

1. Einleitung

1.1 Geschichte des Erythropoietins

Bereits vor über 150 Jahren wurde erkannt, dass zwischen einem erniedrigten arteriellen Sauerstoff-Partialdruck und einer Erhöhung der Erythrozytenzahl ein Zusammenhang bestehen muss [1]. Im Jahre 1906 wurde durch Paul Carnot und seiner Mitarbeiterin Catherine Deflandre erstmals die Hypothese aufgestellt, dass die Erythropoiese durch einen humoralen Faktor geregelt wird [2].

Bonsdorff und Jalavisto gaben diesem Faktor im Jahre 1948 den Namen ‚Erythropoietin‘ [3]. Im Jahre 1957 erkannten Jacobson und Mitarbeiter, dass die Niere eine Schlüsselrolle bei der Synthese von Erythropoietin spielt [4]. Kuratowska und Mitarbeiter sowie Fisher und Birdwell wiesen 1961 erstmals Erythropoietin im Perfusat isolierter Nieren nach [5,6]. Zwanzig Jahre später wurde Erythropoietin aus Nierenrinden hypoxischer Ratten isoliert [7].

Forschergruppen am Genetics Institute und bei Amgen Thousand Oaks (beide USA) gelang 1985 unabhängig voneinander die Klonierung des Erythropoietingens [8,9]. Dies war der Ausgangspunkt zur Herstellung von Erythropoietin mit Hilfe gentechnischer Methoden. Zur pharmazeutischen Gewinnung dieses ‚rekombinanten humanen Erythropoietins‘ (rhEPO) dienen Kulturen von Zellen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters (sog. CHO-Zellen) [10].

Inzwischen gehört die Verabreichung von rhEPO zur Standardtherapie der renalen Anämie, sowie auch anderer nicht-renal bedingter Anämieformen, wie z.B. die Frühgeborenen-Anämie, Anämie chronischer Entzündungen oder die Tumoranämie [11].

1.2 Erythropoietin

Erythropoietin ist ein Glykoprotein-Hormon, das durch die Abspaltung von 28 Aminosäuren aus einem Prohormon mit 193 Aminosäuren entsteht [12]. Das somit 165 Aminosäuren zählende zirkulierende Erythropoietin-Molekül hat zusammen mit vier Zuckerseitenketten ein relatives Molekulargewicht von etwa 30 kDa. Die Konformation der Peptidkette wird durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert, die von vier Zysteinresten ausgebildet werden [13,14].

Das humane Erythropoietin-Gen ist in einfacher Kopie auf der Mitte des langen Armes von Chromosom 7 in der Region q11-q22 lokalisiert [15,16]. Die 5,4 Kilobasenpaare lange

genomische DNA ist in 5 Exons und 4 Introns unterteilt. Die Exons enthalten die kodierende Sequenz für das Propeptid und zusätzlich die davor und dahinter liegenden nicht-translatierten Sequenzen [8].

Das Erythropoietin-Gen ist relativ gut konserviert, so dass die Erythropoietine verschiedener Tierarten untereinander sehr ähnlich sind. Die Sequenz-Homologie des humanen Erythropoietins zum murinen Erythropoietin beträgt ca. 80% [17] und zum Erythropoietin der Affen ca. 92% [18]. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass mit großer Zuverlässigkeit aus entsprechenden Tierversuchen Rückschlüsse auf die Verhältnisse beim Menschen gezogen werden können.

1.3 Erythropoiese

Da Erythrozyten als kernlose Zellen eine begrenzte Lebensdauer von 100 bis 120 Tagen haben, müssen sie kontinuierlich nachgebildet werden. Sie werden aus den sogenannten pluripotenten Stammzellen des roten Knochenmarks gebildet. Während der frühen Differenzierungsphasen der Erythropoiese wird Erythropoietin als spezifischer Wachstumsfaktor benötigt [19].

Aus den Stammzellen entwickeln sich zunächst gemeinsame Vorläuferzellen der Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten (CFU-GEMM). Durch weitere Ausdifferenzierung der CFU-GEMM entstehen Vorstufen der Erythrozyten (BFU-E, ‚burst forming units-erythroid‘).

Durch den Einfluss von Erythropoietin entwickeln sich die BFU-E's zu CFU-E's (‚colony forming units-erythroid‘). Vermittelt werden die Erythropoietin-Effekte durch membranständige Rezeptoren [20]. Durch das Anlagern von Erythropoietin an die Rezeptoren wird die Apoptose der konstitutiv gebildeten Stammzell-Abkömmlinge verhindert, und es kommt zu einer gesteigerten DNA- und RNA-Synthese, Zellteilung und Hämoglobin-Synthese [21].

1.4 Erythropoietin und Sauerstoff

Wie eingangs bereits erwähnt, erkannte Dennis Jourdanet im vorletzten Jahrhundert, dass es einen Zusammenhang zwischen einem erniedrigten arteriellen Sauerstoff-Partialdruck und einer Erhöhung der Erythrozytenzahl gibt [1]. Anfangs wurde noch vermutet, dass diese Polyglobulie erblich bedingt sei [22,23]. Diese Theorie wurde jedoch im Jahre 1890 von dem

französischen Anatomen Viault widerlegt, der nach einem Höhengedächtnis bei sich und seinen Begleitern einen starken Anstieg der Erythrozyten-Zahl feststellen konnte [24]. Miescher erklärte die gesteigerte Erythropoese mit einem verminderten Sauerstoff-Partialdruck im Knochenmark [25].

Dass die Regulation der Erythropoese hormonellen Abläufen unterliegt, wurde erstmals 1906 von Paul Carnot formuliert [2,26]. Aus dem von Carnot geprägten Begriff ‚Hemopoiétine‘ wurde 1948 die spezifischere Bezeichnung ‚Erythropoietin‘ [3].

Bis heute ist allerdings der genaue Mechanismus, über den es zu einer Aktivierung der Erythropoietin-Bildung kommt, nicht im Einzelnen bekannt. Es muss ein Sensor im Organismus existieren, der einen Abfall des Sauerstoff-Partialdruckes im Gewebe registriert und über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Bildung von Erythropoietin in den entsprechenden Zellen stimuliert.

Bisher wurde angenommen, dass der Sauerstoff-empfindliche Sensor im renalen Kortex zu finden ist [27,28]. Für diese Theorie spricht, dass eine Reduktion des arteriellen Sauerstoff-Partialdruckes bei der isolierten, serumfrei perfundierten Niere zu einer gewissen Steigerung der Erythropoietin-Syntheserate führt [29]. Außerdem ergaben Studien an Zellkulturen, dass der Sauerstoffsensoren möglicherweise in denselben Zellen lokalisiert ist, die auch Erythropoietin synthetisieren [30,31,32].

Allerdings wurden in klinischen [33] wie tierexperimentellen [34] Studien Daten erhoben, die darauf hindeuten, dass ein zusätzlicher extrarenaler Sensor bei der Regelung der renalen Erythropoietin-Synthese beteiligt sein muss. So zeigen Untersuchungen an Ratten, dass eine verminderte renale Durchblutung mit einem entsprechend reduzierten Sauerstoffangebot an die Niere nicht mit einer adäquat gesteigerten Erythropoietin-Synthese beantwortet wird [35].

Bei klinischen Studien wurden bei Patienten mit hochgradiger Nierenarterienstenose nur gelegentlich und dann auch nur minimale Anstiege des Erythropoietinspiegels im Plasma beobachtet [33,36,37]. Auch fanden sich nur selten Polyzythämien als Folge einer Nierenarterienstenose [38,39,40].

Es wurden bei Hunden Shuntperfusionen durchgeführt, indem venöses Blut aus dem rechten Vorhof des Herzens in die Nierenarterie geleitet wurde. Lediglich bei der Hälfte der Tiere konnte ein, und dann auch nur leicht, erhöhter Erythropoietinspiegel im Plasma gemessen werden [41]. Ebenso erkannte man bei Versuchen an Hunden, dass selbst bei massiver Reduktion des renalen Blutflusses die Erythropoietinkonzentration im Plasma nur leicht ansteigt [42]. Ähnliche Versuche wurden von Murphy et al. durchgeführt; hier kam es

sogar zu einer Erniedrigung des Erythropoietinspiegels [43]. Auch anderen Untersuchern gelang die Erhöhung des Erythropoietinspiegels nach Reduktion der Nierendurchblutung weder bei Ratten noch bei Schafen [44,45].

Diese nicht einheitlichen, sich zum Teil sogar widersprechenden Befunde legen den Schluss nahe, dass es einen extrarenalen Sauerstoffsensoren geben muss, der die Erythropoietin-Synthese regelt.

Möglicherweise stellt — wie auch bei der Regelung der Bildung anderer Hormone — das Hypothalamus-Hypophysen-System die oberste Instanz im Regelkreis der Erythropoietin-Synthese dar. So konnte gezeigt werden, dass hypophysectomierte Tiere auf einen hypoxischen Reiz nicht mit einer gesteigerten Erythropoietin-Synthese antworten [46]. Stimuliert man hingegen mittels elektrischer Reize die hypothalamische Region, so kommt es zu einer erhöhten Erythropoietin-Konzentration im Blut [47].

1.5 Sauerstoff-Sensor

Alle Vorgänge, die den Organismus an Sauerstoff-Mangelzustände anpassen, werden maßgeblich durch einen Transkriptionsfaktor geregelt, der als Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 (HIF-1) bezeichnet wird. HIF-1 bindet an die regulatorischen Abschnitte Hypoxie-induzierbarer Gene (Erythropoietin, Transferrin, VEGF, GLUT1, glykolytische Enzyme, etc. [48]), rekrutiert die für die Transkription notwendigen Co-Faktoren und aktiviert dadurch die Transkription der Zielgene [49]. Zur Zeit sind 50 bis 60 weitere Gene bekannt, die neben dem Erythropoietin-Gen ebenfalls durch HIF-1 induziert werden können [48].

Die Struktur des aktiven HIF-1-Komplexes konnte vor knapp 10 Jahren aufgeklärt werden [50]. Er besteht aus 2 Protein-Untereinheiten, die beide kontinuierlich gebildet werden. Die β -Untereinheit, auch als ARNT bezeichnet (Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator), ist permanent im Zellkern vorhanden. Hingegen ist die α -Untereinheit nur bei Sauerstoff-Mangelzuständen nachweisbar. Dies bedeutet, dass ein aktiver HIF-1-Komplex ausschließlich unter Hypoxie zustande kommen kann. Hypoxie-induzierbare Gene werden unter Normoxie wenig bis gar nicht, unter Hypoxie jedoch vermehrt exprimiert.

Im Zusammenhang mit dem im Laborjargon gern als „O₂-Sensing“ bezeichneten Mechanismus spielt also die HIF-1 α -Untereinheit eine zentrale Rolle. Das Molekül beinhaltet dafür verschiedene regulatorische Domänen [51]. Während die N-terminale Hälfte des Proteins für die Dimerisierung mit HIF-1 β und die DNA-Bindung erforderlich ist (bHLH-Domäne, PAS-Domäne), enthält die C-terminale Hälfte zwei Abschnitte, die Zielgene

aktivieren (Transaktivierungsdomänen TAD-C und -N), sowie eine Sauerstoff-abhängige Degradationsdomäne (O-DDD, oxygen-dependent degradation domain). Der Abbau von HIF-1 α erfolgt durch Bindung des Tumorsuppressor-Proteins pVHL (von-Hippel-Lindau-Protein [52]) und anschließende Polyubiquitynierung. Dieses polyubiquitynierte HIF-1 α wird innerhalb weniger Minuten proteasomal abgebaut [53].

Voraussetzung für die Bindung von pVHL an HIF-1 α ist jedoch eine Hydroxylierung eines Prolylrestes, der in Position 564, also innerhalb der O-DDD-Domäne des HIF-1 α -Moleküls steht [54,55]. Für diese oxidative Modifizierung des HIF-1 α -Moleküls ist wiederum das Vorhandensein von Sauerstoff die Voraussetzung. Unter Hypoxie unterbleibt die Prolylhydroxylierung, und ein aktiver HIF-1-Komplex kann entstehen [zur Übersicht, s. [56]].

Zwei Arbeitsgruppen konnten zeitgleich und unabhängig voneinander die entsprechenden Enzyme der Prolylhydroxylierung des HIF-1 α identifizieren (PHD, prolyl hydroxylase domain containing protein [57, 58]). Bisher wurden drei humane Enzyme kloniert und charakterisiert, die den Abbau von HIF-1 α einleiten können. Die PHD1 ist ausschließlich im Zellkern vorhanden, die PHD2 ist ein zytosolisches Protein, und die PHD3 verteilt sich homogen in Zellkern und Zytoplasma [59].

1.6 Ziel der eigenen Untersuchungen

Während der Sauerstoff-Sensor auf molekularer Ebene inzwischen recht gut charakterisiert ist, ist das systemische Zusammenspiel der verschiedenen Organe in Bezug auf die renale Synthese von Erythropoietin bisher noch nicht endgültig geklärt. Die oben aufgeführten experimentellen und klinischen Befunde geben Anlass zu der Annahme, dass der diesbezügliche Sauerstoff-empfindliche Sensor möglicherweise im Hirnstamm lokalisiert ist. Um diese Hypothese überprüfen zu können, wurde bei Ratten im Gehirn eine isolierte Hypoxie erzeugt, während der Rest des Organismus weiterhin mit ausreichend Sauerstoff versorgt wurde. Dies wurde erreicht, indem über einen Katheter in der Cisterna magna der hydrostatische Druck im Bereich des Hirnstammes so weit erhöht wurde, dass er über dem mittleren arteriellen Druck lag. Damit wurde der Transport von Sauerstoff über die Blut-Hirn-Schranke zum Hirnstamm unterbunden.

Gemäß der Hypothese wurde so der Sauerstoffsensoren im Hirnstamm einer Hypoxie ausgesetzt, auf die dieser mit der Freigabe eines oder mehrerer humoraler Faktoren reagieren sollte. Die Drücke wurden unterschiedlich lange und mit unterschiedlicher Stärke auf den Hirnstamm gegeben.

Mit den in dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen und Ergebnissen soll die Existenz eines extrarenalen Sensors und dessen Einfluss auf die renale Synthese von Erythropoietin dokumentiert werden.