nachweis erbracht, dass es sich bei den gezeigten Zellen um Astrozyten handelt, da nur Astrozyten GFAP exprimieren (McLendon und Bigner 1994; siehe auch Einleitung 1.2.2.).

1. Astrozyten produzieren EPO abhängig vom Alter der Zellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass EPO von Astrozyten altersabhängig produziert wird. Dazu wurden astrogliale Zellen 21 Tage lang kultiviert und an den Tagen 7, 9, 12, 15 und 21 auf ihre EPO-Produktion hin untersucht. Es zeigt sich: Je älter die Zellen der astroglialen Zellkultur sind, desto weniger EPO geben sie in das Kulturmedium ab. Dies wurde auf mRNA-Ebene mittels rt-RT-PCR, auf Translationsebene mittels Durchflusszytometrie und auf Sekretionsebene mittels ELISA gezeigt. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit den Untersuchungen von Masuda et al. (1994) überein: Diese Arbeitsgruppe fand einen Anstieg der EPO-Produktion ab etwa Tag 18 bis zum Tag 30 der Kultur. Ein Grund dafür könnte sein, dass diese Arbeitsgruppe die Zellkulturen aus 18 Tage alten Ratten verwendete, während für die vorliegende Arbeit Primärkulturen aus neugeborenen Ratten verwendet wurden. Zudem wurde die EPO-Produktion von der Arbeitsgruppe um Masuda lediglich mittels EPO-ELISA aus dem Kulturmedium gemessen, vor Kulturtag 18 konnte diese Gruppe unter normoxischen Kulturbedingungen überhaupt kein EPO im Kulturmedium nachweisen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde zudem keine Unterscheidung zwischen EPO-Produktion und EPO-Sekretion ins Kulturmedium gemacht. Möglicherweise liegen hier die Gründe für das abweichende Ergebnis bezüglich der EPO-Produktion in älteren Astrogliakulturen.

2. Auch unter hypoxischen Bedingungen ist die Menge an produziertem EPO abhängig vom Alter der Zellen

Astrogliale Zellen wurden auf ihre EPO-Expression unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen hin untersucht, wobei hier besonders auf Unterschiede bei verschiedenen alten Kulturen geachtet wurde. Hier lautete die

Fragestellung: Ist die EPO-Genexpression unter Normoxie und Hypoxie vom Alter der Zellen abhängig? Die Untersuchungen in Teil IV.1.2. zeigen, dass 24-stündige Hypoxie bei jungen Astrozyten des Kulturalters Tag 9 einen starken Anstieg der EPO-mRNA bewirkt. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen von Masuda et al. (1994) überein, die ebenfalls einen starken Anstieg der EPO-Produktion unter hypoxischen Kulturbedingungen beschreiben. Masuda et al. (1994) zeigen, dass der EPO-Anstieg unter hypoxischen Kulturbedingungen reversibel ist. Da Masuda et al. (1994) ihre astroglialen Kulturen anhaltend 30 Tage lang bei 5% O₂ kultivierten, nicht jedoch die Reaktionen von jungen (Tag 7) und alten Kulturen (Tag 21) getrennt untersucht haben, sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar. Zwar reagieren auch in der vorliegenden Arbeit alte Kulturen mit einem Anstieg an EPO-mRNA auf den hypoxischen Reiz, dieser Anstieg ist jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei den jungen Kulturen an Tag 7 und 12. Es lässt sich aus den Daten der Durchflusszytometrie aus dem Ergebnisteil IV.1.1., in denen sich die Zellkulturen des Tages 7 und des Tages 21 innerhalb der Kulturtage nach wenig granulierten, kleinen und stärker granulierten, großen Zellen aufteilen lassen, schließen, dass der EPO-mRNA-Anstieg unter Hypoxie in den 21-Tage alten Kulturen durch die kleinen Zellen bedingt ist, die auch in älteren Kulturen vorhanden sind. Es handelt sich bei diesen kleinen Zellen möglicherweise um neu entstandene, junge Zellen. Die EPO-Produktion in 21 Tage alten Kulturen ist also möglicherweise durch die kleinen, neu entstandenen („jungen“) Zellen bedingt. Für diese These spricht auch, dass sich unter EPO-Einfluss die Population der astroglialen Zellen zu einem weniger differenzierten, Nestin-positiv/GFAP-negativen Phänotyp hin verschiebt (siehe auch Teil IV.3.2. Diagramm 17 und 18 sowie Diskussion V.5.). Die Untersuchungen zur endogenen EPO-Expression von Astrozyten unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen zeigen, dass Hypoxie einen Reiz für astrogliale Zellen darstellt, vermehrt EPO zu produzieren. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Literatur (Marti et al. 1996; Masuda et al. 2002; Liu et al. 2006). Die vermehrte EPO-Expression unter Hypoxie ist dabei bei jungen Zellen des Kulturtages 7 deutlich stärker ausgeprägt als bei älteren Zellen der Kulturtage 15 und 21. Es lässt sich

postulieren, dass EPO von jungen astroglialen Zellen als Schutz gegen die hypoxische Schädigung produziert wird (Danielyan et al. 2003c). Generell gilt, dass von der Ebene der Genexpression nicht ohne weiteres auf die Proteinebene geschlossen werden kann. Wird ein Gen abgelesen, ist das Transkriptionsprodukt die mRNA. Die Basenabfolge der mRNA wird im Translationsschritt in eine Abfolge von Aminosäuren übersetzt. Die Aminosäurekette wird während der Proteinreifung zum „fertigen“ Protein modifiziert. Mittels Exozytose wird das Protein aus der Zelle transportiert. Stark vereinfacht gilt:

Gen → mRNA → Protein intrazellulär → Protein-Ausschüttung aus der Zelle

Auf jeder Stufe der Informationsweitergabe vom Gen zum Gen-Endprodukt können die molekularen Mechanismen reguliert werden. Das Gen muss nicht zwangsläufig transkribiert werden. Die mRNA kann, anstatt translatiert zu werden, wieder abgebaut oder auch gespeichert werden. Das Gleiche gilt für das reife Protein: Dieses muss nicht direkt nach „Fertigstellung“ auch aus der Zelle geschleust werden, sondern kann intrazellulär gespeichert bleiben. Aus dem eben Dargestellten leitet sich ab, dass von der Gen- und Proteinexpressionsebene nicht auf die Sekretion geschlossen werden kann. Um nicht nur die Transkriptions- und Translationsebene für EPO zu untersuchen, sondern um zu zeigen, dass EPO auch sezerniert wird, wurde die EPO-Sekretion in das Kulturmedium untersucht. Es zeigt sich auch bei der Untersuchung der EPO-Sekretion eine Abhängigkeit der extrazellulären EPO-Konzentration vom Zellkulturalter unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Für die Sekretionsebene gilt: Je älter die Zellen sind, desto weniger sekretieren sie EPO unter normoxischen Bedingungen, aber desto stärker reagieren sie bei hypoxischen Reizen mit einer vermehrten EPO-Sekretion. Wie oben bereits festgestellt, stimmt dieses Ergebnis nicht mit den Ergebnissen von Masuda et al. (1994) überein.

3. Die Rolle von EPO bei der Proliferation von Astrozyten

Wenn bei endogenem, von astroglialen Zellen gebildetem EPO mehr Zellen unter hypoxischen Kulturbedingungen überleben, so lässt sich die These aufstellen, dass auch exogen dem Kulturmedium zugegebenes EPO

Auswirkungen auf die Zellzahl und auf die Proliferation von Astrozyten haben könnte. Deshalb wurden Experimente durchgeführt, in denen astrogliale Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen EPO-Konzentrationen zwischen 0,01U und 10U pro ml Kulturmedium ausgesetzt waren (vgl. Ergebnisse IV.2.1.). Dabei zeigte sich, dass EPO sowohl unter normoxischen wie hypoxischen Kulturbedingungen die Zellzahl erhöht, und zwar sowohl bei 7 als auch bei 21 Tage alten Kulturen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß: bei 21 Tage alten Kulturen ist bei Gabe von EPO zum Kulturmedium der Anstieg der Zellzahl ausgeprägter als am Tag 7. Der in dieser Arbeit beschriebene proliferative Effekt von EPO steht in Übereinstimmung u.a. mit den Ergebnissen von Ruscher et al. (2002). Hinsichtlich unterschiedlicher EPO-Konzentrationen im Kulturmedium (zwischen 0,01U und 10U pro ml Medium) bestand in der vorliegenden Arbeit unter normoxischen Kulturbedingungen kein Unterschied bezüglich eines proliferativen Effekts. Unter hypoxischen Kulturbedingungen hingegen wurde die höchste Zellzahl bei einer EPO-Konzentration von 5U je ml Kulturmedium beobachtet. Ruscher et al. (2002) benutzten für ihre Versuche EPO-Konzentrationen von 1U, 10U und 100U pro Liter Kulturmedium, also wesentlich geringere Dosierungen als in der vorliegenden Arbeit. Vairano et al. (2002) benutzten für ihre Versuche EPO-Konzentrationen zwischen 100pM und 10nM. Während Ruscher et al. (2002) EPO als neuroprotektiven Faktor sehen, der lediglich von Astrozyten produziert wird, jedoch ohne näher auf eine mögliche Protektion von Astrozyten selbst einzugehen, sehen Vairano et al. (2002) EPO als parakinen Faktor von Astrozyten zum Schutz vor Hypoxie. Es ist zu beachten, dass zwischen einem proliferativen Effekt und einem antiapoptotischen Effekt (insbesondere bei hypoxischen Bedingungen) unterschieden werden muss: So könnte eine höhere Zellzahl vor allem unter hypoxischen Bedingungen durch eine proliferative Wirkung (von EPO, aber auch durch die Hypoxie) zustande kommen, jedoch auch durch einen möglichen antiapoptotischen Effekt, der die Zahl der absterbenden Zellen verringert. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Unterscheidung durch Nachweis von PCNA als Proliferationsmarker einerseits und LDH, TUNEL und Caspase-3/7 als Marker für Zelluntergang und Apoptose

andererseits möglich. Dass EPO einen proliferativen Effekt auf astrogliale Zellen hat, wird auch durch die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen dieser Arbeit unterstützt, da gezeigt wird, dass Zellen unter EPO-Gabe deutlich mehr PCNA als Marker der Proliferation exprimieren und dies sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Zudem wurde die PCNA-Expression mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messungen bei den verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht: Es wurden 7 Tage alte Kulturen mit 21 Tage alten Kulturen jeweils unter Normoxie und Hypoxie und jeweils mit und ohne EPO-Gabe verglichen. Hinzu kommt der Vorzug der Durchflusszytometrie, die Zellen an den einzelnen Kulturtagen in kleine, wenig granulierte und große, stark granulierte Zellen auftrennen zu können. In diesen Experimenten zeigte sich, dass EPO den Anteil PCNA-positiver Zellen sowohl unter Normoxie wie unter Hypoxie erhöht. Dabei zeigt sich, dass EPO besonders auf die kleinen, wenig granulierten Zellen zu wirken scheint, insbesondere an Tag 21, da sich hier der Anteil der PCNA-positiven Zellen zu den kleineren, weniger granulierten Zellen hin verschiebt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse bei normoxischen und hypoxischen Bedingungen wurde die These gestärkt, dass EPO einen proliferativen Effekt auf Astrozyten ausübt. Dies wurde u.a. von Danielyan et al. (2003a) publiziert. Hinzu kommt, dass Nestin-positive/GFAP-negative junge astrogliale Zellen unter EPO-Gabe sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie vermehrt zu finden waren und dass es unter hypoxischen Bedingungen sogar zu einem Anstieg dieser Nestin-positiven Zellen kommt (Danielyan et al. 2003b). Diese Beobachtungen legen nahe, dass der protektive Effekt von EPO nicht nur auf einem verstärkten Überleben von Astrozyten beruht, sondern dass es durch Proliferation zur Bildung einer neuen Generation von jungen Zellen, die Nestin-positiv und GFAP-negativ sind, kommt (Danielyan et al. 2003c und Danielyan et al. 2006).

4. EPO als antiapoptotischer Faktor für Astrozyten

Lässt sich für EPO neben einem proliferativen Effekt auch eine antiapoptotische Wirkung postulieren? Antiapoptotisch würde bedeuten, dass EPO die Zellen vor einer Art „Selbstabschaltung“ bewahren würde. Nun gibt es jedoch als Formen des Zelltodes, wie in der Einleitung beschrieben, nicht nur die Apoptose,

sondern auch die Nekrose. Diese Arbeit wurde mit dem Ansatz durchgeführt, u.a. das Apoptoseverhalten von Astrozyten bei verschiedenen Kulturbedingungen und bei verschiedenen alten Zellen zu untersuchen. Aufgrund der Detektionsverfahren zur Untersuchung apoptotischer Prozesse (TUNEL-Färbungen, Caspase-3/7-Assay) werden jedoch die Zellen, die nicht auf apoptotischem Weg absterben, sondern nekrotisch werden, nicht erfasst. Ähnliche Überlegungen finden sich in der Literatur (Vairano et al. 2002). Es ist bis jetzt nicht bekannt und muss daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bleiben, zu welchem Anteil Astrozyten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen durch Nekrose absterben. In den immunzytochemischen Versuchen wurden parallel die TUNEL-Reaktion als Apoptose-Marker und PCNA als Marker der Proliferation angefärbt. Dies wurde für normoxische und hypoxische Kulturbedingungen bei 7 Tage und 21 Tage alten Zellen durchgeführt. Der einen Hälfte der Kulturen stand exogenes EPO (5U pro ml Kulturmedium) zur Verfügung, der anderen Hälfte nicht. Es bestätigt sich hier der antiapoptotische Effekt von EPO: Unter Gabe von EPO geht an beiden Kulturtagen (Tag 7 und Tag 21) die TUNEL-Reaktion sowohl unter den normoxischen wie unter den hypoxischen Kulturbedingungen zurück. Daraus lässt sich ein antiapoptotischer Effekt von EPO auf astrogliale Zellen ableiten. In einem weiteren Versuchsansatz wurden Astrozyten unter normoxischen wie hypoxischen Kulturbedingungen bei exogener EPO-Gabe und ohne EPO-Gabe parallel auf ihre Zellzahl, die LDH- sowie die Caspasen-3/7-Aktivität im Kulturmedium hin untersucht (vgl. Ergebnisse IV.2.5.). Es zeigt sich in diesen Experimenten, dass bei EPO-Gabe die Caspasen-3/7-Aktivität und die LDH-Aktivität im Medium bei hypoxisch geschädigten Zellen signifikant geringer ist als bei Kulturen ohne EPO-Gabe. Die Zellzahl liegt bei Kulturen mit EPO-Gabe höher als in den Kulturen ohne EPO-Gabe. Diese Beobachtungen gelten sowohl unter Normoxie wie unter Hypoxie (Danielyan et al. 2003a). Auch in diesen Untersuchungen bestätigt sich ein antiapoptotischer Effekt (die LDH- und Caspasen-3/7-Aktivitäten gehen bei Gabe von EPO und unter hypoxischen Bedingungen zurück). Zusammenfassend kann gesagt werden: Die Versuche zur Zellzahl und zur Caspasen-3/7-Aktivität belegen, dass EPO über die

Signalkaskade der Caspasen einen antiapoptotischen Einfluss auf Astrozyten ausübt und die Gesamtanzahl lebender Zellen unter hypoxischen Bedingungen steigert. Die Experimente zur Messung der LDH-Aktivität unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen zeigen eine Abnahme der LDH-Aktivität unter EPO-Gabe bei Zellen unter Hypoxie. Die LDH-Aktivität gibt das Ausmaß der Zellzerstörung wieder. Die LDH tritt bei Zellschäden aus den Zellen in das Kulturmedium über, ihre Aktivität im Kulturmedium kann daher als Maß für die Zellschädigung herangezogen werden. In den Experimenten wurden die Zellen durch die hypoxischen Kulturbedingungen geschädigt. Eine sehr schwere Zellschädigung, die nicht nur die Plasmamembran, sondern auch die Mitochondrien betrifft und somit über LDH-Aktivitätsmessungen nicht erfasst wird, tritt bei Hypoxie in Astrozyten (im Gegensatz zu Neurone) vermutlich nicht auf (Almeida et al. 2002). Die Abnahme der LDH-Aktivität bei Zellen unter Hypoxie und gleichzeitiger EPO-Gabe spricht für eine durch EPO bedingte Minderung der Hypoxie-assoziierten Zytotoxizität und für einen antiapoptotischen Effekt von EPO. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zur antiapoptotischen Wirkung von EPO stehen in Übereinstimmung mit der Literatur, hier fanden verschiedene Arbeitsgruppen einen antiapoptotischen Effekt von EPO auf Astrozyten (Ruscher et al. 2002; Vairano et al. 2002), während Sinor und Greenberg bei einer EPO-Konzentration von 30 pM zwar einen Rückgang des durch Hypoxie und Glukoseentzug bedingten Zelltods bei Neurone finden, nicht jedoch bei Astrozyten. Diese Arbeitsgruppe hatte jedoch für die Experimente die astroglialen Kulturen bei 0% O₂, 5% CO₂ und 95% N₂ sowie ohne jede Glukose im Kulturmedium für 48 h inkubiert, so dass das abweichende Ergebnis durch die anderen Experimentbedingungen zustanden kommen könnte. Der antiapoptotische Effekt von EPO auf hämatopoetische Zellen im Knochenmark ist seit längerem bekannt (Koury und Bondurant 1990). Ebenfalls antiapoptotisch wirksam zeigt sich EPO auch auf Motoneurone bei experimenteller ischämischer Rückenmarksschädigung (Celik et al. 2002). Es findet sich also eine antiapoptotische Wirkung von EPO bei verschiedenen Geweben (Knochenmark, Motoneurone) auch außerhalb des ZNS. Da sich in

der Literatur keine weiteren Untersuchungen mit EPO und Astrozyten finden, die antiapoptotische oder proliferative Wirkungen von EPO bei verschiedenen alten Kulturen untersucht haben, können die in dieser Arbeit vorliegenden Experimente bei Abschluss der Arbeit im Dezember 2006 nicht direkt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden.

5. Die Abhängigkeit der EPO-Produktion in Astrozyten von ihrem Differenzierungszustand

Ähnlich wie unter Punkt V.3. für die Proliferation beschrieben, verhält es sich mit dem Einfluss des Differenzierungszustandes von Astrozyten und der EPO-Produktion. Anhand der immunzytochemischen Färbungen lässt sich zeigen, dass EPO von Astrozyten, die viel GFAP exprimieren, deutlich weniger produziert wird als von Astrozyten, die kaum GFAP besitzen. Da GFAP ein Differenzierungsmarker für Astrozyten ist, lässt sich aus dieser Beobachtung ableiten, dass stärker ausdifferenzierte Zellen (in der Regel die älteren Zellen aus 21 Tage alten Kulturen) weniger EPO bilden (Schneider et al. 2003). Die Produktion von EPO steht also in Zusammenhang mit dem Alter der Zellen. So produzieren junge, wenig differenzierte (SMAA-positive/GFAP-negative) astrogliale Kulturen mehr EPO als ältere, weiter ausdifferenzierte (SMAA-negative) Kulturen. Ältere Kulturen reagieren auf hypoxische Reize sensitiver und mit einer verstärkten endogenen EPO-Sekretion. Wie früher angemerkt, deckt sich dies nicht mit den Ergebnissen von Masuda et al. (1994), die erst ab Tag 18 eine EPO-Produktion ihrer astroglialen Kulturen nachweisen können (zur näheren Diskussion dieser Differenz siehe S.103). Die stärkere Ausprägung von GFAP mit dem Altern der astroglialen Zellen wurde bei der Ratte von Sabbatini et al. 1999 beschrieben.

Vergleicht man Zellpopulationen des Kulturalters Tag 21 unter 48-stündiger Hypoxie ohne EPO-Gabe (siehe Ergebnisse IV.2.2., Abb. 9) mit solchen unter 48-stündiger Hypoxie und 5U EPO pro ml Kulturmedium, so sind die Zellen, die der Hypoxie ohne EPO ausgesetzt waren, sehr viel stärker GFAP-positiv als Zellen, denen EPO im Kulturmedium zur Verfügung stand. Derselbe Sachverhalt findet sich auch für Zellen des Kulturtages 7. EPO, das dem Kulturmedium zugegeben wurde, bewirkt also, dass astrogliale Zellen weniger

GFAP exprimieren. Dies bedeutet, dass EPO den Anteil an GFAP-positiven Zellen verringert, also einen die Differenzierung verlangsamenden Effekt aufweist. Würde die GFAP-Abnahme durch eine Abnahme der Zellzahl erfolgen, so müsste im Gegenzug die LDH-Aktivität proportional zu den abgestorbenen Zellen ansteigen. Dies ist nicht der Fall, wie in den Versuchen zur LDH-Aktivität im Kulturmedium unter Normoxie und Hypoxie gezeigt wurde (vgl. Ergebnisse IV.2.1. und IV.2.2.). Da zudem die gezeigten Dosiswirkungskurven für EPO in Bezug auf die LDH-Freisetzung und Anzahl lebender Zellen keine toxische Wirkung von EPO aufweisen, lässt sich annehmen, dass EPO ein „Verjüngungsfaktor“ für Astrozyten ist, indem es die Ausprägung des Nestin-positiven/GFAP-negativen Phänotyps von Astrozyten fördert. Das Altern der astroglialen Kultur geht mit der Ausdifferenzierung der Zellen einher (Danielyan et al. 2003a). EPO spielt dabei eine Rolle im Wachstums- und Differenzierungsverhalten von Astrozyten, wie die Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt haben. Die Untersuchungen der GFAP- sowie der Nestin-Expression mittels Immunzytochemie deuten darauf hin, dass EPO eine die Differenzierung verlangsamende Wirkung auf Astrozyten ausübt. So wird GFAP sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie in Zellen, denen EPO zur Verfügung steht, weniger stark ausgeprägt als bei Zellen, die nicht exogen zugegebenem EPO ausgesetzt waren (Schneider et al. 2003). Hier konnte dann gezeigt werden, dass EPO auch als verlangsamender Faktor auf die Differenzierung von Astrozyten wirkt. Genau reziprok verhält es sich mit der Ausprägung von Nestin. Waren die Zellen unter Normoxie und Hypoxie exogenem EPO ausgesetzt, so stieg der Anteil an Nestin-positiven Zellen deutlich an. Dies wurde als Zeichen nicht nur eines vermehrten Überlebens der jungen Zellen, sondern auch als Zeichen für deren Proliferation unter EPO-Gabe gewertet. Junge Astrozyten entstehen aus Gehirn-spezifischen Vorläuferzellen, die sich gewöhnlich in den aus Rattenhirnen stammenden Primärkulturen finden (Danielyan et al. 2003a). Von jungen, Nestin-positiven Zellen ist bekannt, dass sie eine Vielzahl verschiedener Faktoren bilden, die wichtig für die Zellregeneration sind, so z.B. Kollagen Typ I, HGF, TGF- β , Vertreter der STAT-Proteine (Chong et al. 2002). Daher repräsentieren die

EPO-induzierten Mechanismen bei der Entstehung junger Zellen einen effektiven Schutz für Zellen des ZNS, darunter auch Neurone (Siren et al. 2001b; Dawson 2002).

VI. Zusammenfassung

Fasst man die komplexen Wirkungen von EPO auf Astrozyten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zusammen, lässt sich sagen:

1. Astrozyten produzieren Erythropoietin. Die endogene EPO-Produktion ist dabei altersabhängig: 7 Tage alte astrogliale Zellen produzieren mehr EPO als 21 Tage alte Kulturen.
2. Astrozyten verschiedenen Kulturalters reagieren unterschiedlich auf hypoxische Kulturbedingungen. So weisen 7 Tage alte Kulturen eine höhere Resistenz gegenüber hypoxischen Bedingungen auf als ausdifferenzierte Kulturen. Bei 24-stündiger Hypoxie ist die EPO-Produktion der Zellen an allen Kulturtagen gegenüber den Zellen unter Normoxie gesteigert. Dies spricht dafür, dass EPO für die Kompensation von hypoxischen Zuständen eine wichtige Rolle spielt.
3. Ältere Zellen des Kulturtages 21 reagieren sensitiver auf hypoxische Reize und zeigen eine verstärkte EPO-Sekretion. Möglicherweise entsteht diese Wirkung durch neu entstandene Zellen in der alten Kultur, da die Ausdifferenzierung mit einer EPO-Abnahme verbunden ist (siehe Punkt 8).
4. Bei Apoptose-induzierender Hypoxiedauer (48 h bei 1% O₂) steigt sowohl die endogene EPO-mRNA-Expression als auch die Freisetzung von EPO aus den Zellen. Die Quantifizierung von EPO im Zellkulturüberstand und ein Vergleich zwischen der Normoxie und der Hypoxie mittels ELISA bestätigen dies.
5. Eine Konzentration von 5U EPO je ml Kulturmedium hat einen proliferativen Effekt auf Astrozyten. In den Untersuchungen unter hypoxiebedingtem Stress und normoxischen Standardbedingungen lässt sich mittels immunzytochemischer Färbung von PCNA für die Konzentration von 5U EPO pro ml Medium ein proliferativer Effekt zeigen. Dabei bewirkt EPO eine Zunahme an PCNA-positiven Zellen. EPO hat einen proliferativen Effekt auf Astrozyten, zu sehen am Zellzahlzuwachs unter normoxischen Bedingungen

zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen sowie am Ausmaß der PCNA-positiven Zellen.

6. Unter Gabe von EPO sterben weniger Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Wenn EPO mit einer Konzentration von 5U pro ml Kulturmedium zu den Zellen gegeben wird und diese Kulturen hypoxischen Zuständen ausgesetzt werden, so überleben mehr Zellen die Schädigung als ohne Zusatz von EPO.
7. EPO wird bei SMAA-positiven Zellen stärker gebildet als bei SMAA-negativen Zellen. Bei aktiviertem, undifferenziertem Zustand (SMAA-Positivität) steigt die Expression von EPO in Astrozyten.
8. Stark GFAP-positive Zellen bilden weniger EPO. Die bisherigen Messungen lassen den Schluss zu, dass die EPO-Produktion nachlässt, je weiter die Zellen ausdifferenzieren (GFAP wird mit zunehmendem Differenzierungsgrad hochreguliert, EPO hingegen herunterreguliert).
9. Es besteht eine negative Beziehung zwischen der endogenen EPO-Produktion und der Ausprägung von GFAP. Ebenfalls in immunzytochemischen Färbungen zeigt sich, dass der Differenzierungsmarker GFAP negativ mit der endogenen EPO-Expression korreliert. Je älter die Zellen werden, desto weniger EPO und desto mehr GFAP exprimieren sie.
10. EPO hat einen die Differenzierung verlangsamende Wirkung auf Astrozyten und bewirkt eine stärkere Ausprägung von Nestin-positiven Zellen. EPO hat daher möglicherweise einen „zellverjüngenden“ Effekt auf die Astrozytenpopulation, da Vorläuferzellen vermehrt entstehen.

VII. Schlussbetrachtung

EPO als Therapeutikum zur Neuroprotektion

Da rekombinant hergestelltes EPO (rHuEPO) sich seit mehr als 20 Jahren als sicheres und effizientes Mittel in der Therapie der renalen Anämie erwiesen hat (Adamson 1996), wird in rHuEPO inzwischen auch eine Möglichkeit zur Therapie zerebraler Ischämien gesehen (Siren et al. 2001). Da das EPO, das von den Nieren produziert wird und über den Kreislauf die erythropoetischen Stammzellen anregt, jedoch aufgrund der Bluthirnschranke nicht ins Zentralnervensystem gelangt und dort auch keine Effekte entfaltet, wurde der klinische Einsatz bei der Therapie zerebraler Ischämien lange diskutiert. Befürworter sehen in der Bluthirnschranke keinen limitierenden Faktor, da bei anhaltender zerebraler Ischämie diese als nicht mehr intakt gilt (Ehrenreich und Siren 2001; Ehrenreich et al. 2002; Siren et al. 2001a,b) und dann EPO aus der Blutbahn ins ZNS gelangen kann: EPO passiert in vivo die Blut-Hirn-Schranke, insbesondere unter krankheitsbedingten Störungen derselben (Cerami et al. 2001; Brines et al. 2002). Die erste Studie zum klinischen Einsatz von EPO bei Schlaganfallpatienten brachte eine deutliche Besserung der klinischen Symptomatik (Ehrenreich et al. 2002), und auch im Tiermodell zeigte sich die Therapie mit EPO als erfolgreich: Eine Arbeitsgruppe zeigte einen Rückgang experimentell erzeugter Hirnschädigungen an Tieren um 50 - 70% unter EPO-Gabe bis zu sechs Stunden nach der Schädigung (Brines et al. 2002). Es kann daher vermutet werden, dass EPO, sollte sich unter dieser Indikation nicht eine bisher unbekannte schwerwiegende Nebenwirkung zeigen, zukünftig auch für die Indikation „Schlaganfall“ genutzt werden kann. EPO hat sich im klinischen Alltag als effektiv und nebenwirkungsarm für Patienten erwiesen. Für eine Kanzerogenität von EPO gibt es beispielsweise keine Hinweise, eine Untersuchung von Berdel et al. (1991) an 22 verschiedenen Tumorzelllinien auf einen proliferativen Effekt von EPO verlief für alle Tumorzelllinien negativ. Ebenso ist außer der in der Einleitung erwähnten Hypertension unter hohen Dosierungen keine gravierende Nebenwirkung beschrieben. Bisher existiert in der Therapie von Schlaganfällen auf molekularer Ebene keine kausale

VII. Schlussbetrachtung

Therapiemöglichkeit, sondern es kann lediglich symptomatisch behandelt werden. Zugrundegegangenes Hirngewebe kann sich dabei praktisch nicht regenerieren, sieht man von den entstehenden Gliazellen und Umbauprozessen ab. Die zerebralen Defekte, die sich bei den betroffenen Menschen von der Einbuße motorischer und sensorischer Fähigkeiten bis hin zu emotionalen und charakterlichen Veränderungen zeigen und in den meisten Fällen irreversibel sind, bedeuten nicht nur für den Patienten und seine Angehörigen großes menschliches Leid. Ein nicht unerheblicher Teil der Kosten im Gesundheitswesen wird für die Rehabilitation und Pflege dieser Patienten aufgewandt, ohne dass eine Heilung möglich ist. Aus diesen Gründen ist die Suche nach grundlegenden therapeutischen Möglichkeiten eine wichtige und für die Patienten nutzbringende Angelegenheit. Vielleicht bietet sich mit EPO eine Möglichkeit, die geringe Ischämietoleranz des menschlichen Gehirns zu verbessern und so die Folgen ischämischer Ereignisse einzudämmen.

VIII. Literaturverzeichnis

- Achstatter T., Moll R., Anderson A., Kuhn C., Pitz S., Schwechheimer K., Franke W.W. (1986) Expression of glial filament protein (GFP) in nerve sheaths and non-neural cells re-examined using monoclonal antibodies, with special emphasis on the co-expression of GFP and cytokeratins in epithelial cells of human salivary gland and pleomorphic adenomas. *Differentiation* **31**, 206-227.
- Adamson J.W. (1996) Regulation of red blood cell production. *Am J Med* **101**, 4S-6S.
- Agani F.H., Pichiule P., Chavez J.C., LaManna J.C. (2000) The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol Chem* **275**, 35863-35867.
- Alafaci C., Salpietro F., Grasso G., Sfacteria A., Passalacqua M., Morabito A., Tripodo E., Calapai G., Buemi M., Tomasello F. (2000) Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol* **13**, 219-225.
- Allen P.D., Bustin S.A., Newland A.C. (1993) The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Rev* **7**, 63-73.
- Almeida A., Delgado-Esteban M., Bolanos J.P., Medina J.M. (2002) Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem* **81**, 207-217.
- Bachmann S., Le Hir M., Eckardt K.U. (1993) Colocalisation of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *Cytochem* **41**, 335-341.
- Berdel W.E., Oberberg D., Reufi B., Thiel E. (1991) Studies on the role of recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumor cells in vitro. *Ann Hematol* **63**, 5-8.
- Bergeron M., Gidday J.M., Yu A.Y., Semenza G.L., Ferriero D.M., Sharp F.R. (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol* **48**, 285-296.
- Beris P. (1998) Erythropoietin and erythropoiesis. *Haema* **1**, 126-131.
- Bernaudin M., Marti H.H., Roussel S., Divoux D., Nouvelot A., MacKenzie E.T., Petit E. (1999) A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 643-51.

VIII. Literaturverzeichnis

- Bernaudin M., Bellail A., Marti H.H., Yvon A., Vivien D., Duchatelle I., Mackenzie E.T., Petit E. (2000) Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* **30**, 271-280.
- Bernaudin M., Nedelec A.S., Divoux D., MacKenzie E.T., Petit E., Schumann-Bard P. (2002) Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 393-403.
- Berry S., Dawicki D.D., Agarwal K.C., Steiner M. (1989) The role of microtubules in platelet secretory release. *Biochim Biophys Acta* **1012**, 46-56.
- Betz, A.L., Goldstein G.W., Katzman R. (1994) Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers. *Basic Neurochemistry*. (Siegel G.J. Hrsg.) Raven Press, New York. pp 681-699.
- Bock E., Moller M., Nissen C., Sensenbrenner M. (1977) Glial fibrillary acidic protein in primary astroglial cell cultures derived from newborn rat brain. *FEBS Lett* **83**, 207-211.
- Bondsdorff E. und Jalavisto E. (1948) A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis, *Acta Physiol Scand* **16**, pp. 150–170.
- Brines M.L., Ghezzi P., Keenan S., Agnello D., de Lanerolle N.C., Cerami C., Itri L.M., Cerami A. (2002) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. **12**, 10526-10531.
- Browne J.K., Cohen A.M., Egrie J.C., Lai P.H., Lin F.K., Strickland T., Watson E., Stebbing N. (1986) Erythropoietin: gene cloning, protein structure, and biological properties. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 693-702.
- Buemi M., Aloisi C., Cavallaro E., Corica F., Floccari F., Grasso G., Lasco A., Pettinato G., Ruello A., Sturiale A., Frisina N. (2002) Recombinant human erythropoietin (rHuEPO): more than just the correction of uremic anemia. *J Nephrol* **15**, 97-103.
- Buniatian G.H. (1997) Further similarities between astrocytes and perisinusoidal stellate cells of liver (Ito cells): colocalization of desmin and glial fibrillary acidic protein in astroglial primary cultures. *Biol Cell* **89**, 169-177.
- Bunn H.F., Gu J., Huang L.E., Park J.W., Zhu H. (1998) Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J Exp Biol* **201**, 1197-1201.
- Canadian Erythropoietin Study Group (1990) Association between recombinant human erythropoietin and quality of life and exercise capacity of patients receiving haemodialysis. *Br Med J* **300**, 573-578.

VIII. Literaturverzeichnis

- Cancilla P.A., Bready J., Berliner J. (1993) Brain endothelial-astrocyte interactions. *The Blood-brain barrier* (Pardrige W.M. Hrsg.) Raven Press, New York, pp 25-46.
- Carnot P., Deflandre C. (1906) Sur l'activité hémopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *CR Acad Sci Paris* **143**, 432-435.
- Catania M.A., Marciano M.C., Parisi A., Sturiale A., Buemi M., Grasso G., Squadrito F., Caputi A.P., Calapai G. (2002) Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* **437**, 147-150.
- Celik M., Gokmen N., Erbayraktar S., Akhisaroglu M., Konakc S., Ulukus C., Genc S., Genc K., Sagiroglu E., Cerami A., Brines M. (2002) Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 2258-2263.
- Cerami A., Brines M.L., Ghezzi P., Cerami C.J. (2001) Effects of Epoetin alpha on the central nervous system. *Semin Oncol* **28**, 66-70.
- Chavez J.C., Baranova O., Lin J., Pichiule P. (2006) The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci* **226**, 9471-9481.
- Cheetham J.C., Smith D.M., Aoki K.H., Stevenson J.L., Hoeffel T.J., Syed R.S., Egrie J., Harvey TS. (1998) NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat Struct Biol* **5**, 861-866.
- Chikuma M., Masuda S., Kobayashi T., Nagao M., Sasaki R. (2000) Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E1242-1248.
- Chin H., Nakamura N., Mamiyama W. (1996) Physical and functional interactions between Stat5 and tyrosine-phosphorylated receptors for erythropoietin and interleukin-3. *Blood* **88**, 4415-4425.
- Chin H., Arai A., Wakao H., Kamiyama R., Miyasaka N., Miura O. (1998) Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood* **91**, 3734-3745.
- Chong Z.Z., Kang J.Q., Maiese K. (2002) Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 503-514.
- Cohen J.J., Duke R.C., Fadok V.A., Sellins K.S. (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* **10**, 267-293.

- Compton M.M. (1992) A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* **11**, 105-119.
- Cotes P.M. (1982) Immunoreactive erythropoietin in serum I. Evidence for the validity of the assay method and the physiological relevance of estimates. *Br J Haematol* **50**, 427-438.
- Cotes P.M., (1989) Physiological studies of erythropoietin in plasma, in Jelkmann W., Gross A.J. (Hrsg.) *Erythropoietin*. Springer Verlag, Berlin, pp. 57-79.
- Crouch S.P., Kozlowski R., Slater K.J., Fletcher J. (1993) The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Meth* **160**, 81-88.
- D'Andrea A.D. und Zon L.I. (1990) Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest* **86**, 681-687.
- Danielyan L., Schneider C., Wessels J., Weller M., Buniatian G., Gleiter C.H. (2002a) Association between cytoskeletal proteins and erythropoietin (EPO)/EPO-receptor-expression in human astrocytes. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **365**, R119.
- Danielyan L., Harsch S., Kuçi S, Schneider C., Buniatian G.H., Wiesinger H., Gleiter C.H. (2002b) Inverse dynamics of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and synthesis of erythropoietin (EPO), EPO-receptor (EPOR) and Proliferative Nuclear Antigen (PCNA) in astrocytes. *GBM-Tagung in Halle 2002*; 1. Posterpreis.
- Danielyan L., Kuçi S., Harsch S., Schneider C., Wiesinger H., Weller M., Diekmann J., Buniatian G.H., Gleiter C.H. (2003a) Erythropoietin (EPO)-induced proliferation of human and rat astrocytes under normoxic and hypoxic conditions. *Naunyn-Schmid Arch Pharmacol* **367**, R121.
- Danielyan L., Harsch S., Schneider C., Proksch B., Weller M., Wiesinger H., Buniatian G.H., Gleiter C.H. (2003b) Erythropoietin-associated renewal of astrocyte population under normoxic and hypoxic conditions. *Ann Hematol* **82**, 122.
- Danielyan L., Kuçi S., Harsch S., Schneider C., Proksch B., Wiesinger H., Buniatian G.H., Gleiter, C.H. (2003c) The erythropoietin-associated resistance to hypoxia of cultured astrocytes. *International Society of Neurochemistry in Hong Kong*.
- Danielyan L., Gembizki O., Proksch B., Weinmann M., Morgalla M., Wiesinger H., Buniatian G.H., Gleiter C.H. (2005) The blockade of endothelin A receptor protects astrocytes against hypoxic injury: common effects of BQ-123 and erythropoietin on the rejuvenation of the astrocytic population. *Eur J Cell Biol* **84**, 567-579.

VIII. Literaturverzeichnis

- Danielyan L., Mueller L., Proksch B., Kabisch D., Weller M., Wiesinger H., Buniatian G.H., Gleiter C.H. (2006) Similar protective effects of BQ-123 and erythropoietin on survival of neural cells and generation of neurons upon hypoxic injury. *Eur J Cell Biol* **84**, 907-913.
- Dawson T.M. (2002) Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin? *Lancet* **359**, 96-97. Erratum in: *Lancet* (2002) **359**, 1782.
- Demirkesen C., Hoede N., Moll R. (1995) Epithelial markers and differentiation in adnexal neoplasms of the skin: an immunohistochemical study including individual cytokeratins. *J Cutan Pathol* **22**, 518-35.
- Digicaylioglu M. und Lipton S.A. (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* **412**, 641-647.
- Dirnagl U. und Meisel A. (1998) Zerebrale Ischämie. Molekulare Medizin (Ganten D. Hrsg.) Springer Verlag, Berlin.
- Douwell J.S., Berkner K.L., Lebo R.V., Adamson J.W. (1986) Human erythropoietin gene: High level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 6465-6469.
- Eckhardt K.U. (1998) Erythropoietin – Karriere eines Hormons. *Dt Ärztebl* **95**, A-285-290.
- Ehrenreich H. und Siren A.L. (2001) Neuroprotection – what does it mean? - What means do we have? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **251**, 149-151.
- Ehrenreich H., Hasselblatt M., Dembowski C., Cepek L., Lewczuk P., Stiefel M., Rustenbeck H.H., Breiter N., Jacob S., Knerlich F., Bohn M., Poser W., Ruther E., Kochen M., Gefeller O., Gleiter C., Wessel T.C., De Ryck M., Itri L., Prange H., Cerami A., Brines M., Siren A.L. (2002) Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* **8**, 495-505.
- Eng L.F., Vanderhaeghen J.J., Bignami A., Gerstl B. (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* **28**, 351-354.
- Erbayraktar S., Grasso G., Sfacteria A., Xie Q.W., Coleman T., Kreilgaard M., Torup L., Sager T., Erbayraktar Z., Gokmen N., Yilmaz O., Ghezzi P., Villa P., Fratelli M., Casagrande S., Helboe L., Gerwein J., Christensen S., Geist M.A., Pedersen L.O., Cerami-Hand C., Wuerth J.P., Cerami A., Brines M. (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 6741-6746.
- Erlanson M., Landberg G., Lindh J., Roos G. (1997) Flow cytometric evaluation of proliferating cell nuclear antigen expression in human hematopoietic malignancies. *Acta Oncol* **36**, 17-22.

- Erslev A.J. (1991a) Erythropoietin titers in health and disease. *Semin Hematol* **28**, (3 Suppl 3) 7-8.
- Erslev A.J. (1991b) Erythropoietin. *N Engl J Med* **324**, 1339-1344.
- Evans R.W., Rader B., Manninen D.L. (1990) Cooperative Multicenter EPO Clinical Trial Group: The quality of life of hemodialysis recipients treated with recombinant human erythropoietin. *JAMA* **263**, 825-830.
- Fisher J.W. (1997) Erythropoietin: Physiologic and pharmacologic aspects. *Proc Soc Exp Biol Med* **216**, 356-369.
- Flatharty K.K., Vlasses P.H., Caro J. (1989) Clinical pharmacology of single dose of human erythropoietin in healthy men. *Clin Pharmacol Ther* **45**, 135.
- Fried W. (1972) The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. *Blood* **40**, 671-677.
- Galou M., Colucci-Guyon E., Ensergueix D., Ridet J.L., Gimenez y Ribotta M., Privat A., Babinet C., Dupouey P. (1996) Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J Cell Biol* **133**, 853-863.
- Giese H., Mertsch K., Blasig I.E. (1995) Effect of MK-801 and U83836E on porcine brain capillary endothelial cell barrier during hypoxia. *Neurosci Lett* **191**, 169-220.
- Gimenez y Ribotta M., Menet V., Privat A. (2001) The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog Brain Res* **132**, 587-610.
- Goebel HH, Schlie M, Eng LF. (1987) Immunohistopathologic spectrum of the glial fibrillary acidic protein in neurooncology. *Acta Histochem Suppl.* **34**, 81-93.
- Gold R., Schmied M., Giegerich G., Breitschopf H., Hartung H.P., Toyka K.V., Lassmann H. (1994) Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* **71**, 219-225.
- Gorczyca W., Gong J., Darzynkiewicz Z. (1993) Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* **53**, 1945-1951.
- Gorio A., Gokmen N., Erbayraktar S., Yilmaz O., Madaschi L., Cichetti C., Di Giulio AM., Vardar E., Cerami A., Brines M. (2002) Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 9450-9455.

VIII. Literaturverzeichnis

- Grasso G. (2001) Neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Sci* **45**, 7-14.
- Grimm G., Stockenhuber F., Schneeweiss B., Madl C., Zeitlhofer J., Schneider B. (1990) Improvement of brain function in hemodialysis patients treated with erythropoietin. *Kidney Int* **38**, 480-486.
- Grimm C., Wenzel A., Groszer M., Mayser H., Seeliger M., Samardzija M., Bauer C., Gassmann M., Reme C.E. (2002) HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* **8**, 718-724.
- Guenard V., Frisch G., Wood P.M. (1996) Effects of axonal injury on astrocyte proliferation and morphology in vitro: implications for astrogliosis. *Exp Neurol* **137**, 175-190.
- Hamprecht B. und Löffler F. (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Meth. Enzymol* **109**, 341-345.
- Hansson E. (1986) Primary astroglial cultures. A biochemical and functional evaluation. *Neurochem Res* **11**, 759-767.
- Hirth P., Wieczorek L., Scigalla P. (1988) Molecular biology of erythropoietin. *Contrib Nephrol* **66**, 38-53.
- Huang L.E., Ho V., Arany Z., Krainc D., Galson D., Tendler D., Livingston D.M., Bunn H.F. (1997) Erythropoietin gene regulation depends on heme-dependent oxygen sensing and assembly of interacting transcription factors. *Kidney Int* **51**, 548-552.
- Inagaki M., Nakamura Y., Takeda M., Nishimura T., Inagaki N. (1994) Glial fibrillary acidic protein: Dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol* **4**, 239-243.
- Jacobs K., Shoemaker C., Rudersdorf R., Neill S.D., Kaufman R.J., Mufson A., Seehra J., Jones S.S., Hewick R., Fritsch E.F. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* **313**, 806-810.
- Jacobson L.O., Goldwasser E., Fried W., Plzak L. (2000) Role of the kidney in erythropoiesis. 1957. *J Am Soc Nephrol* **11**, 589-591.
- Jelkmann W. (1992) Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* **72**, 449-489.
- Jones N.M. und Bergeron M. (2001) Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1105-1114.
- Junqueira L.C. und Carneiro J. (1996) *Histologie*. 4. Auflage; Springer Verlag.

VIII. Literaturverzeichnis

- Koury M.J. und Bondurant M.C. (1990) Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* **248**, 378-381.
- Koury M.J. und Bondurant M.C. (1992) The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem* **210**, 649-663.
- Koyama Y., Tsujikawa K., Masuda T., Baba A. (2003) Intracerebroventricular administration of an endothelin ETB receptor against increases expressions of GDNF and BDNF in rat brain. *Eur J Neurosci* **18**, 887-894.
- Krantz S.B. (1991) Erythropoietin. *Blood* **77**, 419-434.
- Kurki P., Ogata K., Tan E.M. (1988) Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J Immunol Methods* **109**, 49-59.
- Lehdahl U., Zimmerman L.B., McKay R.D. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585-595.
- Leist M. und Nicotera P. (1997) The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Comm* **236**, 1-9.
- Liesi P., Kaakkola S., Dahl D., Vaheri A. (1984) Lamin is induced in astrocytes of adult brain by injury. *EMBO J.* **3**, 683-686.
- Liu C., Shen K., Liu Z., Noguchi C.T. (1997) Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem* **272**, 32395-32400.
- Liu R., Suzuki A., Guo Z., Mizuno Y., Urabe T. (2006) Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *J Neurochem* **96**, 1101-1110.
- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Darnell J. (1996) *Molekulare Zellbiologie*. de Gruyter Verlag, Berlin, 2. Auflage, 1020-1040.
- MacDougall I., Roberts D.E., Neubert P., Dharmasena A.D., Coles G.A., Williams J.D. (1989) Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Lancet* **25**, 425-427.
- Manthorpe M., Nieto-Sampedro M., Skaper S.D., Lewis E.R., Barbin G., Longo F.M., Cotman C.W., Varon S. (1983) Neuronotrophic activity in brain wounds of the developing rat. Correlation with implant survival in the wound cavity. *Brain Res.* **267**, 47-56.
- Marsh J.T., Brown W.S., Wolcott D., Carr C.R., Harper R., Schweitzer S.V., Nissenson A.R. (1991) rHuEPO treatment improves brain and cognitive function of anemic dialysis patients. *Kidney Int* **39**, 155-163.

- Marti H.H., Wenger R.H., Rivas L.A., Straumann U., Digicaylioglu M., Henn V., Yonekawa Y., Bauer C., Gassmann M. (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* **8**, 666-676.
- Marti H.H., Bernaudin M., Petit E., Bauer C. (2000) Neuroprotection and Angiogenesis: Dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol Sci* **15**, 225-229.
- Maschio G. (1995) Erythropoietin and systemic hypertension. *Nephrol Dial Transpl* **10**, 74-79.
- Masuda S., Okano M., Yamagishi K., Nagao M., Ueda M., Sasaki R. (1994) A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* **269**, 19488-19493.
- Mattson M.P., Culmsee C., Yu Z., Camandola S. (2000) Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* **74**, 443-456.
- Maxwell P.H., Osmond M.K., Pugh C.W., Heryet A., Nicholls L.G., Tan C.C., Doe B.G., Ferguson D.J., Johnson M.H., Ratcliffe P.J. (1993) Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* **44**, 1149-62.
- McLendon R.E. und Bigner D.D. (1994) Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathol* **4**, 221-228.
- Mertsch K., Haseloff R., Blasig I.E. (1997) Investigations of radical scavengers by using an in vitro model of blood-brain barrier. (Animal alternatives, welfare and ethics (van Zutphen LFM, Ball M. eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 881-886.
- Miller B.A., Barber D.L., Bell L.L., Beattie B.K., Zhang M.Y., Neel B.G., Yoakim M., Rothblum L.I., Cheung J.Y. (1999) Identification of the erythropoietin receptor domain required for calcium channel activation. *J Biol Chem* **274**, 20465-20472.
- Miyachi K., Fritzler M.J., Tan E.M. (1978) Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* **121**, 2228-2234.
- Miyake T., Kung C.K., Goldwasser E. (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* **252**, 5558-5564.
- Muruganandam A., Herx L.M., Monette R., Durkin J.P., Stanimirovic D.B. (1997) Development of immortalized human cerebrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *FASEB J* **11**, 1187-1197.

- Nagai A., Nakagawa E., Choi H.B., Hatori K., Kobayashi S., Kim S.U. (2001) Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 386-392.
- Naparstek Y., Ben-Nun A., Holoshitz J., Reshef T., Frenkel A., Rosenberg M., Cohen I.R. (1983) T-lymphocyte lines producing or vaccinating against autoimmune encephalomyelitis (EAE). Functional activation induces peanut agglutinin receptors and accumulation in the brain and thymus of line cells. *Eur J Immunol* **13**, 418-423.
- Nissenson A.R., Nimer S.D., Wolcott D.L. (1991) Recombinant human erythropoietin and renal anemia: molecular biology, clinical efficacy, and nervous system effects. *Ann Intern Med* **114**, 402-416.
- Pardridge W.M. (1991) Peptide drug delivery to the brain. Raven Press, New York.
- Pickett J.L., Theberge D.C., Brown W.S., Schweitzer S.U., Nissenson A.R. (1999) Normalizing hematocrit in dialysis patients improves brain function. *Am J Kidney Dis* **33**, 1122-1130.
- Poeck K. (1990) Neurologie. Springer Verlag, Berlin.
- Prass K., Ruscher K., Karsch., Isaev N., Megow D., Priller J., Scharff A., Dirnagl U., Meisel A. (2002) Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 520-525.
- Raine A.E.G. und Roger S.D. (1991) Effects of erythropoietin on blood pressure. *Am J Kid Dis* 1991 **18**, 76-83.
- Raub T.J. (1996) Signal transduction and glial cell modulation of cultured brain microvessel endothelial cell tight junctions. *Am J Physiol* **271**, C495-503.
- Reissmann K.R. (1950) Studies on the mechanisms of erythropoietin stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* **5**, 347-380.
- Ruscher K., Freyer D., Karsch M., Isaev N., Megow D., Sawitzki B., Priller J., Dirnagl U., Meisel A. (2002) Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* **22**, 10291-10301.
- Rutka J.T., Murakami M., Dirks P.B., Hubbard S.L., Becker L.E., Fukuyama K. (1997) Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J Neurosurg* **87**, 420-430.

- Sabbatini M., Barili P., Bronzetti E., Zaccheo D., Amenta F. (1999) Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex. *Mech Ageing Dev* **108**, 165-172.
- Samtleben W. und Gurland H.J. (1990) Pathogenese der renalen Anämie. *Cilag*.
- Sasaki R. (2003) Pleiotropic functions of erythropoietin. *Intern Med* **42**, 142-149.
- Sawyer S.T., Koury M.J., Bondurant M.C. (1987) Large-scale procurement of erythropoietin-responsive erythroid cells: assay for biological activity of erythropoietin. *Meth Enzymol* **147**, 340-352.
- Schlatt S., Weinbauer G.F. (1994) Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes. *Int J Androl* **17**, 214-22.
- Schneider C., Harsch S., Kuçi S., Wiesinger H., Weller M., Morgalla M., Buniatian G.H., Gleiter, C.H., Danielyan L. (2003) Upregulation of GFAP in astrocytes is associated with decreased expression of EPO, proliferation and survival of the cells. *International Society of Neurochemistry in Hong Kong*
- Schurch W., Skalli O., Seemayer TA., Gabbiani G. (1987) Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. I. Smooth muscle tumors. *Am J Pathol*. **128**, 91-103.
- Shingo T., Sorokan S.T., Shimazaki T., Weiss S. (2001) Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* **21**, 9733-9743.
- Sinor A.D. und Greenberg D.A. (2000) Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett* **290**, 213-215.
- Siren A.L. und Ehrenreich H. (2001) Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **251**, 179-184.
- Siren A.L., Knerlich F., Poser W., Gleiter C.H., Bruck W., Ehrenreich H. (2001a) Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* **101**, 271-276.
- Siren A.L., Fratelli M., Brines M., Goemans C., Casagrande S., Lewczuk P., Keenan S., Gleiter C., Pasquali C., Capobianco A., Mennini T., Heumann R., Cerami A., Ehrenreich H., Ghezzi P. (2001b) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 4044-4049.

VIII. Literaturverzeichnis

- Skalli O., Ropraz P., Trzeciak A., Benzonana G., Gillessen D., Gabbiani G. (1986) Monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* **103**, 2787-96.
- Somjen G.G. (1988) Nervenkit: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* **1**, 2-9.
- Spivak J.L. und Hogans B.B. (1989) The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood* **73**, 90-99.
- Steinberg S.E., Garcia J.F., Matzke G.R., Mladenovic J. (1986) Erythropoietin kinetics in rats: generation and clearance; *Blood* **67**, 646-649.
- Strang R., Metcalfe T., Thackray L., Dang M. (2001) Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microsc Res Tech* **52**, 171-181.
- Sundal E. und Kaeser U. (1989) Correlation of anemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin: safety and efficacy of one year's treatment in a European multicenter study of 150 haemodialysis-dependent patients. *Nephrol Dial Transpl* **4**, 979-987.
- Syed R.S., Reid S.W., Li C., Cheetham J.C., Aoki K.H., Liu B., Zhan H., Osslund T.D., Chirino A.J., Zhang J., Finer-Moore J., Elliott S., Sitney K., Katz B.A., Matthews D.J., Wendoloski J.J., Egrie J., Stroud R.M. (1998) Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* **395**, 511-516.
- Tan C.K., Sullivan K., Li X.Y., Tan E.M. Downey K.M., So A.G. (1987) Autoantibody to the proliferating cell nuclear antigen neutralizes the activity of the auxiliary protein for DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res* **15**, 9299-9308.
- Thomas C. (Hrsg.) (1995) *Allgemeine Pathologie*. Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Tower D.B. (1988) Development of knowledge about astrocytes since Virchow, in: *The Biochemical Pathology of Astrocytes* (Norenberg M.D., Hertz L. and Schousboe A., eds) Alan R. Liss, New York, pp. 3-18.
- Vairano M., Dello Russo C., Pozzoli G., Battaglia A., Scambia G., Tringali G., Aloe-Spiriti M.A., Preziosi P., Navarra P. (2002) Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci* **16**, 584-592.
- Wanner R.M., Spielmann P., Stroka D.M., Camenisch I., Scheid A., Houck D.R., Bauer C., Grassmann M., Wenger R.H. (2000) EPO lones induce erythropoietin expression via hypoxia-inducible factor-1 alpha activation. *Blood* **96**, 1558-1565.

VIII. Literaturverzeichnis

- Wen T.C., Sadamoto Y., Tanaka J., Zhu P.X., Nakata K., Ma Y.J., Hata R., Sakanaka M. (2002) Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res* **67**, 795-803.
- Wyllie A.H. (1986) What is apoptosis? *Histopathology* **10**, 995-8.
- Yu A.C., Wong H.K., Yung H.W., Lau L.T. (2001) Ischemia-induced apoptosis in primary cultures of astrocytes. *Glia* **35**, 121-30.
- Yu X., Shacka J.J., Eells J.B., Suarez-Quian C., Przygodzki R.M., Beleslin-Cokic B., Lin C.S., Nikodem V.M., Hempstead B., Flanders K.C., Costantini F., Noguchi C.T. (2002) Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* **129**, 505-516.
- Zaman K., Ryu H., Hall D., O'Donovan K., Lin Kl., Miller M.P., Marquis J.C., Baraban J.M., Semenza G.L., Ratan R.R. (1999) Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci* **19**, 9821-9830.
- Zanjani E.D., Ascensao J.L., McGlave P.B. (1981) Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest* **67**, 1183-1188.

Teilaspekte der vorliegenden Arbeit wurden bisher in den folgenden Journalen publiziert bzw. auf den folgenden Kongressen vorgestellt:

Danielyan L., Schneider C., Wessels J., Weller M., Buniatian G., Gleiter C.H. (2002a) Association between cytoskeletal proteins and erythropoietin (EPO)/EPO-receptor-expression in human astrocytes. *Naunyn-Schmid Arch Pharmacol* **365**, R119.

Danielyan L., Harsch S., Kuçi S., Schneider C., Buniatian G.H., Wiesinger H., Gleiter C.H. (2002b) Inverse dynamics of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and synthesis of erythropoietin (EPO), EPO-receptor (EPOR) and Proliferative Nuclear Antigen (PCNA) in astrocytes. Poster auf der GBM-Tagung in Halle 2002; 1. Posterpreis.

Danielyan L., Kuçi S., Harsch S., Schneider C., Wiesinger H., Weller M., Diekmann J., Buniatian G.H., Gleiter C.H. (2003a) Erythropoietin (EPO)-induced poliferation of human and rat astrocytes under normoxic and hypoxic conditions. *Naunyn-Schmid Arch Pharmacol* **367**, R121.

Danielyan, L.; Harsch, S.; Schneider, C.; Proksch, B.; M. Weller.; Wiesinger, H.; Buniatian, G.H.; Gleiter, C.H. (2003b) Erythropoietin-associated renewal of astrocyte population under normoxic and hypoxic conditions. *Ann Hematol* **82**, 122.

Danielyan, L., Kuçi, S., Harsch, S., Schneider, C., Proksch, B., Wiesinger, H., Buniatian, G.H., Gleiter, C.H. (2003c) The erythropoietin-associated resistance to hypoxia of cultured astrocytes. *International Society of Neurochemistry in Hong Kong*.

Danielyan L., Gembizki O., Proksch B., Weinmann M., Morgalla M., Wiesinger H., Buniatian G.H., Gleiter C.H. (2005) The blockade of endothelin A receptor protects astrocytes against hypoxic injury: common effects of BQ-123 and erythropoietin on the rejuvenation of the astrocytic population. *Eur J Cell Biol* **84**, 567-579.

Schneider C., Harsch S., Kuçi S., Wiesinger H., Weller M., Morgalla M., Buniatian G.H., Gleiter, C.H., Danielyan L. (2003) Upregulation of GFAP in astrocytes is associated with decreased expression of EPO, proliferation and survival of the cells. *International Society of Neurochemistry in Hong Kong*. Wegen SARS-Epidemie fiel die gesamte Veranstaltung aus!

IX. Quellennachweis

Alle nicht im Quellennachweis angegebenen Abbildungen – insbesondere die Abbildungen, Diagramme und Tabellen des Ergebnisteils – wurden eigenständig und ohne fremde Hilfe erstellt.

Die Abbildungen der Einleitung stammen im Einzelnen aus folgenden Quellen:

Abb. 1: von der Webpage www.Genecard.com

Abb. 2: Stroud Lab publications, Syed et al. (1998). Im Internet zu finden unter:
www.msg.ucsf.edu/stroud/syed99nature.html

Abb. 3: modifiziert nach Kosi Gramatikoff, PhD; BioCarta, www.BioCarta.com

Abb. 4: modifiziert nach Gregg Hickey, PhD, BioCarta, www.BioCarta.com

Abb. 5: www.BioCarta.com, Verfasser unbekannt

Abb. 6: modifiziert nach Kosi Gramatikoff, PhD; BioCarta, www.BioCarta.com

Abb. 7: modifiziert nach Craig Monell, PhD, BioCarta, www.BioCarta.com

Auf alle Webpages wurde zuletzt im Dezember 2006 zugegriffen.

X. Danksagung

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Abteilung für Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Tübingen, Otfried-Müller-Straße 45, sowie im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen, Hoppe-Seyler-Straße 4, durchgeführt.

Es ist mir ein besonderes Anliegen, mich bei folgenden Personen herzlich zu bedanken:

Bei Herrn Prof. Dr. C.H. Gleiter, der mich als Lehrstuhlinhaber der Abteilung für Klinische Pharmakologie und Doktorvater nicht nur wiederholt sehr gefördert hat, sondern auch bereit war, mir ein großes Maß an Selbstständigkeit zuzugestehen. Ich weiß dieses Vertrauen aufrichtig zu schätzen. Vielen Dank!

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Wiesinger - für die geduldige Einweisung im Umgang mit der astroglialen Zellkultur, für stete Diskussionsbereitschaft sowie für das vertrauensvolle Überlassen des Labors. Seine hohe Arbeitsethik und sein kritisches Hinterfragen halfen viele Fehler zu vermeiden und werden mir immer ein Vorbild sein.

Bei Frau Dr. Lusine Danielyan, meiner Betreuerin: Für die intensive Zusammenarbeit bei den Projektarbeiten, kompetente Anleitung, eine wunderbare Freundschaft, liebevolle Kritik, warmherzigen und geduldigen Umgang und sehr großes Entgegenkommen in so vielen Dingen. Für viel Lachen und Freude an dieser Arbeit zu Zeiten, als ich dies nicht immer für möglich hielt. Von ganzem Herzen „Danke!“

Mein herzlicher Dank gilt auch:

Frau Katharina Rehn, die über lange Zeit geduldig und liebenswürdig meine Fragen nach diesem und jenem beantwortete und mich bei den vielen kleinen Dingen im Labor nie im Stich ließ.

Frau Dr. rer. nat. Simone Harsch und Frau Barbara Proksch für wertvolle Tips, viel Zeit und Mühe bei der Analyse der Proben und deren Auswertung. Weder

X. Danksagung

die ELISA-Messungen noch die LightCycler-Analysen wären ohne sie zustande gekommen.

Herrn Selim Kuçi für das zeitweilige Überlassen des Fluoreszenzmikroskopes und für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie.

Den Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Klinische Pharmakologie und des Physiologisch-Chemischen Instituts für ein kollegiales, freundliches Umgehen miteinander. Zu nennen sind insbesondere Rainer Kahlich, Jan Stefan Klein und Julia Hullmann sowie die Arbeitsgruppe von Stephan Verleysdonk.

Herrn Thorsten Niechoj für die schnelle und kompetente Hilfe bei allen Problemen meinen Computer und diverse Programme betreffend. Ohne seine Unterstützung hätte ich nochmals von Vorne beginnen müssen.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre Aufmunterung und ihr Vertrauen auch in schwierigen Zeiten und nicht zuletzt für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

XI. Lebenslauf

Name: Paul, geb. Schneider
Vorname: Christina
Geburtsdatum: 22.08.1978
Geburtsort: Albstadt-Ebingen

Schulbildung

1985 – 1989 Grundschule Krauchenwies - Ablach
1989 – 1998 Gymnasium der Liebfrauenschule Sigmaringen
1998 Allgemeine Hochschulreife
Karl-von-Frisch Preisträgerin für Biologie

Universitäre Ausbildung

10/1998 – 04/2005 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08/1999 – 09/1999 Praktikum bei der "Stehlin Foundation for Cancer Research" am St. Joseph's Hospital in Houston, Texas, USA
08/2000 Ärztliche Vorprüfung
08/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2004 – 03/2005 Praktisches Jahr im Städt. Krankenhaus Friedrichshafen mit Wahlfach Pädiatrie
27.04.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation
ab 06/2005 Assistenzärztin Innere Medizin

Promotion

10/2001 – 12/2007 Dissertation zum Thema „Expression und Wirkung von Erythropoietin β bei Astrozyten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen“
