

Aus der Klinik für Neonatologie der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

DIE PROTEKTIVE WIRKUNG VON ERYTHROPOIETIN IN
EINEM NEURODEGENERATIONSMODELL DER NEONATALEN
RATTE NACH HYPEROXIE EXPOSITION

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

VORGELEGT DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER CHARITÉ -
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

von

Rebekka Löber
AUS BONN

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. U. Felderhoff-Müser
2. Prof. Dr. med. I. Krägerloh-Mann
3. Priv.-Doz. Dr. med. F. Guthmann

Datum der Promotion: 08.04.2011

Danksagung

Ohne die Hilfe und Unterstützung zahlreicher Mitarbeiter, Freunde und Institutionen wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael Obladen, dem Direktor der Klinik für Neonatologie, Campus Virchow der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin, der mir den Start der Arbeit ermöglichte.

Meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Ursula Felderhoff-Müser gilt mein ganz besonderer Dank für das Überlassen des Themas und die hervorragende Betreuung. Auch in schwierigen Zeiten, wo ein Gelingen der Arbeit in den Sternen stand, hat sie durch ihren Ideenreichtum, ihre motivierenden Worte und schnellen Lösungen mir immer wieder konstruktive Wege aufgezeigt.

In besonderer Weise danke ich allen Mitarbeitern unseres Labors, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Kerstin Genz, meiner Betreuerin danke ich besonders für ihre humorvolle Art und die nette Unterstützung, die weit über das Fachliche hinausging. Frau Jessica Fassbender danke ich für die Hilfe, tierexperimentelle und histologische Methoden zu erlernen. Herrn Marco Sifringer, der guten Seele des Labors, der für jedes Problem eine Lösung parat hat, die Geduld in Person darstellt und mir mit seiner konstruktiven Kritik immer weiter geholfen hat, danke ich besonders für seine geduldige Einführung in die molekularbiologischen Methoden und die aufmunternden Worte.

Ohne Matthias Milde, der mir geholfen hat alle meine Grafiken zu bearbeiten und meine beiden Brüder Nils und Lukas Löber, die die Formatierung übernommen haben, wäre diese Arbeit immer noch eine Ansammlung von Textbausteinen. Der grüne Korrekturstift von Stefanie Heinrich wird mir noch lange in Erinnerung bleiben, vielen Dank für die wichtigen Kritikanmerkungen.

Meinen Eltern danke ich für ihre geduldige Art, mich immer wieder aufzumuntern und mich drängten, die Arbeit endlich zu vollenden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinische Problematik	1
1.2	Hyperoxie und das sich entwickelnde Gehirn	3
1.3	Apoptose	4
1.3.1	Apoptosemechanismen	5
1.3.2	Caspasen	5
1.3.3	Intrinsischer Signalweg	6
1.3.4	Extrinsischer Signalweg	7
1.3.5	Neurotrophine	9
1.4	Neuroprotektive Therapien	10
1.4.1	Erythropoietin	11
1.4.2	Erythropoietin im Gehirn	11
1.4.3	EPO-Stimulierung	12
1.4.4	EPO-Rezeptor	13
1.5	Experimentelle Studien	14
1.6	Formulierung Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Chemikalien	17
2.1.1	Puffer und Lösungen	18
2.1.2	Kits	20
2.1.3	Enzyme und Oligonukleotide	20
2.1.4	Antikörper	21
2.1.5	Geräte und Arbeitsmaterialien	21
2.2	Histologie	23
2.2.1	Perfusion, Einbettung, Schnitt	23
2.2.2	DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung	24
2.2.3	Morphometrie	24

2.2.4	Statistische Auswertung	25
2.3	Molekularbiologie	26
2.3.1	Präparation der Rattengehirne	27
2.3.2	Extraktion von Gesamt-RNA nach der sauren Guanidinthiocyanat- Phenol-Chloroform-Methode	27
2.3.3	RNA-Behandlung mit DNase I	27
2.3.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	28
2.3.5	Reverse Transkription-PCR	28
2.3.6	Quantitative Real-Time PCR von BDNF (TaqMan-PCR)	30
2.3.7	Proteinextraktion aus Gehirngewebe	32
2.3.8	Proteinbestimmung mittels BCA-Methode	33
2.3.9	Western Blot für Akt, ERK1/2, p-Akt und p-ERK1/2, Caspase-2, Caspase-3, Caspase-8 und BDNF	33
2.3.10	Immunreaktion	35
2.3.11	Entwicklung und Auswertung mittels Densitometrie	35
2.3.12	Caspase-8-Aktivitätsassay	36
2.3.13	Caspase-2-Aktivitätsassay	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Physiologische Parameter der Versuchstiere	37
3.2	Histologische Untersuchungen	37
3.3	Molekularbiologische Ergebnisse	41
3.3.1	Erythropoietin steigert Expression von BDNF	41
3.3.2	Erythropoietin verstärkt Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt	43
3.3.3	Erythropoietin reduziert Proteinexpression der Caspasen-2, -8 und -3, die durch Hyperoxie induziert werden	48
3.3.4	Bestätigung der Ergebnisse mittels Caspase-2- und Caspase-8- Ak- tivitätsassay	52
4	Diskussion	55
4.1	Allgemeine Betrachtung	55
4.2	Hyperoxie	56
4.3	EPO und BDNF	58
4.4	EPO und Akt, ERK1/2	58

4.5	EPO und Caspasen	61
4.6	Affinität des EPO-R	61
4.7	EPO und EPO-R in der Neurogenese	62
4.8	EPO als körpereigenes Schutzsystem und seine Folgen	63
4.9	Nebenwirkungen von Erythropoietin	64
4.10	EPO und die Blut-Hirn-Schranke	65
4.11	Klinische Studien mit EPO	66
5	Zusammenfassung	69
	Abkürzungsverzeichnis	71
	Abbildungsverzeichnis	73
	Tabellenverzeichnis	75
	Literaturverzeichnis	89

1 Einleitung

1.1 Klinische Problematik

Fortschritte in der Behandlung Früh- und Neugeborener sowie im Bereich der Geburtshilfe haben zu einer gesteigerten Überlebensrate der kleinen Patienten geführt. Die sinkenden Mortalitätsraten gehen jedoch mit einer erhöhten Morbiditätsrate einher, was erhebliche soziale, ökonomische und individuelle Konsequenzen zur Folge hat. Besonders unreife Frühgeborene (24. bis 28. SSW (Schwangerschaftswoche)) haben ein unverändert hohes Risiko, neurologische Folgeschäden zu entwickeln. Unter den Überlebenden von Frühgeborenen konnte die EPICure Studie aufzeigen, dass 48% der Kinder in ihrer Entwicklung an Defiziten im Bereich der motorischen Fähigkeiten und kognitiven Funktionen leiden. Ein großer Anteil dieser Kinder (23%) ist im Alter von 30 Monaten schwer beeinträchtigt und nicht in der Lage, tägliche Aktivitäten wie Essen, Sitzen und Laufen auszuüben [1, 2]. Unter den Kindern, die ein extrem niedriges Geburtsgewicht unter 1000 g aufweisen (ELBW, *extrem low birth weight*), ist im Alter von fünf Jahren nur jedes vierte Kind als innerhalb der normalen Entwicklung einzustufen und 14% leiden an Zerebralpareesen oder kognitiven Störungen [3].

Die Behinderungen der Kinder sind vielfältig: sowohl schwere neurosensorische Schädigungen wie Lähmung, Blindheit und Taubheit können genannt werden, aber auch eine relativ unkomplizierte neonatale Entwicklung kann zu Sprachstörungen, Aufmerksamkeitsstörungen, mentaler Retardierung, Lernstörungen, psychiatrischen Erkrankungen und Hyperaktivität führen. Um das sozioökonomische Ausmaß der frühkindlichen Hirnschädigung zu unterstreichen, können viele verschiedene Daten erhoben werden: ein niedriger Intelligenzquotient (IQ-Wert) unter 85 Punkten [4], die erhöhte Anzahl an Epilepsie leidender Kinder [5], das erniedrigte kognitive Leistungslevel in der Schule [6] oder ein erhöhtes Risiko für Verhaltensstörungen [7].

Bisher bleibt die Ursache der strukturellen und funktionellen Fehlentwicklung im unreifen Gehirn bei einer Vielzahl der Neugeborenen, die an Entwicklungsdefiziten leiden, unklar. Als Ursachen konnten bereits Minderperfusion, chronische Hypoxie und Ischämie

sowie intrauterine und neonatale Infektionen identifiziert werden [8, 9]. Auch Frühgeburtlichkeit an sich scheint einen Beitrag zu nachhaltigen Störungen zellulärer und subzellulärer Mechanismen sowie der genetisch programmierten Gehirnreifung zu leisten, indem zerebrale Entwicklungsprozesse und die Ausbildung von kortikalen Organisationsmustern gestört werden können [10]. Studien bei untergewichtigen Frühgeborenen haben erstmals 2001 einen Zusammenhang zwischen der neonatologischen Intensivmedizin, insbesondere der mechanischen Beatmung und dem Risiko für eine Hirnschädigung hergestellt. Die Exposition mit Hyperoxie kann zu vermehrten neurologischen Störungen führen und erhöht das Risiko für eine zerebrale Lähmung bei Kindern mit einem Geburtsgewicht zwischen 500 - 2000 g um den Faktor 2 bis 3 [11].

Die schwach ausgebildete zerebrale Autoregulation und die Bildung freier Radikale durch Sauerstoff begünstigen den Zelluntergang und die Entstehung zystischer Formationen in der weißen Substanz. Ursachen und Mechanismen für einen frühkindlichen Hirnschaden unterscheiden sich deutlich von denen im ausdifferenzierten Gehirn [12]. Verschiedene experimentelle Studien legten das Augenmerk auf die schädigende Wirkung von Sedativa [13], Antikonvulsiva [14] und Anästhetika [15] im sich entwickelnden Gehirn und zeigten eine besondere Empfindlichkeit auf, die mit einer vermehrten apoptotischen Neurodegeneration verbunden ist. Die neurotoxischen Effekte dieser Medikamente sind strikt an eine Entwicklungsperiode gebunden, die durch ein rapides Hirnwachstum und eine erhöhte Vulnerabilität charakterisiert wird. Beim Menschen beginnt diese Periode des *rapid brain growth* im letzten Trimester der Schwangerschaft und erstreckt sich bis ins zweite Lebensjahr [16, 17]. In dieser Zeit kommt es zu wichtigen neuronalen und glialen Reifungsvorgängen mit Migration und Differenzierung von Nerven- und Gliazellen, Ausbildung von Dendriten und synaptischen Verbindungen, Myelinisierung und physiologisch-apoptotischem Zelltod [18, 19, 20].

Um das Gehirn näher zu untersuchen, können Tierexperimente als Modell dienen. Viele Tiermodelle verwenden die Ratte während der vergleichbaren ontogenetischen Phase, die postnatal beginnt und die ersten drei Lebenswochen umfasst. Die maximale Hirnwachstumsgeschwindigkeit wird in der ersten Lebenswoche beobachtet, die dem neurologischen Entwicklungsstand eines Fötus der 32.- 34. SSW entspricht und daher ein gutes Modell zur Studie der Mechanismen darstellt, die zu einer Neurodegeneration in der Perinatalzeit führen können. In diesem Alter ist die germinale Matrix entwickelt, die Anlage der cerebralen kortikalen Neuronen vervollständigt und die weiße Substanz noch nicht myelinisiert [16].

1.2 Hyperoxie und das sich entwickelnde Gehirn

Medikamente, die im Erwachsenenalter als sicher und gut erforscht gelten, können im sich entwickelnden Gehirn zu einer diffusen Hirnschädigung führen und für kognitive und motorische Einbußen im späteren Alter verantwortlich sein. Sauerstoff wird als Medikament zur Reanimation, Behandlung des Atemnotsyndroms und der pulmonalen Hypertension sowie in der Herzchirurgie benutzt. Schon lange ist bekannt, dass die Exposition mit Sauerstoff bei Frühgeborenen zu Schäden in unreifen Organsystemen wie Augen und Lunge führt, indem es zur Ausbildung der Retinopathie des Frühgeborenen (ROP) und zur Pathogenese der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) beiträgt [21, 22, 23]. Eine Hyperoxie Exposition kann aber auch, wie Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, nicht nur Schäden an Lunge und Retina auslösen, sondern auch im sich entwickelnden Gehirn zu einem vermehrten apoptotischen Zelltod führen. Als Hyperoxie Exposition wird dabei der erhöhte Sauerstoffgehalt der Beatmungsluft oberhalb des Sauerstoffgehaltes von 21 % in Raumluft bezeichnet. Mögliche Ursachen hierfür könnten die limitierten antioxidativen Mechanismen und die gesteigerte Vulnerabilität unreifer Neuronen gegenüber Wasserstoffperoxid sein.

Werden sieben Tage alte Ratten über 24 Stunden einer Hyperoxie (in unseren Experimenten nutzten wir dazu 80 %-igen Sauerstoff) ausgesetzt, lässt sich histologisch eine vermehrte Anzahl an degenerierten Zellen feststellen [24]. Dabei zeigt sich, dass nach 24 Stunden die maximale Anzahl an apoptotischen Zellen erreicht ist, die auch durch eine längere Expositionsdauer nicht gesteigert werden kann. Erklärungen hierfür liegen möglicherweise in der Nichtnachweisbarkeit apoptotischer Zellen durch Abbauprozesse oder in der Aktivierung eines Toleranzmechanismus gegenüber oxidativem Stress [24].

Ein möglicher Mechanismus, der zu einer vermehrten Apoptose führen kann, ist die Produktion von freien Radikalen durch oxidativen Stress, die zu einer direkten Schädigung der Desoxyribonucleinsäure (DNA) sowie zur Schädigung der mitochondrialen Membran mit Freisetzung von Cytochrom c und Aktivierung der Caspasen führen. Auch eine Herunterregulation der Expression von Neurotrophinen wie *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *nerve growth factor* (NGF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4 (NT-4) konnte nachgewiesen werden. Dies führt zu einer Reduzierung der aktivierten Formen von *rat sarcoma* (Ras), Proteinkinase B (Akt) und *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2), die wichtige Proteine in Signalwegen, die für das Überleben der Zelle kodieren, darstellen. Auch die Kombination aus Hyperoxie mit einem Glutathionsynthese-

Inhibitor steigert die Apoptoserate und führt zu einer Abnahme der Neurotrophine [25]. Eine Exposition neugeborener Ratten mit 80%-igem Sauerstoff von Tag 1 bis Tag 5, entsprechend einem Frühgeborenen der 24. SSW führt zu einer Abnahme der neuronalen Dichte und zu einer Zunahme des neuronalen Zelltodes [26]. Aber Hyperoxie triggert auch inflammatorische Prozesse durch die Produktion von Cytokinen: Caspase-1, ein *Interleukin-1 beta converting Enzym* (IL-1 β), ist für seine Rolle sowohl in der Vermittlung von Entzündungen als auch für die Vermittlung der apoptotischen Signalkaskaden bekannt. Es katalysiert die Spaltung der Vorläuferproteine von IL-1 β und Interferon-gamma-induzierendem Faktor (IL-18) in die jeweils aktive Form. Durch Hyperoxie wird die Expression von Caspase-1, IL-1 β und IL-18 gesteigert [27].

Vergleichende experimentelle Studien mit Hyperoxie, Hypoxie oder Kombination aus beidem zeigen eine vermehrte Caspase-3-Aktivität als Zeichen der Apoptose [28]. Sirinyan *et al.* konnten zusätzlich den entscheidenden Einfluss von Hyperoxie auf die zerebrale Mikrovaskularisierung und seinen Beitrag zur verminderten Hirnleistung aufzeigen. Unter Hyperoxie kommt es zu einer Degeneration der zerebralen Mikrovaskularisierung, Abnahme der Gehirnmasse und damit einhergehenden funktionellen Defiziten [29].

Die Exposition des unreifen Gehirns mit Hyperoxie führt zu einer Veränderung der Genexpression und Phosphorylierung von wichtigen Signalwegen, die das neuronale Überleben kontrollieren. Die Vermutung liegt nahe, dass es zu einem Ungleichgewicht zwischen neuroprotektiven und neurodestruktiven Mechanismen kommt, welche sich zu Gunsten der Apoptose verschieben.

1.3 Apoptose

Der programmierte Zelltod, die Apoptose ist ein vielfältig reguliertes genetisches Programm, welches Zeit, Energie, Translation und Transkription von Genen erfordert. Die Zelle schrumpft bei intaktem Aufbau der Zellmembran zusammen und verdichtet sich. Im Nukleus kommt es zu einer Kondensierung des Chromatins und zur Bildung sogenannter Chromatinklumpen. Parallel zerfällt die Kernhülle, Nukleoplasma und Zytoplasma vermischen sich, das Cytoskelett bricht zusammen und die nukleäre DNA wird in Stücke gespalten. Beim Zerfall der Zelle entstehen die präapoptotischen Körperchen. Die Veränderung der Zelloberfläche gibt das Signal zur Phagozytose durch Nachbarzellen oder Makrophagen. Nach der Phagozytose können einzelne Bestandteile der Zelle wieder verwendet werden [30].

Die Apoptose nimmt während der Entwicklung des Zentralnervensystems eine Schlüsselrolle ein, da sie einen Regulationsmechanismus für überschüssig angelegte und unbrauchbare Neuronen darstellt. Hierbei werden Zellen eliminiert, die falsche Verbindungen geknüpft haben, überflüssig angelegt wurden oder einer früheren Entwicklungsstufe angehören. Sie ist Bestandteil der Morphogenese und Plastizität und führt zu einem optimalen Zahlenverhältnis zwischen verschiedenen Neuronenpopulationen, Neuronen und ihren Zielzellen [31, 32]. Physiologisch werden Neuronen und Gliazellen während der Hirnreifung auf die Hälfte reduziert, dabei wird Apoptose auf allen Stufen der Hirnreifung gefunden [32]. Besonders betroffen sind reife Neuronen, die bereits über Verbindungen zu afferenten und efferenten Zellen verfügen [33]. Beobachtungen legen nahe, dass es sich bei der schädigungsbedingten Apoptose im unreifen Gehirn um eine Art Überaktivierung von physiologischen Apoptosemechanismen handeln könnte [19, 34].

1.3.1 Apoptosemechanismen

Das zelleigene Apoptoseprogramm kann über zwei verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden, einerseits über die extrinsische Signalkaskade, auch rezeptorvermittelten Weg genannt oder andererseits über die intrinsische Signalkaskade, sprich den mitochondrialen Weg. Im Mittelpunkt steht die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP). Ist die Mitochondrienmembran einmal permeabilisiert, führt dies zum Absterben der Zelle, entweder durch Entsendung toxischer Mediatoren oder durch den Verlust der mitochondrialen Funktionen [35]. Die Destabilisierung der äußeren Membran führt zur Freisetzung von Proteinen der inneren Mitochondrienmembran wie Cytochrom c, die die darunter liegende Effektor-Kaskade aktivieren. Eine Änderung der Permeabilität der inneren Membran führt zu einem Anschwellen der Matrix und zur Ruptur der äußeren Membran mit Verlust der mitochondrialen Funktionen [36]. Zum Kern der mitochondrialen Apoptose-Bestandteile gehören Cytochrom c, Apoptose Protease-Aktivator Faktor 1 (APAF-1) und die Initiator-Caspase-9.

1.3.2 Caspasen

Im Zentrum des zelleigenen Tötungsprogramms steht die proteolytische Caspasen-Kaskade. Caspasen sind Enzyme, die im aktiven Zentrum Cystein enthalten und ihr Zielprotein am Aspartylrest spalten. Vierzehn wurden im menschlichen Körper identifiziert, 2/3 davon spielen eine entscheidende Rolle in der Apoptose [37]. Sie werden als Procaspasen

synthetisiert und durch andere Caspasen nach der Alles-oder-nichts- Regel aktiviert, um selektive Zielproteine für das Überleben der Zelle zu spalten oder um Proteine des Zelltodes zu aktivieren. Die Caspasen werden als eine einzige Polypeptidkette mit drei Domänen gebildet: eine 20 kDa große innen liegende Domäne, welche das aktive Zentrum mit der *death effektor domain* (DED) enthält, eine zweite 10 kDa große Domäne die sich am C-terminalen Ende befindet und als Caspase Rekrutierungseinheit (*caspase-activating recruitment domain*, CARD) bezeichnet wird und eine dritte am NH-2 Ende gelegene Pro-Domäne, welche Todesdomäne (*death domain*, DD) genannt wird und Teil der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptor-Familie ist.

Die Caspasen werden je nach Struktur und Funktion in drei Subklassen unterteilt: Gruppe 1 (Caspase-1, -4, -5) spielt eine Rolle in der Entzündungsreaktion und besitzt eine lange Pro-Domäne. Zur Gruppe 2 gehören Caspasen, die die Apoptose initiieren und entweder eine DED (Caspase-8, -10) oder eine CARD (Caspase-2,-9) besitzen. In Gruppe 3 finden sich Caspasen mit einer kurzen Pro-Domäne (Effektoren), die als *Executer* - Caspasen bezeichnet werden (Caspase-3,-6,-7) [38]. Die Kaskade kann auf zwei Wegen aktiviert werden: einerseits extrazellulär durch Bindung an einen Todes-Rezeptor, zum Beispiel CD95 oder TNF mit anschließender Aktivierung des *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) mit Caspase-8 und -10, andererseits intrazellulär über Aktivierung der Signalkaskade über das Apoptosom mit Cytochrom c, APAF-1 und Caspase-9 [39]. Die Aufgaben der Caspasen-12,-13 und -14 sind bisher nicht hinreichend geklärt [40].

1.3.3 Intrinsischer Signalweg

APAF-1 ist der einzige Aktivator der Caspase-9 und übermittelt nach Bindung mit Cytochrom c die apoptotischen Signale von der zerstörten Mitochondrienmembran zu den aktivierten Caspasen. Die Interaktion mit Cytochrom c führt zu einer dATP-abhängigen Konformationsänderung in APAF-1, die die Oligomerisation und Bindung des Apoptosom zur Folge hat. Das Apoptosom aktiviert durch Dimerisation die Initiator- pro-Caspase-9 zu Caspase-9 und führt damit zur Aktivierung von Effectorcaspasen wie Caspase-3 und -7, die die Spaltung wichtiger Substrate der Zelle einläuten [41, 42].

Die beiden wichtigsten Caspasen in der Ausführung des Zelltodprogrammes sind Caspase-3 und -9, wobei letztere die erstere aktiviert. Caspase-3 ist für die proteolytische Spaltung verschiedener Proteinsysteme verantwortlich und ein wichtiger Bestandteil des morphogenetischen Zelltodes und der normalen Hirnentwicklung. Caspase-3 *knockout*-Mäuse

sterben in den ersten drei Lebenswochen an massiven Hyperplasien im Gehirn und anderen Organsystemen [43]. Diese Beobachtungen unterstreichen die Wichtigkeit des Caspase-3/-9/APAF-1- Komplexes für die neuronale Entwicklung.

1.3.4 Extrinsischer Signalweg

Die rezeptorvermittelte Kaskade verläuft über Aktivierung von Caspase-8. Nach Bindung an den Todesrezeptor kommt es innerhalb weniger Sekunden zur Bildung des DISC, der aus dem oligomerisierten Rezeptor, dem Adapter-Molekül FADD (*Fas-associated protein with Death Domain*), zwei Isoformen der Pro-Caspase-8 (Procaspase -8/a und -8/b), der Pro-Caspase-10 und c-FLIP (*protease-deficient protein*) besteht. Eine Folge der Interaktion des Komplexes ist die Aktivierung von Caspase-8 und dessen Freisetzung ins Zytosol, wo das apoptotische Signal über Aktivierung der Caspasen-3 und -7 weiter gegeben wird [44].

Lange Zeit war die Aufgabe der Caspase-2 in der apoptotischen Kaskade ungeklärt. In einigen Zelllinien wird sie mit dem medikamenten-induzierten Zelltod in Verbindung gebracht oder als Initiator-Caspase durch zytotoxischen Stress induzierte Apoptose gesehen. Andere Arbeiten identifizieren sie als ersten Mediator in der Hitzeschockprotein-abhängigen Apoptose. Lavrik *et al.* zeigten erstmalig die Rolle der Caspase-2 in der CD95 vermittelten Apoptose an humanen B- und T- Zelllinien. Procaspase-2 ist Teil des DISC und wird nach Bindung an den Todesrezeptor innerhalb des DISC aktiviert. Die untergeordnete Rolle von Caspase-2 in der Auslösung der apoptotischen Kaskade wird durch den Ausfall der Signalübermittlung in Abwesenheit von Caspase-8 unterstrichen [45].

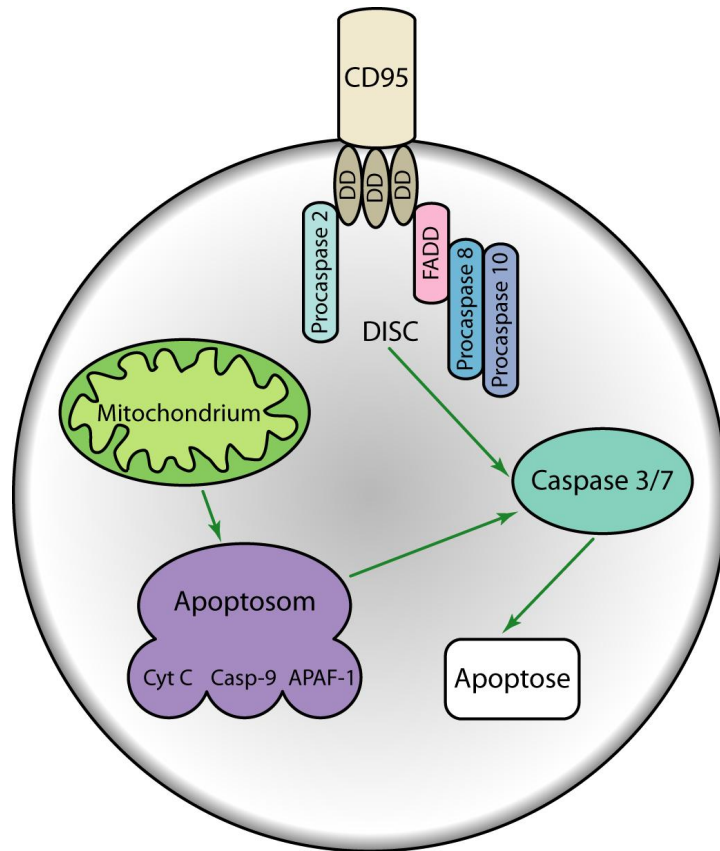


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges der Apoptose. Durch einen der Todesrezeptoren, hier CD95 wird das Signal über DISC, bestehend aus DD, Adaptermolekül FADD, der Procaspase-8 und -10, sowie der Procaspase-2 an die Effektorcaspasen-3 und -7 weitergeleitet. Der intrinsische Signalweg wird über das Mitochondrium vermittelt, aus dem Cytochrom c und APAF-1 freigesetzt werden, die zusammen mit Caspase-9 das Apoptosom bilden, welches die Effektorcaspasen aktiviert.

Neben APAF-1 und der Caspasenkaskade spielt die Bcl-2 Proteinfamilie (*B-cell lymphoma 2-family*) eine wichtige Rolle in der Steuerung der Apoptose, da sie sowohl anti- als auch pro-apoptotische Aufgaben erfüllt. Durch die Balance zwischen den Mitgliedern kann das Überleben der Zelle bestimmt werden [46]. Sie wird in drei Gruppen unterteilt: Gruppe I (Bcl-2, Bcl-xl) besitzt eine anti-apoptotische Aktivität über Hemmung der Lösung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium und über Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration [47], Mitglieder der Gruppe II und III (Bax, Bad) wirken pro-apoptotisch über Lösung von Cytochrom c [47, 48].

1.3.5 Neurotrophine

Hamburger und Levi-Montalcini formulierten 1949 erstmals die These, dass das Überleben von sich entwickelnden Nervenzellen im direkten Zusammenhang mit der Erreichbarkeit durch ihre Zielzellen steht [49]. Eine Weiterführung dieser Überlegung führte zur Neurotrophinhypothese, die besagt, dass unreife Neuronen zueinander im Wettbewerb um eine begrenzte Anzahl an Überlebensfaktoren/Neurotrophinen stehen. Nur jene Neuronen werden weiterhin mit Neurotrophinen versorgt, die erfolgreich im Etablieren korrekter synaptischer Verbindungen sind [50]. Martin *et al.* zeigte wie Neuronen sterben können: ein Entzug der Überlebensfaktoren wie NGF durch RNA- und Proteinsynthese-Blockierung führt zu einer Aktivierung des zellulären Apoptoseprogrammes [51].

Zur Familie der Neurotrophine gehören NGF, BDNF, NT-3 und NT4/5. Obwohl die Neurotrophine ursprünglich als neuronale Überlebenssignale identifiziert worden sind, werden ihnen inzwischen multiple biologische Funktionen wie Proliferation, axonaler Transport und synaptische Modulation zugeschrieben. Die Signalübertragung wird über zwei verschiedene Klassen von Plasmamembranrezeptoren vermittelt: der Tropomyosin zugehörige Kinase Rezeptor (Trk) und p75 Neurotrophin Rezeptor (p75 NTR). Dabei werden über die Neurotrophinvorstufen je nach Aktivierungsgrad pro- und anti-apoptotische Prozesse übermittelt [52]. Die anti-apoptotische Signalkaskade wird über den Trk-Rezeptor aktiviert, einen Oberflächenrezeptor mit intrinsischer Tyrosin-Kinase-Aktivität. Nach Bindung phosphoryliert Trk mehrere Tyrosinreste, die als Andockstelle für andere Moleküle, wie Phosphoinositide 3-Kinase (PI(3)K) oder die mitogen aktivierte Protein Kinase (MAPK) dienen [53].

PI(3)K liegt im Zytosol vor und kann direkt durch Bindung an den Trk-Rezeptor aktiviert werden oder indirekt über aktiviertes Ras. Es ist an der Regulierung von Akt, ein Schlüsselprotein des Zellüberlebens beteiligt [54]. Akt greift auf verschiedenste Weise in das Überlebensprogramm der Zelle ein: es unterbindet die pro-apoptotische Wirkung von Bad [55], Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK3) und Caspase-9 und beeinflusst die Transkriptionsfaktoren Forkhead (FHKRL1), *cAMP response element binding protein* (CREB) und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B). Die MAPK Kaskade wird über die Adapterproteine Shc und Ras aktiviert und beinhaltet die Phosphorylierung und Aktivierung der *rat fibrosarcoma kinase* (Raf-Kinase), MAP-Kinase/ERK-Kinase (MEK) und der extrazellulären Signalprotein-Kinase ERK1/2 [56]. Die Abnahme von Neurotrophinen führt zu einer verminderten

MAP-Kinase- und PI(3)K- Aktivität, die verschiedene metabolische Veränderungen wie eine gesteigerte Bildung von Radikalen, verminderte zelluläre Glukose-Aufnahme und RNA- und Proteinsynthese verursachen.

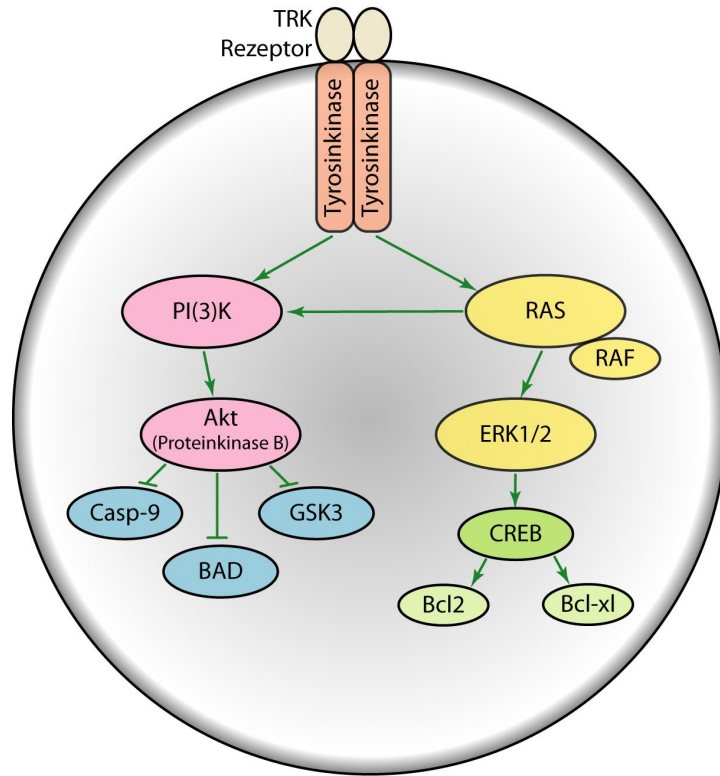


Abbildung 1.2: Signalweg der Neurotrophine über den Trk Rezeptor. Über PI(3)K wird die Proteinkinase B (Akt) aktiviert, die pro-apoptische Proteine wie Caspase-9, Bad oder GSK-3 inhibiert. Über Ras und Raf wird ein weiteres wichtiges Protein, ERK1/2 aktiviert, das über CREB anti-apoptische Proteine der Bcl-2 Familie wie Bcl-2 und Bcl-xl aktiviert.

1.4 Neuroprotektive Therapien

Neue Arbeiten beschreiben protektive Maßnahmen wie Caspaseinhibitoren, die sich auf die Unterbrechung der apoptotischen Kaskade geschädigter ZNS-Zellen fokussieren [57]. Andere Substanzen wie Magnesium, Fruktose-1-6-biphosphat, Antioxidantien, Allopurinol und NO-Inhibitoren (NG-nitro-L-Arginin) konnten im Tiermodell neuroprotektive Effekte erzielen [58]. Auch Wachstumsfaktoren des hämatopoetischen Systems können seit einiger Zeit ihre anti-apoptische Wirkung unter Beweis stellen. Zu diesen zählt als wichtigster Faktor das Erythropoietin.

1.4.1 Erythropoietin

Erythropoietin wird seit seiner Einführung als rekombinantes EPO (rEPO) in den neunziger Jahren vielfältig eingesetzt. Es ist Bestandteil der Therapie von einer Vielzahl an Erkrankungen wie Anämien bei Nierenversagen, Karzinomen, nach Knochenmarkstransplantation, chronisch entzündlichen Erkrankungen und HIV-Infektionen. In der Kinderheilkunde wird EPO zur Therapie der Frühgeborenen-Anämie verwendet. Die Therapie mit 500IE/kg/Woche in Kombination mit Eisen führt zu einer Abnahme der Transfusionsanzahl und dem zu transfundierenden Blutvolumen [59, 60]. Die neuroprotektive Aktivität von EPO ist schon seit 15 Jahren bekannt, als man herausfand, dass Patienten, deren Anämie mit EPO behandelt wurde, eine verbesserte neuromuskuläre Funktion aufwiesen [61]. Verschiedene Wirkweisen könnten dabei zur Neuroprotektivität beitragen: Beschränkung der Produktion von reaktivem Sauerstoff und Glutamat, Modulation von Entzündungen und Immunantwort, direkte vasoaktive Effekte wie die Umkehr von Vasospasmen, Stimulierung der Angiogenese, Rekrutierung von Stammzellen und Abnahme der Apoptose [58, 62, 63].

EPO ist ein Glykoprotein, das sich aus 165 Aminosäuren zusammensetzt, an die vier Kohlenhydratketten gebunden sind. Sein Gewicht beträgt ca. 34 kDa und es besteht zu 60 % aus Aminosäuren und zu 40 % aus Kohlenhydraten. Die Sekundär- und Tertiärstruktur von EPO entsteht durch 5 Helices mit 2 Disulfidbrücken. Durch die Bindung an den spezifischen Oberflächenrezeptor EPO-R bewirkt EPO seine hämatopoetischen Eigenschaften durch Proliferation und Ausreifung von Blutvorläuferzellen. Der Reifungsprozess vom Proerythroblasten bis zum Retikulozyten wird durch den Einfluss von EPO von 5 auf 2 Tage verkürzt.

Der Sauerstoffgehalt des Gewebes, sprich ein Absinken des O_2 -Partialdruckes, dient als wichtiger Modulator der Erythropoietinkonzentration im Blut und damit der Erythropoese. Wichtigstes Regulationsmodul für die endogene EPO-Synthese ist der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF-1), ein Transkriptionsfaktor, der an eine achtbasige Sequenz der DNA in der Enhancerregion von EPO bindet und zu einer vermehrten Gentranskription führt [64].

1.4.2 Erythropoietin im Gehirn

Früher wurde angenommen, dass die Bildung von EPO ausschließlich in der fetalen Leber und der adulten Niere erfolgt. Digicaylioglu fand den ersten Beweis für seine mögliche

Neuroprotektivität durch Entdeckung von EPO und EPO-R im zentralen Nervensystem von Mäusen [65]. Nagai erweiterte dieses Erkenntnis um den Nachweis von EPO/EPO-R im menschlichen Gehirn [66]. Im Gehirn produzieren und exprimieren verschiedene Zelltypen wie Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten und Endothelzellen EPO und EPO-R. Die Expression und Verteilung von EPO und EPO-R verändert sich dabei signifikant während der Hirnreifung und wird zu deren Ende hin ausdifferenzierter [67, 68]. Fünf bis sechs Wochen nach der Empfängnis kann EPO-R erstmalig nachgewiesen werden. Die Expression nimmt im Laufe der Gehirnreifung zu und bis zum Termin der Entbindung wieder ab [67]. Dagegen steigt die Produktion von EPO im menschlichen Nervensystem während der Reifung an und reduziert sich erst nach der Geburt [69]. EPO-R *knock-out*-Mäuse zeigen eine verminderte Anzahl an neuronalen Stammzellen, eine Abnahme der Neurogenese, eine verstärkte Apoptose in Gehirn, Herz und Leber, sowie Organanomalien [70]. Die Vermutung liegt nahe, dass das EPO/EPO-R-System sowohl einen entscheidenden Teil zur Gehirnreifung, Neurogenese, Ontogenese als auch zur endogenen Neuroprotektion beiträgt [71, 72].

1.4.3 EPO-Stimulierung

Ähnlich dem hämopoetischen System dient HIF-1 auch im ZNS als zellulärer Sauerstoffsensormechanismus, der bei abnehmenden O_2 -Partialdrücken mit der Transkription und Translation von EPO antwortet. Vier Stunden nach einem hypoxischen Ereignis zeigt sich im Gehirn ein Maximum EPO mRNA, welches über 24 Stunden anhält, im Vergleich zu einem EPO mRNA-Anstieg nach 2 Stunden im Gewebe, der über 8 Stunden anhält [73]. Auch metabolische Entgleisungen wie Hypoglykämie oder starke neuronale Depolarisation können als Reiz dienen, die Genexpression von EPO zu erhöhen. Pro-inflammatorische Zytokine wie $TNF-\alpha$ und $IL-1\beta$ und möglicherweise EPO selbst können ebenfalls die Expression von EPO-R regulieren [74, 75]. Ein fokaler ischämischer Hirnschaden bei Mäusen führt zu einer signifikanten Steigerung der Expression von EPO und EPO-R in Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen [76]. In Kulturen neuronaler Zellen des Hippocampus sind EPO und EPO-R durch Hypoxie induzierbar [77]. Ein hypoxisch-ischämischer Insult im neonatalen Rattengehirn steigert die Expression von EPO und EPO-R [75], permanente Ischämie aktiviert EPO-R [78].

1.4.4 EPO-Rezeptor

Der EPO-Rezeptor gehört zur Superfamilie der Zytokinrezeptoren. Er besteht aus einer einzigartigen Alpha-Untereinheit, die für die Vermittlung der Erythropoese erforderlich ist, und einer gewöhnlichen Beta-Untereinheit (β cR), auch CD 131 genannt, die Rezeptorfunktionen für den Granulozyten-Makrophagen-Stimulierungsfaktor und IL-3 und -5 übernimmt [79, 80]. Aktuelle Daten unterstützen das Konzept, das EPO-R und β cR zusammen einen Heterorezeptorkomplex bilden, der durch Bindung von EPO homodimerisiert und seine gewebeschützenden Wirkungen entfaltet [80]. Über diesen Komplex wird eine Vielzahl von potentiellen protektiven Wirkungen vermittelt: antioxidative Effekte über die Aktivierung von antioxidativen Enzymen und Hemmung der Lipidperoxidation, Hemmung der NO-Produktion, Stimulierung der Angiogenese, Modulation der Neurogenese, Reduktion der Glutamat-Toxizität und Inflammation sowie Hochregulierung der anti-apoptotischen Kaskade [58].

Verschiedene Mechanismen scheinen zur neuroprotektiven Wirkung beizutragen. EPO ist in die Vermittlung der anti-apoptotischen Signalwege durch die Aktivierung des Janus-Kinase-Signalweges (JAK-2) eingebunden und induziert damit eine Vielzahl von nachfolgenden Signalwegen wie NF- κ b, PI(3)K und MAPK. Zusätzlich kommt es zu einem Anstieg der Expression der Neurotrophine [81, 82]. Dabei sind in Neuronen die selben intrazellulären Signalkaskaden wie in den hämatopoetischen Zellreihen zu finden. Über PI(3)K mit seiner Signalkaskade über Akt und über MAPK mit seiner Kaskade über ERK1/2 werden Schlüsselkomponenten des Zellüberlebens aktiviert und das Apoptoseprogramm inhibiert.

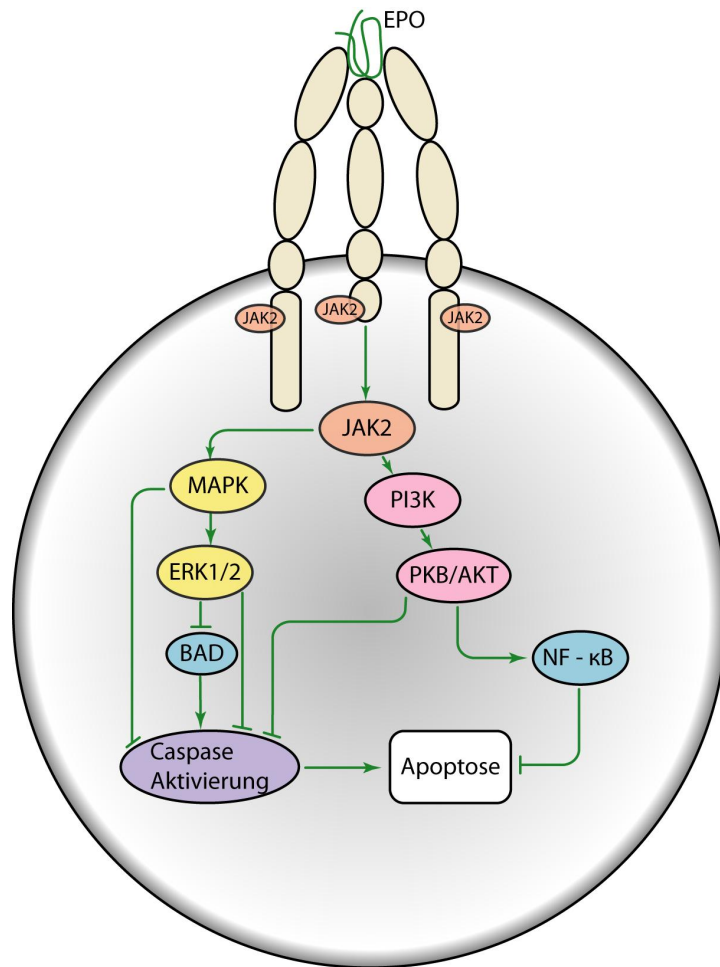


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Signalwege von EPO. Im Zentrum der Signalübermittlung steht die JAK-2, die zwei wichtige Signalwege aktiviert. Über MAPK kann sowohl direkt die Caspase-Aktivierung unterbunden werden als auch die Signalkaskade über ERK, die den proapoptotischen Faktor BAD (Teil der Bcl-2 Familie) und die Caspase-Aktivierung inhibiert. Über PI(3)K wird mit Akt direkt die Caspasen-Aktivierung negativ beeinflusst und NFκ b aktiviert.

1.5 Experimentelle Studien

Studien der letzten Jahre mit verschiedenen experimentellen Schädigungsmodellen zeigen die Rolle von EPO als potenten Promoter für neuronales Überleben durch Verminderung der neuronalen Schädigung, entstanden durch Ischämie, metabolischen, neurotoxischen oder exzitotoxischen Stress. Für das adulte Gehirn gibt es eine Vielzahl an Studien, im sich entwickelnden Gehirn ist bisher sehr viel weniger über die schützende Wirkung von EPO bekannt.

In vitro beschützt EPO kortikale und hippocampale Neuronen vor der Toxizität von Glutamat, hypoxischer und ischämischer Schädigung [77, 83]. Nach einem ischämischen Hirnschaden bei Nagetieren verminderte die exogene Gabe von EPO das Ausmaß des Schadens durch Abnahme der degenerierten Zellen und Reduzierung der Einschränkungen der Lernfähigkeit [84].

Im Rattenmodell kann neben der verbesserten funktionalen Wiederherstellung eine gesteigerte Neurogenese und Angiogenese beobachtet werden [85]. Auch im Modell der traumatischen Hirn- oder Rückenmarksschädigung wird eine potente Neuroprotektion nach der Applikation von EPO beobachtet [86].

In einem Modell der Subarachnoidalblutung im Kaninchen reduziert die EPO-Gabe die Sterblichkeit, fördert das Wiedererlangen der motorischen Funktionen [87] und mindert den Verlust der Autoregulation in zerebralen Blutgefäßen [88].

Studien am sich entwickelnden Gehirn reduzieren sich auf wenige Schädigungsmodelle: nach einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kann durch die Applikation von EPO eine Reduzierung des Gehirnschadens und langfristig eine Verminderung der sensomotorischen Defizite erreicht werden [89]. Im neonatalen Schlaganfall Modell der Ratte wird durch die Gabe von EPO neben der Reduzierung des Infarktareals und Infarktolumens die Apoptoserate gesenkt und das funktionale Outcome verbessert [90, 91]. Zusätzlich moduliert EPO verschiedene anti-inflammatorische Prozesse: durch EPO-Gabe wird die Rekrutierung der Leukozyten und Microglia in Infarktarealen reduziert und die Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen vermindert [92].

Aber EPO wird nicht nur eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen, sondern es kann auch die Verletzung durch Ischämie und Reperfusion im Herzen beeinflussen: Reduktion der Apoptose von Myozyten in der Post-Infarkt-Phase sowie der Infarktausdehnung und Hyperthrophie von Myozyten [93].

1.6 Formulierung Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Auswirkung von Hyperoxie auf das sich entwickelnde Gehirn im Bezug auf unterschiedliche Schädigungsmechanismen und die Erforschung einer möglichen Neuroprotektion durch Erythropoietin.

Dazu werden die Effekte verschiedener Erythropoietinkonzentrationen (10.000 IE/ kg KG und 20.000 IE/ kg KG) im Hyperoxiemodell unter histologischen Gesichtspunkten miteinander verglichen, um eine optimale Dosierung für eine mögliche Neuroprotektion zu ermitteln.

Zusätzlich wird untersucht, inwieweit die Exposition mit Hyperoxie zu einer vermehrten neurodegenerativen Entwicklung durch eine Aktivierung der Caspasen als Teil der apoptotischen Signalkaskade beiträgt. Zur Klärung werden die Effektorcaspase-3 sowie die Initiatorcaspasen-2 und -8 als Teil der rezeptorvermittelten Signalkaskade auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Besteht eine mögliche Neuroprotektion durch EPO, indem die Steigerung der Apoptose vermittelt über die Caspasen reduziert oder gar aufgehoben wird. Die Auswirkung von Hyperoxie auf Neurotrophinebene mit Abnahme der BDNF-Expression und konsekutiver Abnahme der schützenden Signalkaskaden über p-Akt und p-ERK1/2 ist bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe dargestellt worden. An dieser Stelle soll die Einflussnahme von EPO auf Neurotrophinebene unter Hyperoxie Exposition untersucht werden. Dabei wird die Genexpression von BDNF auf mRNA und Proteinlevel sowie die Proteinexpression der nachfolgenden schützenden Signalkaskaden über die phosphorylierten Formen von Akt und ERK1/2 eingehend analysiert. Anhand molekularbiologischer Verfahren werden auf Gen- und Proteinebene Tiere unter hyperoxischen Bedingungen mit Tieren verglichen, die mit EPO behandelt wurden.

Diese Untersuchungen sollen helfen, die zentrale Frage zu klären, ob Erythropoietin ein geeignetes Mittel darstellt, um die vielfältigen schädigenden Auswirkungen von Hyperoxie auf das sich entwickelnde Gehirn zu vermindern und welche Mechanismen dadurch beeinflusst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Agar	EMS, Fort Washington, USA
Agarose (Standard)	Qbigone, Straßburg, Frankreich
Allantoin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumhydroxid	Fluka, Buchs, Schweiz
APS	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Steinheim
Cacodylat pH 7,4	Sigma, Steinheim
Chloralhydrat	Braun, Ingelheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronensäure	Sigma, Steinheim
p-Coumarsäure	Amersham, Buckinghamshire, UK
DTT	Sigma, Steinheim
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Serva, Heidelberg
Erythropoietin	Rosch, Schweiz
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Riedel-de Haen, Seelze
Gelantine	EMS Fort Washington USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hyperfilm ECL	Amersham, Buckinghamshire, UK
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Kaliumchromsulfat	Sigma, Steinheim
Kaliumferrizyanid	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kupferniträt	Sigma, Steinheim

Luminol	Amersham, Buckinghamshire, UK
β -Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid 0,9%	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumfluorid	Fluka, Buchs, Schweiz
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Steinheim
Natriumthiosulfat	Sigma, Steinheim
Natriumtetraborat	Sigma, Steinheim
Nitrozellulosemembran	Schleicher&Schuell Bioscience, Dassel
NP40	Fluka, Buchs, Schweiz
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilch	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCR- H_2O	dd H_2O autoklaviert
Permout Mounting Medium	EMS Fort Washington, USA
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
PMSF	Fluka, Buchs, Schweiz
Pyridin	Sigma, Steinheim
SDS	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Linde, Berlin
Temed	Serva, Heidelberg
Triton x-100	Sigma, Steinheim
TRIS (ultra)	Serva, Heidelberg
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz

Tabelle 2.1: Chemikalien

2.1.1 Puffer und Lösungen

Die im folgenden aufgeführten Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, mit d H_2O hergestellt.

Bezeichnung	Inhalt
Auftragspuffer A (für Agarosegele)	0,1 % Bromphenolblau, 10 mM EDTA, 60 % Glycerin, 100 mM Tris-HCL
Boratpuffer (pH 8,5)	20 mM Borsäure, 50 mM Natriumtetraborat

2 Material und Methoden

Gelantine Medium		0,3 % Gelantine, 0,03 % Kaliumchromsulfat
ECL Lösung I		2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Coumarsäure, 100 mM Tris-HCL (pH 6,8)
ECL Lösung II		100 mM Tris-HCL (pH 6,8)
Kupfer-Silber-Lösung (DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung)	(DeOlmos-)	0,0064 % Allantoin, 0,04 x Boratpuffer, 0,07 % Ethanol, 0,0064 % Kupfernitratt, 0,04 % Pyridin, 0,64 % Silbernitrat
Lämmli-Puffer		0,1 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin, 5 % β - Mercaptoethanol, 2 % SDS, 0,125 M Tris-HCL (pH 6,8)
Laufpuffer		14,4 Glycerin, 3,1 Tris, 1 SDS
5 %-Magermilchlösung		5 % Magermilch in TBST
10x PBS (pH 7,4)		81 mM di-Natriumhydrogenphosphat, 9 % Natriumchlorid, 19 mM Natriumdihydrogenphosphat
4x Trenngelpuffer pH 8,8 (Western Blot)		18,16 Tris, 0,4 SDS
4 x Sammelgelpuffer (Western Blot)		6,06 Tris, 0,4 SDS
10x Taq DNA Olymerase-Puffer		2 % BSA, 0,5M Kaliumchlorid, 1 % Triton
Taq Core Kit		x-100, 0,1 Tris-HCL (pH 9), 15 mM Magnesiumchlorid
Transferpuffer		0,58 Tris, 0,293 Glycerin, 20 Methanol
TBS-Tween		150 mM Natriumchlorid, 0,1 % Tween 20, 10 mM Tris-HCL (ph7,4)
Reduktionslösung (DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung)	(DeOlmos-Kupfer-)	0,007 % Citronensäure, 10 % Ethanol, 0,04 % Formaldehyd
RIPA-Puffer		0,5mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5% Natriumdeoxycholatt, 1 mM PMSF, 20 mM Natriumfluorid, 1 % NP40, 1 mM Natriumorthovanadat, 0,1 % SDS in 1x PBS (pH 7,4)
Silber Diamin Lösung (DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung)	(DeOlmos-)	0,13 M Ammoniumhydroxid, 0,1 % Natriumhydroxid, 10 % Silbernitrat
TAE-Laufpuffer		10 mM EDTA, 2,3 % Essigsäure, 0,5 M Tris

Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen

2.1.2 Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Caspase-8 Aktivitätsassay	Sigma, Steinheim
Caspase-2 Aktivitätsassay	Chemicon, Bad Schwalbach
Micro-Bicinchoninsäure-Assay	Interchim, Montlucon, Frankreich
peqGOLD RNA-Pure	Peqlab, Erlangen
Taq Core Kit	Qbiogene, Straßburg, Frankreich
TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents (18S rRNA)	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG	Applied Biosystems, Darmstadt
Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell System	Bio-Rad, München

Tabelle 2.3: Kits

2.1.3 Enzyme und Oligonukleotide

Bezeichnung	Bezugsquelle
DNase I, RNase frei	Boehringer, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promegan, Mannheim
Oligo(dT) Primer	Promegan, Mannheim

Tabelle 2.4: Enzyme und Oligonukleotide

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
β -Aktin (monoklonaler Mausantikörper)	Sigma, Steinheim
BDNF (polyklonaler Kaninchenantikörper)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
p-Akt (polyklonaler Kaninchenantikörper)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Akt (polyklonaler Kaninchenantikörper)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
p-ERK 1/2 (polyklonaler Kaninchenantikörper)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
ERK 1/2 (polyklonaler Kaninchenantikörper)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Caspase-2 (polyklonaler Kaninchenantikörper)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Caspase-3 (polyklonaler Kaninchenantikörper)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Caspase-8 (polyklonaler Kaninchenantikörper)	Chemicon International, Cary, USA

Tabelle 2.5: Antikörper

2.1.5 Geräte und Arbeitsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plates und MicroAmp Optical Caps	Applied Biosystems, Darmstadt
Blotting Box	Biometra, Göttingen
Blot Paper Extra thick Protean XL Size	Bio-Rad Laboratories, München
Chirurgische Instrumente	EMS, Fort Washington, USA
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Entwicklungsmaschine X-OMAT 5000RA	KODAK, Stuttgart
Feinwaage MC 210S	Sartorius, Göttingen
GelBond PAG Film (21 x 21,3 cm)	Serva, Heidelberg
Geldokumentationssystem	BioDocAnalyse Biometra, Göttingen
Gelfilmträgerfolien Gel-Fix for PAG	Serva, Heidelberg
Glasplatten	Diagen, Hilden
Homogenisationsgefäß	VWR International, Darmstadt

2 Material und Methoden

Horizontales Elektrophoresesystem	Easy Cast AGS, Heidelberg
Hypercassette TM	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm TM (ECL)	Amersham Biosciences, Freiburg
Injektionskanülen (Butterfly)	B. Braun, Melsungen
Inkubationsbox Perfect Western TM	GenHunter, Nashville, USA
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Laborwaage BL 1500S	Sartorius, Göttingen
Leuchtkasten	Roth, Karlsruhe
Lichtmikroskop BX60	Olympus, Hamburg
Magnetrührer MR3001	Heidolph, Kelheim
Mikrotom VT 10000 S	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroplattenreader	Perkin Elmer, Weiterstadt
Mini-PROTEAN®3-Gelsystem	Bio-Rad Laboratories, München
Nitrocellulosemembran	Schleicher + Schuell Biosciences, Dassel
Objektträger	Roth, Karlsruhe
PCR-Thermocycler Gene Amp-PCR System	Elmer, Weiterstadt
Perfect Western TM	GenHunter, Nashville, USA
pH-Meter GPHR 1400A	Greisinger, Regenstauf
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage MC 210S	Sartorius, Göttingen
Protean BA 83, Nitrocellulosemembran	A. Hartenstein, Würzburg
Schüttelinkubator Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Schütteltisch Stovall Belly Dancer	Castle Scientific, Emersacker
Semi Dry Blot Anlage Trans-Blot SD	BioRad, München
Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Spektralphotometer Ultraspec® III	Pharmacia, Freiburg
Stereotaktisches Gerät	David Kopf Instruments, Tujunga, USA
Taumel-Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen
Trans-Blot-SD-System	Bio-Rad Laboratories, München
Transportinkubator T 1500	MEDAP, Hanau
Umlufttrockenschrank UT 6000	Heraeus, Hanau
Vortexgerät REAX 2000	Heidolph, Kelheim
Zentrifugen 5804 und 5417C	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 2.6: Geräte und Arbeitsmaterialien

2.2 Histologie

Für die histologischen Versuche verwendeten wir sechs Tage alte Han Wistar Ratten. Die Tierlieferung erfolgt durch das FEM (Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin) Steglitz, Berlin. Die Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien zu Tierversuchen der Humboldt Universität, Berlin durchgeführt.

Für die histologischen Methoden erhalten die Tiere nach unten stehendem Schema intraperitoneal zum Zeitpunkt 0 Erythropoietin mit einem Injektionsvolumen von 0,1 ml/10 g Körpergewicht in den verschiedenen Dosierungen oder als Kontrolle die äquivalente Menge an Natriumchlorid 0,9 % (NaCl).

7 Tiere	NaCl 0,9 %	24 h Normoxie 21 % O_2	DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung
12 Tiere	10.000 IE EPO	24 h Hyperoxie 80 % O_2	
11 Tiere	20.000 IE EPO		
8 Tiere	NaCl 0,9 %		

Tabelle 2.7: Versuchsaufbau für die histologischen Untersuchungen

Nach der Injektion werden die Jungtiere nach kurzer Karenz wieder zu ihrer Mutter zurückgesetzt, um den Stress so gering wie möglich zu halten und um einer Hypothermie vorzubeugen. Die Wurfgröße beträgt zwischen neun und fünfzehn Wurfgeschwistern und das Gewicht der einzelnen Tiere liegt zwischen 12 g und 16 g. Nach der Behandlung mit EPO oder NaCl 0,9 % werden die Tiere über 24 Stunden bei Hyperoxie mit 80 % O_2 im Inkubator belassen oder als Kontrolle mit der Mutter bei Raumluft (21% O_2) gehalten. In der Behandlung aller Tiere gab es keine Unterschiede.

2.2.1 Perfusion, Einbettung, Schnitt

Die Versuchstiere werden 24 Stunden nach Versuchsbeginn und Exposition mit Sauerstoff sowie Behandlung mit EPO mit einer hochdosierten Gabe von Chloralhydrat betäubt und nach chirurgischer Eröffnung des Thorax über eine in die Aorta vorgeschobene stumpfe Kanüle mit einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung mit 2 % Cacodylat perfundiert. Nach der Perfusion werden die Gehirne aus den Schädeln präpariert und bis zur Färbung in 4 %-iger Paraformaldehydlösung mit 2 % Cacodylat bei 4°C gelagert.

Für die DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung werden die Gehirne nach dreitägiger Nachfixierung in Agar eingebettet und an einem Mikrotom mit vibrierendem Messer koronar

in $70\mu\text{m}$ dünne Scheiben geschnitten. Jeder fünfte Schnitt wird für die Färbung ausgewählt. Nach nochmaliger Nachfixierung über 2 Tage in 4%-iger Paraformaldehydlösung können die Schnitte nach dem DeOlmos Protokoll gefärbt werden.

2.2.2 DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung

Die von DeOlmos entwickelte Kupfer-Silber-Färbung zeigt unabhängig vom Pathomechanismus degenerierende Axone und Neuronen auf, die sich bei mikroskopischer Untersuchung dunkelbraun bis schwarz vom übrigen bernsteinfarbenen Hintergrund abheben. Sie beruht auf einer Reaktion des Axoplasmas von degenerierenden Neuronen mit dem Silbersalz, welches durch die durchlässig gewordene Zellmembran der geschädigten Neurone in die Zellen eindringen kann. Sie ist kostengünstig und leicht durchführbar und eignet sich besonders gut für Screeninguntersuchungen und für Experimente, bei denen eine große Fallzahl benötigt wird. Sie sagt jedoch nichts über den Pathomechanismus aus, der zu der neuronalen Degeneration geführt hat, sondern nur, dass Zellen zu Grunde gegangen sind [94, 95]. Als Bestätigung dafür, dass dieser neurodegenerative Prozess tatsächlich dem physiologischen aktiven Zelltod gleicht und somit apoptotischer Natur ist, wurden in früheren vergleichenden Arbeiten lichtmikroskopische Verfahren in Form der TUNEL-Färbung und elektronenmikroskopische Untersuchungen angewendet.

Zunächst werden die Schnitte bei Dunkelheit 48 bis 72 Stunden in einer Kupfer-Silber-Lösung inkubiert. Nach der Reinigung mit reinem Aceton erfolgt die 35-minütige Inkubation mit Silber-Diamin Lösung. Unter Agitation werden die Schnitte in der Lösung aus Ethanol, Formaldehyd und Zitronensäure reduziert. Dann werden sie einzeln mit 0,3% Kaliumferrizyanidlösung gebleicht. Zweimaliges Waschen mit zweifach destilliertem Wasser stellt die Vorbereitung zur abschließenden Stabilisierung des Färbeergebnisses über eine Minute mit 0,1% Natriumthiosulfatlösung dar. Die Präparate werden anschließend mit Hilfe eines Gelatine-Mediums auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe können die Präparate mit Hilfe von Paramount-Medium mit Deckgläsern versehen werden.

2.2.3 Morphometrie

Auch in der physiologischen Entwicklung zeigt das infantile Rattengehirn histologisch nachweisbare Apoptose. Um diese von artifiziell erzeugten Läsionen zu unterscheiden, ist eine genaue Quantifizierung des Ausmaßes der Apoptose notwendig. Die stereologische

Dissektionsmethode (*unbiased stereological dissector method*) ist für diese Untersuchung gut anwendbar. Darunter ist die Aufteilung eines großen Gewebeblockes in kleine, zählbare Untereinheiten zu verstehen. Diese Fragmente werden mit Hilfe eines fixen Zählrahmens von 0,05 x 0,05 mm ausgezählt. Dieser Zählrahmen gibt die Ausdehnung in einer Ebene vor. Die dritte Dimension, die zur Beurteilung eines dreidimensionalen Objektes notwendig ist, wird durch die Dicke des Schnittes bestimmt, die in diesem Fall 0,07 mm betrug. Das Ergebnis dieser ausgezählten Untereinheit wird mit der Gesamtzahl aller Untereinheiten multipliziert. Als Endresultat erhält man die Zellzahl in einem bestimmten Gewebevolumen. Der Zusatz *stereological dissector* bedeutet, dass man mit dem Mikroskop den Schnitt in verschiedenen Ebenen fokussiert. Innerhalb einer Hirnregion werden zufällig acht Felder ausgesucht und ausgezählt. Die Dichte an degenerierenden Zellen wird für die einzelnen ausgezählten Regionen ausgewiesen und dann mit den einzelnen Zelldichtewerten zu einer Gesamtmenge summiert [96].

2.2.4 Statistische Auswertung

Die Auszählung der Präparate, die mit der DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung angefertigt wurden, erfolgt blind und wurde initial durch erfahrene Untersucher kontrolliert. Das Endresultat wird als numerische Neuronendichte angegeben (degenerierte Neurone pro Kubikmillimeter). Folgende 13 Hirnregionen flossen in die Auswertung mit ein: Subikulum, Nukleus caudatus, lateraldorsaler, mediodorsaler und ventraler Thalamus, frontaler Kortex (Lamina 2 und 4), Gyrus cinguli (Lamina 2 und 4), parietaler Kortex (Lamina 2 und 4) und retrosplenialer Kortex (Lamina 2 und 4). Die Ergebnisse der Einzelzählungen jeder Region werden gemittelt. Die Unterschiede zwischen den ermittelten Gesamtmengen der Versuchsgruppen kann mit Hilfe des Student's t-Tests auf ihre Signifikanz hin überprüft werden. Die Auswertung der ermittelten Dichtewerte in den einzelnen Regionen ermöglicht durch Ermittlung eines jedem Hirn entsprechenden Gesamtscores untergegangener Zellen einen direkten Vergleich zwischen den Tieren der einzelnen Versuchsgruppen (Hyperoxie-Exposition und EPO-Behandlung).

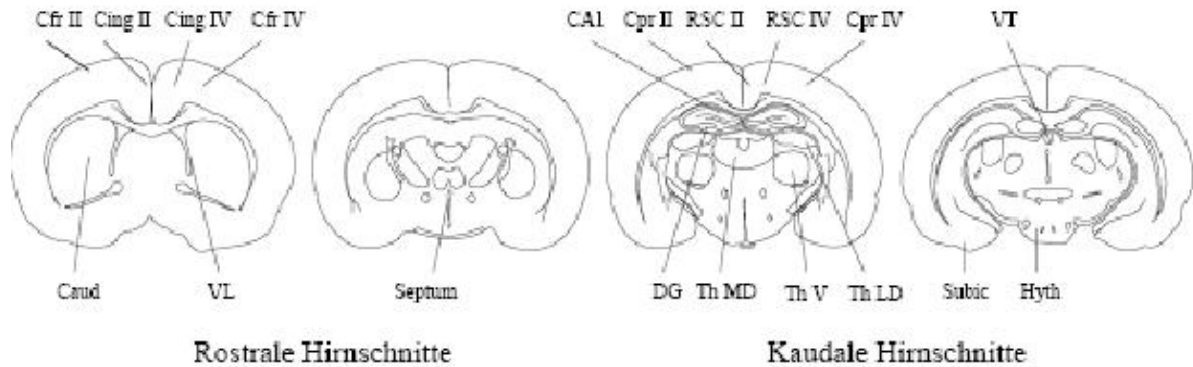


Abbildung 2.1: *ausgezählte Hirnregionen in den rostralen und kaudalen koronaren Hirnschnitten*

2.3 Molekularbiologie

Für die molekularbiologischen Versuche werden 5 Gruppen angelegt, die die Zeitstufen 2, 6, 12, 24 oder 48 Stunden abdecken. Jede dieser Übergruppen wird in zwei Untergruppen mit jeweils 6 Han Wistar Ratten im Alter von sechs Tagen unterteilt, die zusammen mit der Mutter in Hyperoxie (80 % O_2) inkubiert werden und vorher entweder Erythropoietin (20.000 IE/kg) oder als Kontrolle 0,9 % NaCl (0,1ml NaCl 0,9 % pro 10g Körpergewicht) intraperitoneal erhalten. Als Kontrolle dienen 6 Tiere, die über 24 Stunden Normoxie (21 % O_2) ausgesetzt worden sind. Nach unseren histologischen Ergebnissen haben wir uns für die molekularbiologischen Untersuchungen für die Erythropoietin Dosierung von 20.000 IE/kg entschieden, da diese eine gute Wirkung bezüglich der Reduzierung der apoptotischen Zellen aufzeigen konnte.

Die Ratten werden nach aufgeführtem Schema behandelt und zu den verschiedenen Zeitpunkten dekapitiert. Bei dem Teil der Tiere, die über 48 Stunden mit Hyperoxie behandelt werden, musste die Mutter nach 24 Stunden ausgewechselt werden, um ein Sterben der Mutter an einem Atemnotsyndrom zu verhindern.

6 Tiere	6 Tiere	6 Tiere	6 Tiere	6 Tiere
2 h Hyperoxie	6 h Hyperoxie	12 h Hyperoxie	24 h Hyperoxie	48 h Hyperoxie
2 h Hyperoxie mit EPO	6 h Hyperoxie mit Epo	12 h Hyperoxie mit EPO	24 h Hyperoxie mit EPO	48 h Hyperoxie mit EPO

Tabelle 2.8: Versuchsaufbau für die molekularbiologischen Untersuchungen

2.3.1 Präparation der Rattengehirne

Die Tiere werden dekapitiert und das Gehirn mit einem Spatel und einer Pinzette vorsichtig herauspräpariert. Anschließend werden die Gehirne in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3.2 Extraktion von Gesamt-RNA nach der sauren Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode

50- 100 mg der gefrorenen Hirnhälften werden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 0,8 ml peqGOLD RNA-Pure versetzt und anschließend durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert, sowie für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Ansätze werden mit 160 ng Chloroform gemischt und für 15 Sekunden auf dem Vortex geschüttelt. Nach Inkubation bei RT für 10 Minuten werden die Ansätze bei 12000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wird abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von $500\ \mu\text{l}$ Isopropanol und Inkubation bei RT über 15 Minuten wird die Gesamt- RNA präzipitiert. Die Ansätze werden dazu erneut bei 12000 g zentrifugiert und das nach Entfernen des Überstandes zurückbleibende RNA-Präzipitat wird zweimalig mit 75 %-igem Ethanol gewaschen, anschließend für 30 Minuten Luft getrocknet und nach Verdünnung mit $30\ \mu\text{l}$ PCR- H_2O bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit wird ein Aliquot im UV-Spektralphotometer bei 260 und 280 nm vermessen.

2.3.3 RNA-Behandlung mit DNase I

Um nach der Extraktion der RNA sicher auszuschließen, dass die gewonnenen Proben keine chromosomale DNA mehr enthalten, findet die Behandlung mit DNase I nach folgendem Ansatz statt. Danach werden die Proben für eine Stunde bei 37°C gelagert.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Gesamt-RNA	$x\ \mu\text{l}$	$1\ \mu\text{g}$
DNase I ($10\ \text{U}/\mu\text{l}$)	$2\ \mu\text{l}$	$0,8\ \text{U}/\mu\text{l}$
5x Reaktionspuffer	$5\ \mu\text{l}$	1 x
5x Reaktionspuffer	add $25\ \mu\text{l}$	-
Σ	$25\ \mu\text{l}$	-

Tabelle 2.9: Ansatz DNase-Behandlung

Nach Entfernung der DNase I mit einem Volumen Roti®-Phenol/Chloroform wurde die wässrige Oberphase nach Zentrifugieren bei 14000 g für zwei Minuten bei 4 °C in einem neuen Gefäß mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 0,5 µl Glykogen (20 mg/ml) und dem dreifachen Volumen eiskaltem 96 %igen Ethanol gemischt und anschließend bei -20 °C für 12 Stunden inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 20 Minuten bei RT und zweimaligem Waschen mit eiskaltem 75 %-igem Ethanol wird das Pellet wieder in 35 µl PCR-H₂O resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch bei 260 und 280 nm im Spektralphotometer und beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringstrukturen der Nukleinsäurebasen bei 260 nm. Proteine mit aromatischen Aminosäureresten zeigen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient der beiden gemessenen Werte sollte bei kontaminationsfreier RNA-Lösung bei 1,8-20 liegen.

2.3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Um die Integrität der ribosomalen RNA und das Nichtvorhandensein eventueller DNA-Fragmente zu überprüfen, wird eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Herstellung des Laufgels erhitzt man ein 1 % Agarose (1g Agarose in 100 ml TAE-Puffer) in der Mikrowelle und gießt die erhitzte Gellösung anschließend in eine horizontale Gelkammer. 250 ng RNA enthaltende Proben werden mit PCR-H₂O auf 9 µl verdünnt und mit 1 µl Auftragspuffer A versehen. Für 30 Minuten werden die Proben bei 100 Volt in TAE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgt die Färbung für 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung und das Sichtbarmachen des Ergebnisses unter UV-Licht mit abschließender photographischer Dokumentation.

2.3.5 Reverse Transkription-PCR

Die Reverse Transkription bietet die Möglichkeit, RNA-Moleküle mittels der PCR-Technologie zu amplifizieren und somit die Genexpression auf mRNA-Ebene zu analysieren. Da die verwendete Taq-Polymerase aber nicht in der Lage ist, einzelsträngige RNA als Matrize zu benutzen, muss die mRNA zunächst in cDNA umgewandelt werden. Mittels einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase, der reversen Transkriptase, wird aus der einzelsträngigen mRNA eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese einzelsträngige cDNA kann mit der Taq-Polymerase zum Doppelstrang vervollständigt

und mit der PCR amplifiziert werden.

Die Umschreibung der mRNA in cDNA, die vorher mit einer DNase I behandelt wurde, erfolgt mit dem Enzym M-MLV-Reverse Transkriptase nach folgendem Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
mRNA	$x \mu l$	$1 \mu g$
Oligo (dT) Primer	$1 \mu l$	$1,4 \mu M$
PCR- H_2O	add $25,4 \mu l$	-
Σ	$25,4 \mu l$	-

Tabelle 2.10: Reaktionsansatz für die RT-PCR

Nach Inkubation der Ansätze für 10 Minuten bei $70^\circ C$ und anschließenden 2 Minuten auf Eis werden die Proben mit $9,6 \mu l$ eines Master-Mix ($0,3 mM$ dNTPs, $0,6 U/\mu l$ Rnasin, $5,7 U/\mu l$ M-MLV-RT, $7,0 \mu l$ 5x Reaktionspuffer) vermischt. Im Thermocycler erfolgt die Inkubation über eine Stunde bei $42^\circ C$. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase werden die Proben anschließend für 5 Minuten auf $95^\circ C$ erhitzt und dann für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Zur Kontrolle, ob die reverse Transkription erfolgreich war, wird vor der weiteren Verwendung der cDNA eine Kontroll-Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit β -Aktin durchgeführt. β -Aktin ist dabei ein bewährtes Gen, da es ubiquitär exprimiert wird. Die Amplifizierung von so genannten Housekeeping- Genen, wie β -Aktin, welches in allen Zellen vorkommt und unabhängig vom Zeitpunkt immer quantitativ gleichmäßig stark exprimiert wird und damit zu einem konstanten Signal führt, ermöglicht die Schaffung eines Vergleichsstandardes und einer semiquantitativen Abschätzung.

Die PCR erfolgt nach der so genannten Heißstart-Methode (*hot start*), da dadurch die Effektivität, Spezifität und Präzision der Amplifizierung erhöht wird und unspezifische Primeranlagerungen und die Primeroligomerisierungsrate reduziert werden. Zur PCR gehören folgende drei Schritte: Denaturierung der Matrize, Hybridisierung der Primer mit der cDNA (*Annealing*) und Verlängerung der hybridisierten Primer durch die Taq DNA- Polymerase (*Extension, Elongation*). Die Amplifikation des zu untersuchenden Gens β -Aktin erfolgt nach dem folgenden PCR-Programm:

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	5 Min	94 °C	1
zyklische Denaturierung	45 Sek	94 °C	30
Primerannealing	1 Min	55 °C	
Primerextension	1 Min	72 °C	
finale Elongation	7 Min	72 °C	1

Tabelle 2.11: Verlaufsprogramm der semiquantitativen PCR mit β -Aktin

Zur Kontrolle der Amplifizierung wird anschließend eine gelelektrophoretische Auftrennung des β -Aktin-PCR-Produktes durchgeführt.

2.3.6 Quantitative Real-Time PCR von BDNF (TaqMan-PCR)

Die quantitative Bestimmung des BDNF-mRNA-Expressionsniveaus über 48 Stunden in den einzelnen Versuchsgruppen erfolgt mit der Real-Time PCR in Form der TaqMan-PCR. Bei der TaqMan-PCR werden zwei sequenzspezifische Primer in Verbindung mit einer doppeltmarkierten Fluoreszenzsonde (TaqMan-Sonde) verwendet, die sich zwischen diese beiden Primer sequenzspezifisch an die DNA anlagert. Für die BDNF-spezifischen Primer wird das 5'-Ende der Sonde mit dem fluoreszenten Reporter-Farbstoff 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) markiert, das 3'-Ende ist mit dem Quencher-Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin (TAMRA) beladen, der mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase aktiviert und die Sonde abgetrennt wird. Durch die Hydrolyse der Sonde wird die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reportermolekül unterbrochen, dadurch wird der Fluoreszenzenergietransfer unterbrochen und die abgegebene Fluoreszenz kann detektiert werden. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht 100%ig gebundene Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität aktiviert wird. Unter der Annahme einer 100%igen Effizienz einer PCR kann man von einer Ver-

doppelung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus ausgehen.

Vor diesem Hintergrund kann eine Zielsequenz relativ in ihrer Expression zu einer zweiten, nicht verwandten Sequenz (Standard) bestimmt werden. Mit der ΔC_t -Methode kann die BDNF-mRNA-Expression mit der 18S rRNA als endogenes Referenzgen bestimmt werden, da die Expression von 18S rRNA durch äussere Einflüsse nicht verändert wird. Die unbekannte Menge der Zielsequenz wird semiquantitativ auf das Signal des Standards bezogen. Um die BDNF-mRNA-Expression mit der vergleichenden ΔC_t -Methode quantifizieren zu können, wird vorher die Effizienz für BDNF und 18S rRNA bestimmt, indem verschiedene cDNA-Konzentrationen für BDNF (2 ng, 8 ng, 32 ng, 128 ng) und 18S rRNA (5 pg, 20 pg, 40 pg, 80 pg, 160 pg, 320 pg) in der real-time-PCR eingesetzt werden, um die optimale cDNA-Menge zu bestimmen. Für die Quantifizierung der BDNF-mRNA-Expression wurden die in den Versuchen zur Bestimmung der Effizienz erhaltenen optimalen cDNA Konzentrationen von 25 ng cDNA für BDNF und 100 pg cDNA für 18S rRNA verwendet.

Für die realtime PCR für BDNF wird folgender Ansatz nach Anleitung des Herstellers (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA-Verdünnung	9 μl	25 ng
Sonde	1 μl	1x
Master-Mix	1 μl	1x
Σ	20 μl	-

Tabelle 2.12: TaqMan PCR-Ansatz zur Effizienzbestimmung der BDNF-mRNA-Expression

Bei dem verwendeten TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent Kit für 18S rRNA ist die Sonde am 5'-Ende mit dem Farbstoff VIC, am 3'-Ende mit dem Farbstoff TAMRA markiert. Zur Bestimmung der 18S rRNA als internen Standard wird folgender Ansatz benutzt:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA-Verdünnung	9,7 μ l	100 pg
Sonde	0,1 μ l	1x
Master-Mix	10 μ l	1x
Vorwärts-Primer	0,1 μ l	1x
Rückwärts-Primer	0,1 μ l	1x
Σ	20 μ l	

Tabelle 2.13: TaqMan PCR-Ansatz zur Effizienzbestimmung der 18S rRNA - Expression

Jede Probe wird als Dreifachbestimmung in einem gesamten Probenvolumen von 20 μ l eingesetzt. Die Amplifikation wird in 96-er Lochplatten für 40 Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus durchläuft 95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 1 Minute. Zum Ausgleich eventueller Schwankungen aufgrund von möglichen Pipettierfehlern ist dem TaqMan PCR-Reaktionsansatz ein passiver Referenzfarbstoff (ROX) beigelegt, der in die Analyse der Fluoreszenzsignale mit einfließt.

Der verwendete PCR-Zyklus heißt ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Die erhaltenen Daten werden mit der Δ Ct Methode quantifiziert.

2.3.7 Proteinextraktion aus Gehirngewebe

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinen aus Hirngewebe müssen diese zunächst selektiert werden. Dazu werden 20-50 mg der in -80 °C gelagerten Gewebeproben in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 300 μ l RIPA-Puffer versehen und durch mehrfaches Auf- und Ab-pipettieren homogenisiert. Das Homogenat wird für 10 Minuten mit 3000 g in der Kühlzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert, wodurch es zu einer Auftrennung in ein festes Sediment mit nukleären Proteinen sowie Zellfragmenten und eine flüssige Oberphase kommt, die die zytosolische und mitochondriale Fraktion enthält. Die Oberphase wird nochmals für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, wodurch eine weitere Trennung in Oberphase bestehend aus der zytosolischen Fraktion und der unteren Phase als festes Sediment, welches die mitochondriale Fraktion beinhaltet, entsteht. Die obere Phase wird in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und das Sediment in 200 μ l RIPA-Puffer aufgenommen. Die Lagerung der Proteinfraction erfolgt bei -80 °C.

2.3.8 Proteinbestimmung mittels BCA-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der gewonnenen Proben erfolgt mit Hilfe des Micro-Bicinchoninsäure-Assay. Dabei handelt es sich um einen colorimetrischen Assay, der auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} -Ionen durch Peptidbindung in alkalischer Lösung, beruht. Die enthaltene Bicinchoninsäure bildet mit den entstandenen Cu^{+} -Ionen einen purpurfarbenen Chelatkomplex. Dessen bei 562 nm gemessene Absorption stellt ein direktes Maß für die Proteinkonzentration der Probe dar.

Für die Proteinbestimmung wird eine BSA-Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Von den zytosolischen Fraktionen werden jeweils 1:10 Verdünnungen mit PBS hergestellt und anschließend 150 μl pro Probe zur Dreifach-Bestimmung in eine 96-Lochplatte pipettiert. Nach Vermischen jeder Probe mit 150 μl BC Assay-Reagenz, Verschließung der Platte, Schütteln für 10 Sekunden und folgender einstündiger Inkubation bei 37 °C mit anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur, kann die Absorption bei 570 nm im Fluoreszenzphotometer gemessen werden. Als Leerwert dient das BC Assay-Reagenz mit PBS versetzt. Die Berechnung der zytosolischen Proteinkonzentration erfolgt anhand der ermittelten BSA-Standardkurve.

2.3.9 Western Blot für Akt, ERK1/2, p-Akt und p-ERK1/2, Caspase-2, Caspase-3, Caspase-8 und BDNF

Für die Durchführung der Elektrophorese wird das Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell System von Bio-Rad verwendet. Die beiden Glasplatten für die Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele werden zuerst mit Ethanol gereinigt und dann mit 10 % bzw 15 %-igem Trenngel bis ungefähr 2/3 der Platte befüllt. Für das Trenngel werden unter Rühren Acrylamid und als letztes Ammoniumsulfat (APS) und TEMED dem Trenngelkonzentrat hinzugefügt, die innerhalb von 20 Minuten eine Polymerisation des Geles bewirken. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten und die Bildung von Luftblasen zu verhindern, wird das gegossene Gel mit Isopropanol bedeckt. Nach Entfernung des Isopropanols kann die Sammelgellösung hineingegossen werden. Zum Sammelgelpufferkonzentrat werden die in der Tabelle aufgeführten Bestandteile hinzugefügt. Die Konzentration des Trenngels variiert in Abhängigkeit des Molekulargewichtes der zu untersuchenden Proteine.

2 Material und Methoden

Komponente	Trenngel		Sammelgel 4,5 %
	10 %	15 %	
Trenngelpuffer	6 ml	6 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	3,7 ml
Aqua bidest	9,9 ml	5,9 ml	9 ml
Acrylamid 30 %	8 ml	12 ml	2,2 ml
TEMED	20 μ l	20 μ l	30 μ l
APS 12,5 %	96 μ l	96 μ l	50 μ l

Tabelle 2.14: Gelzusammensetzung für 4 Mini-Gele

Die Probestaschen entstehen durch das Einbringen eines Kammes in die noch nicht polymerisierte Lösung. Nach 30 Minuten ist das Gel gebrauchsfertig und kann mit den verarbeiteten Proteinproben bestückt werden. Dazu wird von jeder Probe 20 μ g Protein entnommen und mit PCR- H_2O auf 9 μ l aufgefüllt. Zusätzlich wird dieselbe Menge an Lämmli-Puffer hinzugefügt, so dass die Gesamtmenge von 18 μ l entsteht. Die gesamte Verarbeitung der Proteinproben erfolgt ausschließlich auf Eis. Alle Proben werden vor dem Auftragen in die Taschen erst bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert und anschließend für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektrophoresekammer wird nach Anbringen der Gele in der Halterung mit Laufpuffer gefüllt, die Proben werden in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese mit 100 Volt für 20 Minuten gestartet. In dieser Zeit wandern die Proteinproben bis zur Grenze zwischen Sammel- und Trenngel, wo sie sich konzentrieren. Ist dies erreicht, kann die Voltzahl auf 160 Volt erhöht werden, damit die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Trenngel aus den Glasplatten entfernt und von der Sammelgelschicht getrennt. Die Trenngelschicht wird für den folgenden Transfer verwendet. Dafür wird das Gel auf die Oberfläche der Nitrozellulosemembran übertragen wofür die Semi-Dry Blot Anlage verwendet wird. Vor dem Transfer werden die Gele in einem Transferpuffer für 20 Minuten äquilibriert. Zum Transfer der Proteine auf die Membran wird ein Sandwich aus Chromatographiepapier, Nitrozellulosemembran und Gel gebildet und in die Blottingapparatur über 45 Minuten zum Transfer bei ca. 400 mA gelegt. Nach dem Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wird diese kurz in eine Ponceaurot-Lösung gelegt, die die aufgetrennten Proteine rot anfärbt, um eine Aussage über das Transferergebnis zu erhalten. Die Farbe wird bei zufriedenstellendem Ergebnis mit TBS-Tween 0,1 % (TBS-T) wieder entfernt. Zur Blockierung und Reduzierung unspezifischer Bindungen wird die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchlösung inkubiert.

2.3.10 Immunreaktion

Die gewaschenen Membranen werden nun mit den spezifischen Antikörpern für Akt, ERK1/2, p-Akt, p-ERK1/2, Caspase -2, -3, -8 und BDNF nach in Tabelle 2.15 aufgeführtem Schema inkubiert. Dazu wird in TBS-T 0.1 % gelöstes 1 %-iges BSA verwendet, in den die Antikörper vorher in unterschiedlichen Verdünnungen gegeben wurden. Nach Inkubation der Membran über Nacht unter ständiger Bewegung kann die Membran am nächsten Tag nach drei Waschsritten mit TBS-T für jeweils 10 Minuten mit dem zweiten Antikörper inkubiert werden. Dieser wurde vorher mit 1 %-iger BSA-Lösung vermischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur zu der Membran gegeben und unter ständiger Bewegung inkubiert. An den zweiten Antikörper, der den ersten Antikörper nachweisen soll ist eine Peroxidase gekoppelt. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert sie ein zyklisches Diacyldiazid zu einem instabilen, energiereichen Intermediat, welches unter Lichtemission in seinen Grundzustand übergeht und röntgenologisch bei Exposition nachgewiesen werden kann. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Emission von Lichtwellen (Chemilumineszenz).

Protein	Verdünnung des primären Antikörpers	Verdünnung des sekundären Antikörpers/Ursprung
Akt	1: 1000	1: 2000 (anti-Kaninchen)
p-Akt	1: 1000	1: 2000 (anti-Kaninchen)
ERK1/2	1: 1000	1: 2000 (anti-Kaninchen)
p-ERK1/2	1: 1000	1: 2000 (anti-Kaninchen)
BDNF	1: 500	1: 1000 (anti-Kaninchen)
Caspase-2	1: 250	1: 1000 (anti-Maus)
Caspase-3	1: 250	1: 1000 (anti-Kaninchen)
Caspase-8	1: 250	1: 1000 (anti-Kaninchen)
β-Aktin	1: 50000	1: 5000 (anti-Maus)

Tabelle 2.15: Zur Immundetektion verwendete Antikörper mit Verdünnungen

2.3.11 Entwicklung und Auswertung mittels Densitometrie

Dieser Entwicklungsschritt wird durch Zugabe der ECL-Lösungen I und II (*enhanced chemiluminescence*) eingeleitet. Dazu wird die Membran mit der ECL-Lösung inkubiert und mit einem lichtempfindlichen Film in eine Fotokassette gegeben und manuell entwickelt. Entsprechend der Expositionszeit von Sekunden bis Minuten fällt die Färbung

des Filmes schwächer oder stärker aus. Die densitometrische Auswertung der belichteten Filme erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm BioDocAnalyse System.

2.3.12 Caspase-8-Aktivitätsassay

Die Bestimmung der Caspase-8-Aktivität erfolgt mit dem Caspase-8-Aktivitätsassay. Durch spezifische Spaltung der Peptidsequenz IETD (Ile-Glu-Thr-Asp) nach dem Aspartatrest durch aktive Caspase-8 kann ihre Aktivität gemessen werden. Nach Spaltung des IETD-Substrates (Ac-IETD-AFC), welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff AFC (7-amino-4-trifluoromethyl-cumarin) markiert ist und dessen Freisetzung, wird eine Farbumwandlung von blau nach grün mittels Fluoreszenzmessung detektiert und quantifiziert, die der Caspase-8-Aktivität proportional ist. Jeweils $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ der Proteinkonzentration wird in $50 \mu\text{l}$ Gesamtvolumen mit beiliegendem Caspase-8- Extraktions-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß verdünnt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 500 g wird vom erhaltenen Überstand je $5 \mu\text{l}$ in die Vertiefung der 96-Loch Zellkulturplatte überführt und mit $85 \mu\text{l}$ Assaypuffer versehen. Nach Zugabe von $10 \mu\text{l}$ Caspase-8 Substratkonjugat, Abdichten der Platte und zweistündiger Inkubation bei 37°C erfolgt die Messung der Fluoreszenz im Tecan G2.0 Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm. Als Positivkontrolle wird die beigelegte rekombinante Caspase-8 eingesetzt, die wie die anderen Proben behandelt wurde. Die erhaltenen Fluoreszenzen werden als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU), nach Abzug der Fluoreszenz reiner Pufferlösung angegeben.

2.3.13 Caspase-2-Aktivitätsassay

Ähnlich dem Caspase-8-Aktivitätsassay wird bei der Messung der Caspase-2-Aktivität verfahren. In diesem Protease-Testverfahren wird das Substrat VDVAD, markiert mit dem Farbstoff AFC (7-amino-4-trifluoromethyl-cumarin) abgespalten und ebenfalls der Farbwandel quantifiziert. Der Vergleich der Fluoreszenz von AFC mit einer Kontrolle erlaubt Rückschlüsse über die gesteigerte Aktivität von Caspase-2 zu ziehen. Es werden $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein der jeweiligen Proben in $50 \mu\text{l}$ Assaypuffer gelöst und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von $50 \mu\text{l}$ Reaktionspuffer und $5 \mu\text{l}$ VDVAD-AFC Substrat und die Inkubation für 1-2 Stunden bei 37°C . Die Proben werden ebenfalls in eine 96-Lochplatte überführt und anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und Emissionswellenlänge von 505 nm gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Physiologische Parameter der Versuchstiere

Zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren der Han Wistar Ratten konnten keine phänotypischen Unterschiede festgestellt werden. In den Gruppen gab es keine Unterschiede in der Mortalitätsrate. Unter der Behandlung mit EPO wurden keine Nebenwirkungen identifiziert.

3.2 Histologische Untersuchungen

Durch die Exposition mit Hyperoxie kommt es im Gehirn der infantilen Ratte zu einer Störung des physiologischen Zelltods und zu einer Induktion des apoptotischen Zelltods, welches sich anhand des erhöhten Apoptoserate in Abbildung 3.1. im Vergleich zu den Tieren, die Normoxie ausgesetzt waren, darstellen lässt. Unter Normoxie kommt es zu einer physiologischen Apoptoserate von durchschnittlich 2200, die Exposition mit Hyperoxie führt fast zu einer Versechsfachung der Anzahl apoptotischer Zellen. Behandelt man die Tiere dagegen vor der Exposition mit Hyperoxie mit EPO in den beiden untersuchten Dosierungen, nämlich einerseits mit 10.000 IE/kg KG oder mit 20.000 IE/kg KG so lässt sich die Anzahl der apoptotischen Zellen reduzieren. Eine effektive Reduktion der Apotoserate wird allerdings erst in einer Dosierung mit 20.000 IE/kg KG erreicht, da dadurch die Apoptoserate um $\frac{2}{3}$ gesenkt werden kann. Eine Reduktion auf das Niveau unter Normoxie wird nicht erreicht. Um eine effektive Neuroprotektion im neonatalen Rattengehirn erreichen zu wollen, bietet sich wie aus unseren Ergebnissen sichtbar wird, die höhere Dosis von 20.000 IE/kg KG an.

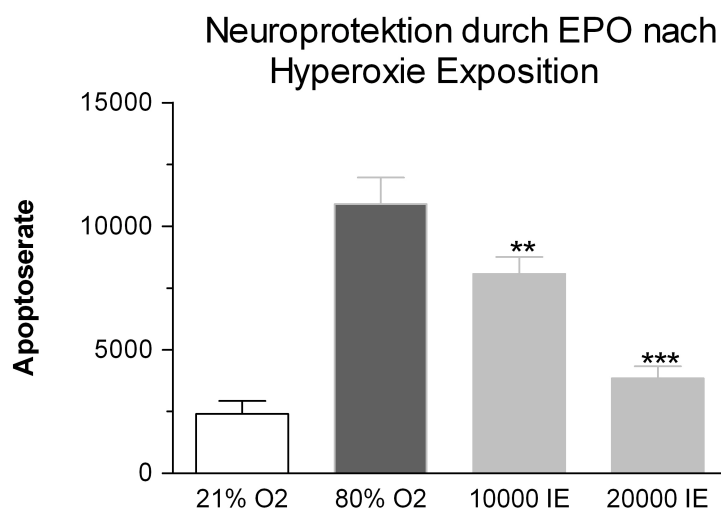
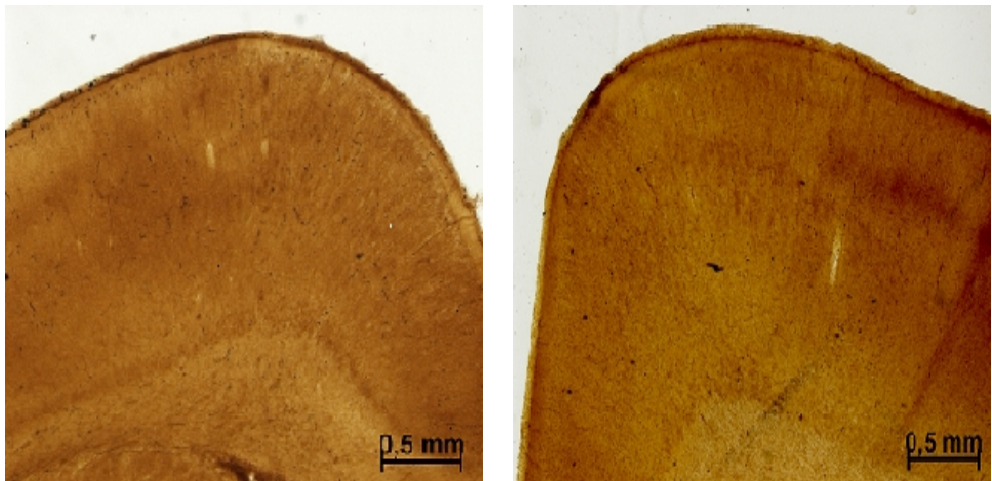


Abbildung 3.1: Neuroprotektion durch EPO nach Hyperoxie Exposition. Es wurde in den verschiedenen Gruppen die Apoptoserate ermittelt. Der weiße Balken stellt die Kontrollgruppe dar, dort wurden die Tiere Normoxie ausgesetzt, der dunkelgrau Balken stellt die Ergebnisse der Tiere dar, die Hyperoxie (80 % O₂) ausgesetzt waren, die grau gehaltenen Balken stellen die Ergebnisse der Tieren dar, die sowohl Hyperoxie ausgesetzt waren, als auch mit EPO in den beiden Dosierungen 10.000 IE/kg KG oder 20.000 IE/kg KG behandelt wurden. Die Exposition mit Hyperoxie führt zu einer vermehrten Neurodegeneration, die sich in der Zunahme der Apoptoserate widerspiegelt. Die zusätzliche Applikation von Erythropoietin in den verschiedenen Dosierungen führt zu einer signifikanten Abnahme der Neurodegeneration (Signifikanz ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

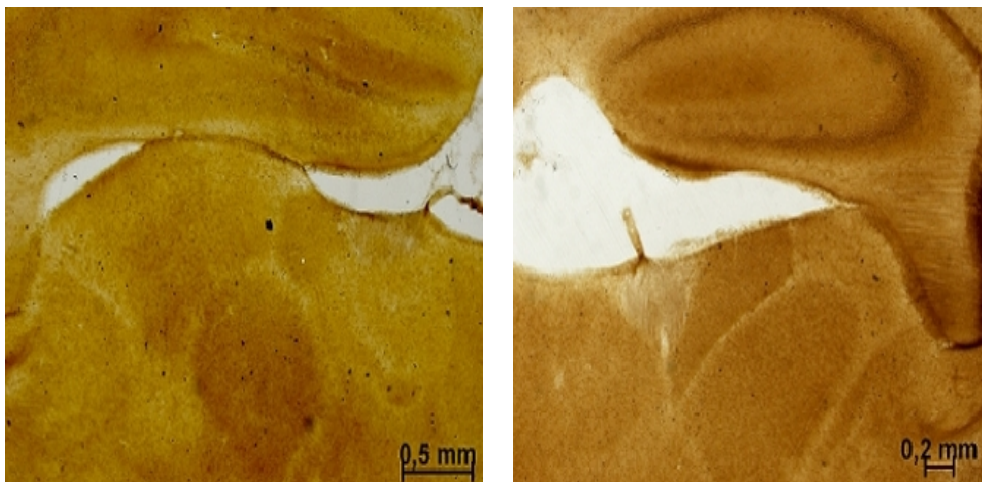
Die neurodegenerativen Veränderungen lassen sich dazu mit Hilfe der DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung vor allem im Cortex und den thalamischen Kerngebieten nachweisen. In den beiden Übersichtsaufnahmen des Cortex (Abbildung 3.2) und der Thalamuskern (Abbildung 3.3) kann man die unterschiedliche Anzahl an untergegangenen Neuronen schwer erkennen. In den Detailaufnahmen der beiden Regionen können die degenerativen Zellen besser als dunkelbraune Punkte identifiziert werden. Die Abbildung 3.4 zeigt Ausschnitte des Cortex frontalis, in Lamina II, einerseits nach 24-stündigen Hyperoxie Exposition und andererseits nach Behandlung mit EPO in einer Dosierung von 20.000 IE/kg KG. Abbildung 3.5 zeigt Details des Thalamus lateralis sowohl nach Hyperoxie Exposition als nach EPO Behandlung. Es lässt sich hierbei eindrucksvoll erkennen, dass die Behandlung mit Erythropoietin in den beiden Regionen zu einer Abnahme der Anzahl an degenerativen Zellen führt.



(a) 24 h Hyperoxie (80 % O₂)

(b) 24 h Hyperoxie (80 % O₂) und EPO-
Behandlung

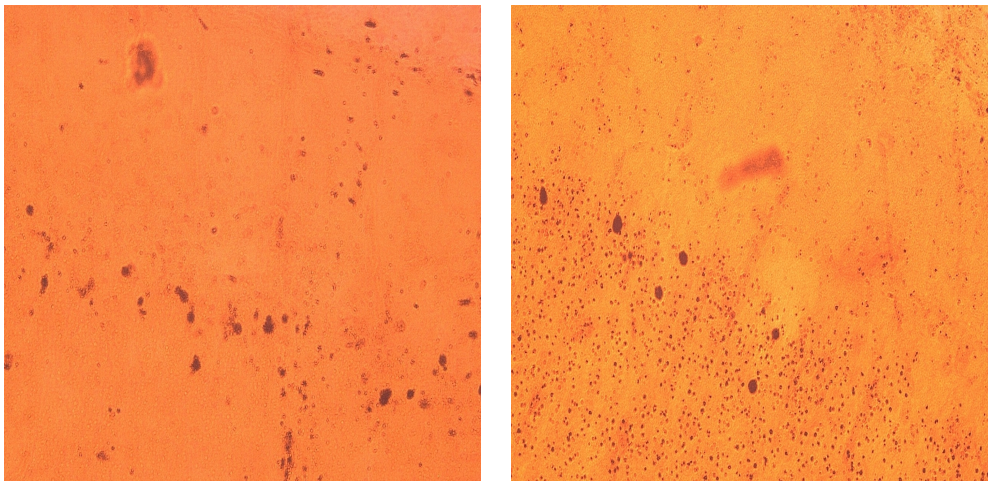
Abbildung 3.2: Übersichtsaufnahme Cortex frontalis. Eine Exposition mit Hyperoxie über 24 Stunden führt zu einer Zunahme der Apoptoserate, sichtbar durch die erhöhte Anzahl der neurodegenerativen Zellen, die durch die DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung sichtbar gemacht werden. Die Applikation von EPO in einer Dosierung von 20.000 IE/kg KG reduziert die Anzahl der apoptotischen Zellen um 2/3. Die Vergrößerung der Ausschnitte liegt bei $\times 10$



(a) 24 h Hyperoxie (80 % O₂)

(b) 24 h Hyperoxie (80 % O₂) und EPO-
Behandlung

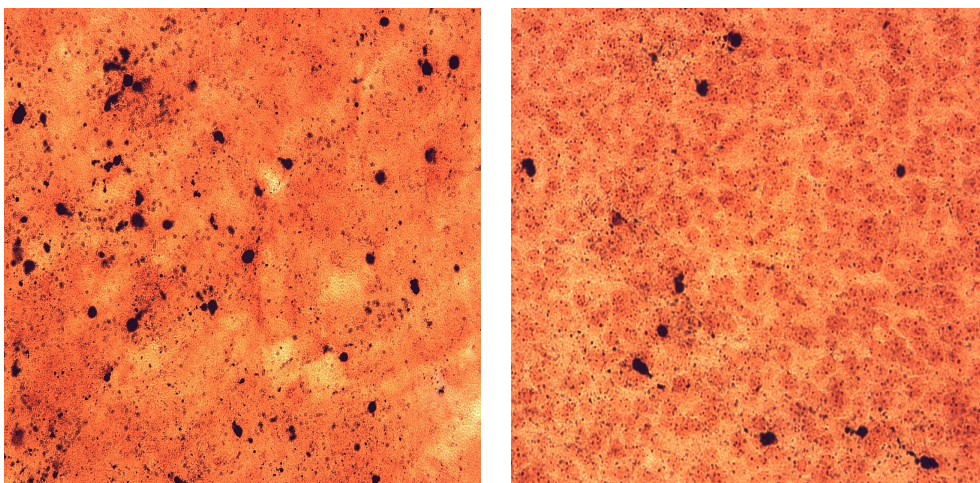
Abbildung 3.3: Übersichtsaufnahme der Thalamuskern. Auch hier führt die Exposition mit Hyperoxie über 24 Stunden zu einer Zunahme der Apoptoserate, die durch die Applikation von EPO in einer Dosierung von 20.000 IE/kg KG reduziert werden kann. Vergrößerung $\times 10$



(a) 24 h Hyperoxie (80 % O₂)

(b) 24 h Hyperoxie (80 % O₂) und EPO-
Behandlung

Abbildung 3.4: Ausschnitt Cortex frontalis, Lamina II. Die Detailaufnahmen der DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung zeigen eindrücklich eine deutliche Abnahme der apoptotischen Zellen bei den Tieren, die vor der Hyperoxie Behandlung mit EPO in einer Dosierung von 20.000 IE/kg KG behandelt wurden. Die Vergrößerung in diesen Ausschnitten liegt bei $\times 200$



(a) 24 h Hyperoxie (80 % O₂)

(b) 24 h Hyperoxie (80 % O₂) und EPO-
Behandlung

Abbildung 3.5: Ausschnitt Thalamus lateralis. Die Applikation von EPO in einer Dosierung von 20.000 IE/kg KG reduziert die Anzahl der apoptotischen Zellen nach einer 24- stündigen Hyperoxie Exposition, wie diese Ausschnitte, gefärbt mit die DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung sichtbar machen. Die Ausschnitte wurden mit $\times 200$ vergrößert.

3.3 Molekularbiologische Ergebnisse

3.3.1 Erythropoietin steigert Expression von BDNF

Der Einfluss von Hyperoxie auf die Expression von BDNF als Beispiel für ein Neurotrophin wurde auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Die BDNF-Genexpression wurde im Hirngewebe sechs Tage alter Han Wistar Ratten nach definierter Hyperoxieexposition (80 % O_2) über 2, 6, 12, 24 und 48 Stunden ($n = 6$ pro Zeitstufe) im Vergleich zu Normoxie (21 % O_2) - Kontrollgruppe, mittels realtime-PCR bestimmt. Nach Hyperoxie Exposition konnte ein Abfall des mRNA-Gehaltes für BDNF nachgewiesen werden. Bereits nach 2-stündiger Hyperoxie Exposition lässt sich ein Abfall des mRNA-Gehalts erstmalig um 80 % feststellen, der sich kontinuierlich fortsetzt und nach 48 Stunde seinen Tiefpunkt mit ungefähr 20 % erreicht.

Die exogene intraperitoneale Gabe von EPO in einer Dosierung von 20.000 IE/kg KG führt zu einer Erhöhung der BDNF mRNA-Konzentration. Dies lässt sich ab der Zeitstufe von 12 Stunden nachweisen. Nach 24 und 48 Stunden zeigt sich eine signifikante Steigerung der Genexpression auf mRNA- Level im Vergleich zur Hyperoxiegruppe. Bei diesen Versuchen diente 18S rRNA als interner Standard. Signifikante Unterschiede konnten für 18S rRNA nicht nachgewiesen werden.

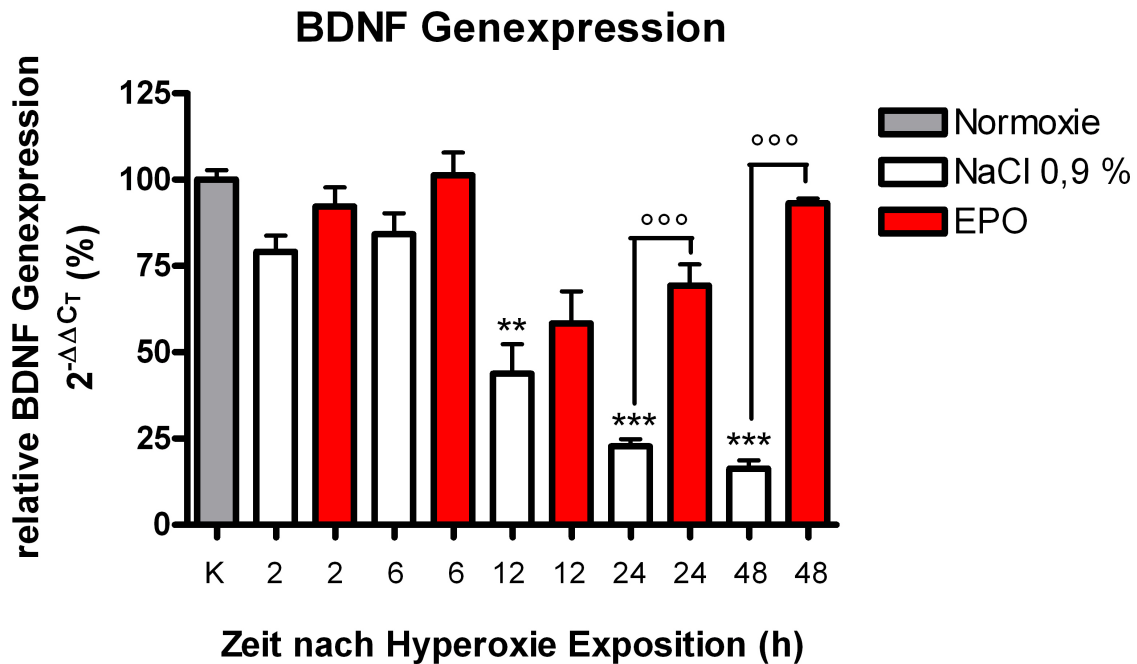


Abbildung 3.6: Genexpression von BDNF über 48 Stunden im Vergleich Tiere nach Hyperoxie Exposition und Tiere nach Hyperoxie Exposition unter exogener EPO Applikation in einer Dosierung von 20.000 IE/kg KG. Signifikanzen wurden mit dem Student-t-Test ermittelt. Die mit dem Stern (*) bezifferten Angaben beziehen sich auf den Vergleich der BDNF-Genexpression der Tiere jeweils in der gleichen Zeitstufe Hyperoxie mit und ohne EPO-Behandlung (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die mit dem Kreis (°) markierten Angaben beziehen sich auf den Vergleich Hyperoxie in Kombination mit EPO Behandlung zu Normoxie (°°° $p < 0,001$, $n = 6$).

Die Proteinexpression von BDNF wurde im Western Blot bestimmt und konnte die Ergebnisse der Genanalyse bestätigen. Eine Behandlung mit 80 %-igem Sauerstoff führt zu einer Minderung von BDNF auf Proteinebene. Bereits nach 12 Stunden kommt es zu einem leichten Abfall der Proteinexpression um 25 %, nach 48 Stunden beträgt die BDNF- Proteinexpression bereits nur noch 40 %, wie in Abbildung 3.7 dargestellt wird. Die exogene Gabe von EPO kann diesem Effekt entgegenwirken. Über die Zeitstufen 12 bis 48 Stunden hält sich die Proteinexpression bei um die 90 %. Nach 12 Stunden steigt die Expression an, signifikante Unterschiede zwischen mit EPO behandelten Tieren und solchen, die der Hyperoxie ausgesetzt waren, zeigen sich aber erst nach 24 Stunden. Die Latenzzeit der Regulation entspricht der benötigten Zeit der Umschreibung von Gen auf Proteinebene, so dass auf eine Untersuchung in den Zeiträumen vor 12 Stunden verzichtet werden konnte. Als interner Standard diente hierbei β -Aktin.

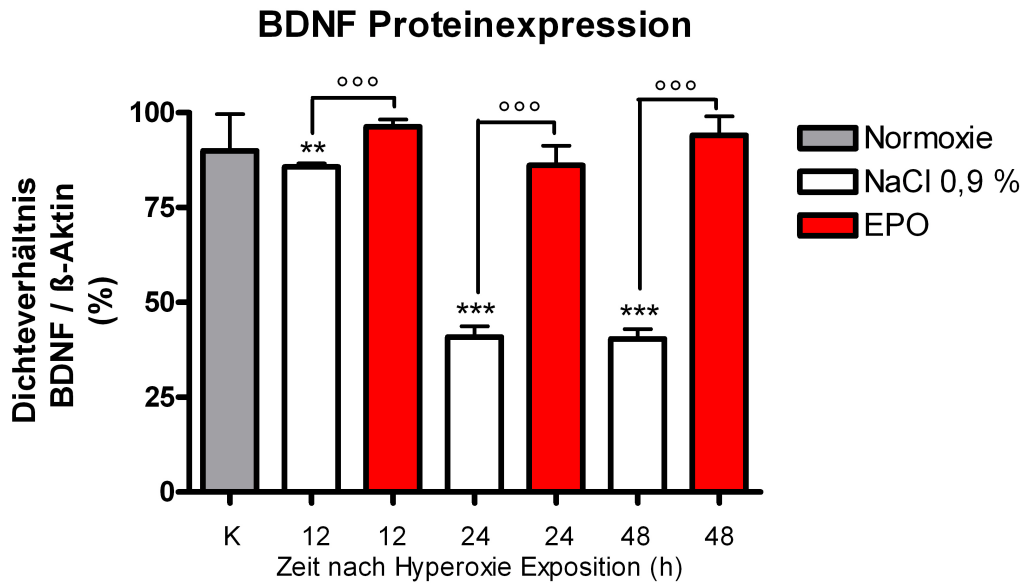


Abbildung 3.7: Proteineexpression von BDNF über 48 Stunden im Vergleich die Behandlung mit Hyperoxie Exposition und EPO. Die mit dem Stern (*) markierten Angaben beziehen sich auf das Verhältnis der BDNF-Proteinexpression der einzelnen Zeitstufen untereinander (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die mit dem Kreis (°) markierten Angaben beziehen sich auf den Vergleich Hyperoxie in Kombination mit EPO Behandlung zu Normoxie (°°° $p < 0,001$, $n = 6$)

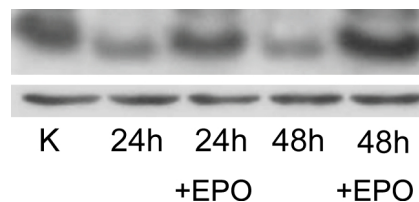


Abbildung 3.8: Übersichtsaufnahme der Proteineexpression von BDNF im Immunoblot nach 24 Std und 48 Std. Die Kontrolle stellt die Normoxie dar, daneben werden Tiere dargestellt die mit Hyperoxie behandelt wurden und zusätzlich EPO erhalten haben. Als interner Standard dient β -Aktin.

3.3.2 Erythropoietin verstärkt Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt

Die aktivierten, phosphorylierten Formen von Akt und ERK1/2 sind zwei Kinasen, die über BDNF aktiviert werden. Beide Signaltransduktionswege stellen wichtige Komponenten für das Überleben der Zelle dar. Die zur Gruppe der MAP-Kinasen gehörige Kinase ERK1/2 vermittelt ihre intrazellulären Signale nachdem sie durch Trk phosphoryliert und aktiviert wird. Diese Aktivierung kann einerseits durch Wachstumsfaktoren wie BDNF stattfinden, andererseits kann EPO aber auch eine ERK1/2-Aktivierung in-

duzieren und somit ein intrazelluläres Signal erzeugen. Wie ERK1/2 kann Akt über Trk aktiviert werden, aber auch von EPO über die Vermittlung von JAK-2.

Untersucht wurden in den jeweiligen Gruppen die aktive/phosphorierte Form von Akt (p-Akt), seine inaktive Form Akt, sowie die aktivierte/phosphorierte Form von ERK1/2 (p-ERK1/2) und seine inaktive Form ERK1/2.

Bei der Untersuchung der inaktiven, unphosphorylierten Formen von Akt und ERK1/2, konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Exposition mit Sauerstoff als auch eine zusätzliche Gabe von EPO keinerlei Effekt auf die Proteinexpression haben, wie Abbildung 3.9 und Abbildung 3.11 zeigen. Wie aus den Abbildungen der Western Blot-Aufnahmen für Akt (Abbildung 3.10) und ERK1/2 (Abbildung 3.12) ersichtlich ist, gibt es keinerlei Unterschiede in den Ausprägungen der beiden Proteine in der inaktiven, unphosphorylierten Form. Weder die Behandlung mit EPO noch die Exposition mit Hyperoxie haben einen Einfluss auf den Grad der Aktivität.

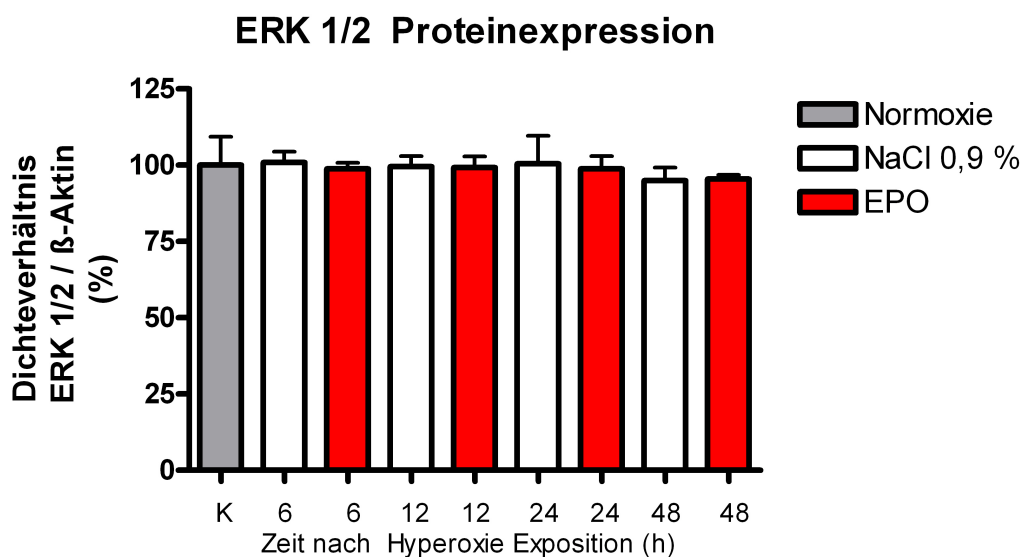


Abbildung 3.9: Proteinexpression der inaktiven Form von ERK1/2. Die Exposition mit 80 % O₂ und Gabe von EPO haben keinerlei Auswirkung auf die Proteinexpression. Daten der Zeitstufe 2 Stunden wurden nicht abgebildet.

3 Ergebnisse

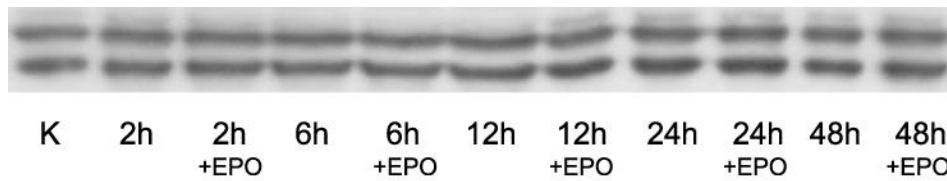


Abbildung 3.10: Übersichtsaufnahme Immunoblot für die Proteinexpression von ERK1/2 im Vergleich EPO-Behandlung und Hyperoxie Exposition. (K = Kontrolle)

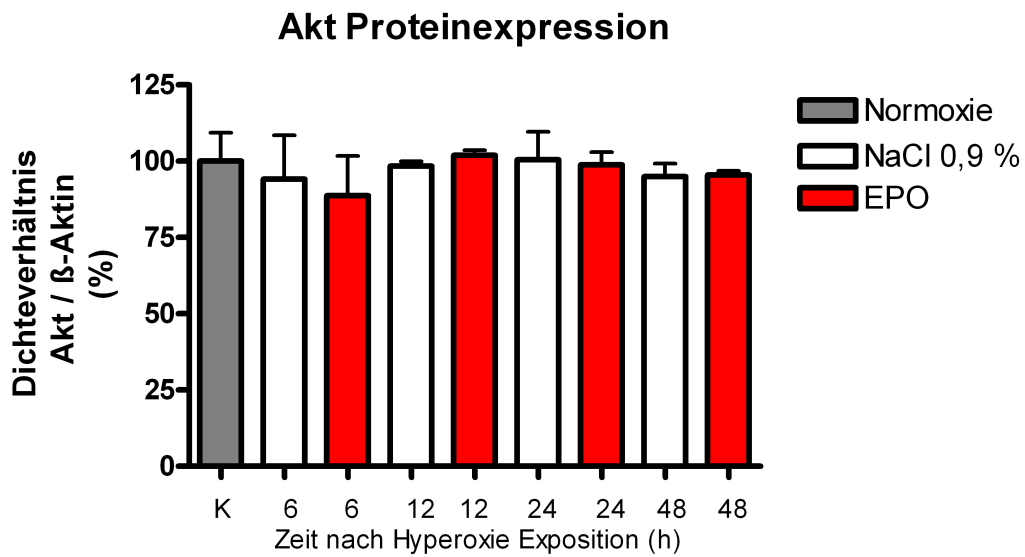


Abbildung 3.11: Proteinexpression der inaktiven, unphosphorylierten Form von Akt. Daten der Zeitstufe 2 Stunden wurden nicht abgebildet.

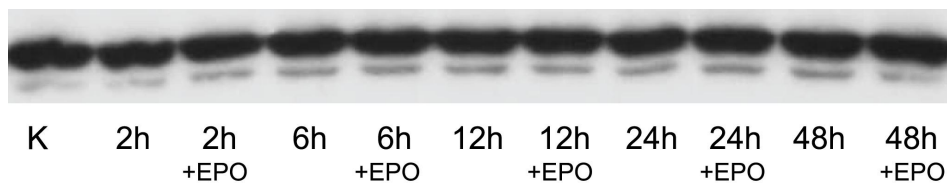


Abbildung 3.12: Übersichtsaufnahme Immunoblot für die Proteinexpression von Akt im Vergleich EPO-Behandlung und Hyperoxie Exposition. (K = Kontrolle)

Untersucht man die aktiven Formen der beiden Schlüsselproteine zeigen sich deutliche Veränderungen in der Aktivität. Tiere, die einer Hyperoxie (80 % O_2) ausgesetzt wurden, zeigten im Immunoblot eine verminderte Aktivität von p-Akt und p-ERK1/2 wie Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15 darstellen. Die Aktivität von p-Akt sinkt dabei über 48 Stunden kontinuierlich ab bis auf die Hälfte der Aktivität der Normoxiegruppe. Die Aktivität von p-ERK1/2 fällt ebenfalls unter Hyperoxie Exposition auf ungefähr die Hälfte ab.

Tiere, die nun zusätzlich eine Injektion Erythropoietin erhielten (20.000 IE/kg KG i.p.), zeigten diese verminderte Expression von p-ERK1/2 und p-Akt nicht. Stattdessen kam es zu einer Normalisierung der Aktivierung von p-ERK1/2 und p-Akt bis zur Höhe der Kontrolltiere in der Normoxiegruppe. Die Expression der phosphorylierten aktiven Form von ERK1/2 zeigt dabei schon nach einer Latenz von 12 Stunden nach EPO-Gabe einen ersten signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zur Hyperoxiegruppe. P-Akt dagegen wird unter der Behandlung von EPO erst nach 24 Stunden erstmals signifikant hochreguliert. Zusammengefasst zeigt sich, dass die phosphorylierten (aktiven) Formen unter Hyperoxie nach 12 Stunden beginnend herabreguliert werden und dass dieser Abfall der Proteinexpression durch die Gabe von EPO fast vollständig rückgängig gemacht werden kann. Damit verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen zellschützenden und apoptotischen Signalen auf die Seite der schützenden Mechanismen.

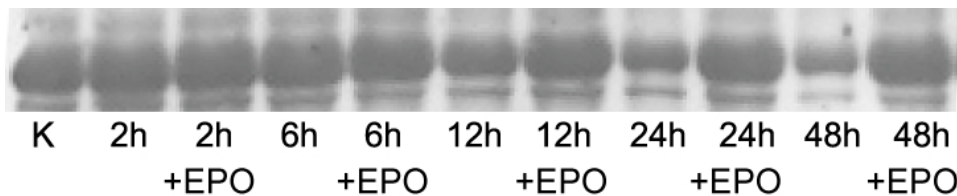


Abbildung 3.13: Übersichtsaufnahme Immunoblot von p-Akt über 48 Stunden im Vergleich EPO-Behandlung und Hyperoxie Exposition (K = Kontrolle).

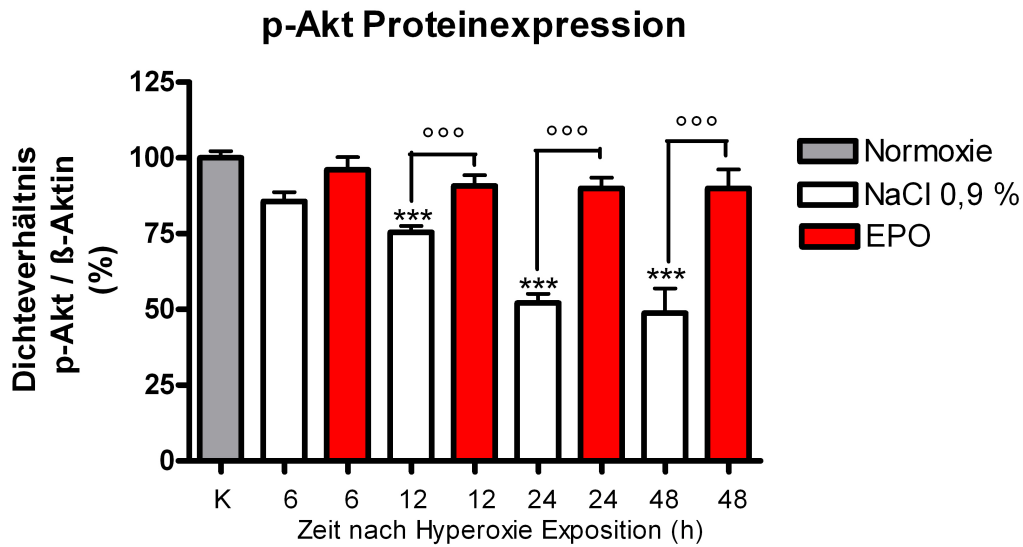


Abbildung 3.14: Proteineexpression der phosphorylierten aktiven Form von p-Akt. Tiere, die mit EPO intraperitoneal behandelt wurden zeigten im Vergleich zur Hyperoxiegruppe ab dem Zeitpunkt 24 Stunden keine verminderte Proteineexpression auf. Die Exposition mit Sauerstoff führt dagegen schon beginnend nach 6 Stunden Hyperoxieexposition zu einer Abnahme der p-Akt Proteineexpression und damit zu einer Störung des Zellüberlebens (* $p < 0,1$, *** $p < 0,001$). Daten der Zeitstufe 2 Stunden wurden nicht abgebildet.



Abbildung 3.15: Übersichtsaufnahme Immunoblot von p-ERK1/2 zu den Zeitstufen 2 bis 48 Stunden, im Vergleich EPO-Behandlung und Hyperoxie Exposition (K = Kontrolle).

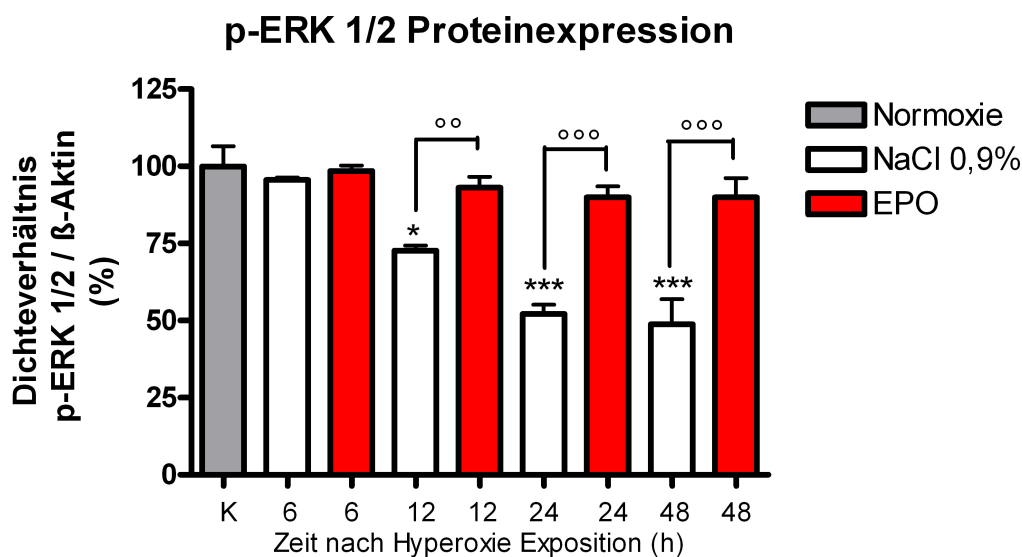


Abbildung 3.16: Proteinexpression der phosphorylierten aktiven Form von p-ERK1/2. Die schützenden Mechanismen von EPO werden über p-ERK1/2 frühzeitiger aktiviert. Eine signifikante Steigerung zeigt sich bereits nach 12 Stunden ($^{\circ} p < 0,01$, $^{\circ\circ} p < 0,001$). Die Auswirkungen der Hyperoxie Exposition (Daten mit * gekennzeichnet) mit Abnahme der Proteinexpression beginnt erst nach 12-stündiger Exposition und scheint im Vergleich zur Abnahme der p-Akt Proteinexpression weniger ausgeprägt zu sein (* $p < 0,1$, *** $p < 0,001$). Daten der Zeitstufe 2 Stunden wurden nicht abgebildet.

3.3.3 Erythropoietin reduziert Proteinexpression der Caspasen-2, -8 und -3, die durch Hyperoxie induziert werden

Um wichtige Signalwege des zelleigenen Apoptoseprogramms zu untersuchen, wurden Caspase-3 als zentrale Effektorcaspase, sowie die Caspasen-2 und -8 als Teil der extrinsischen Signalkaskade ausgewählt. Es wurde der Einfluss von Hyperoxie als Auslöser für die Aktivierung der Apoptose untersucht und ein möglicher protektiver Effekt durch eine exogene Gabe von Erythropoietin in der Dosierung von 20.000 IE/kg KG analysiert.

Es konnte dabei festgestellt werden, dass die Aktivität der Caspasen-2, -8 und -3 durch eine Exposition mit Hyperoxie reguliert wird. Sowohl die Effektorcaspase-3 als auch die Initiatorcaspasen-2 und -8 zeigen nach einer 12-stündigen Hyperoxie Exposition eine Steigerung der aktiven Form und damit eine Verstärkung der apoptotischen Signale. Die Hyperoxie Exposition unter 6 Stunden hat, wie die Daten (Abbildung 3.17, 3.19 und 3.21) zeigen können, zunächst einmal keinen Einfluss auf den Aktivierungsgrad der Caspasen. Caspase-2 und -8 sind beide Teil des DISC, der durch extrazelluläre Bindung an einen Todesrezeptor (beispielsweise TNF-alpha oder CD95) aktiviert wird, um

dann über die Effektorcaspase-3 die Ausführung des Zelltodes zu initiieren. Die Aktivität der Caspase-8 als Komponente dieses Komplexes wird erst sehr langsam hochreguliert und erreicht ihren Höhepunkt nach einer Exposition von 48 Stunden. Sie bleibt damit deutlich länger aktiviert als Caspase-2, deren Aktivitätshöhepunkt nach 24 Stunden gemessen werden kann, aber schon nach 48 Stunden im Vergleich wieder abfällt. Da beide Caspasen Teil des DISC sind, lässt sich vermuten, dass es durch das Zusammenspiel der beiden Caspasen zu einer optimalen und lang anhaltenden Aktivierung des Komplexes kommt. Durch die Gabe von EPO kann diese verstärkte Aktivität ab der Zeitstufe 12 Stunden signifikant reduziert werden, es wird jedoch keine Reduktion auf ein normales Aktivitätslevel wie in der Normoxiegruppe erreicht.

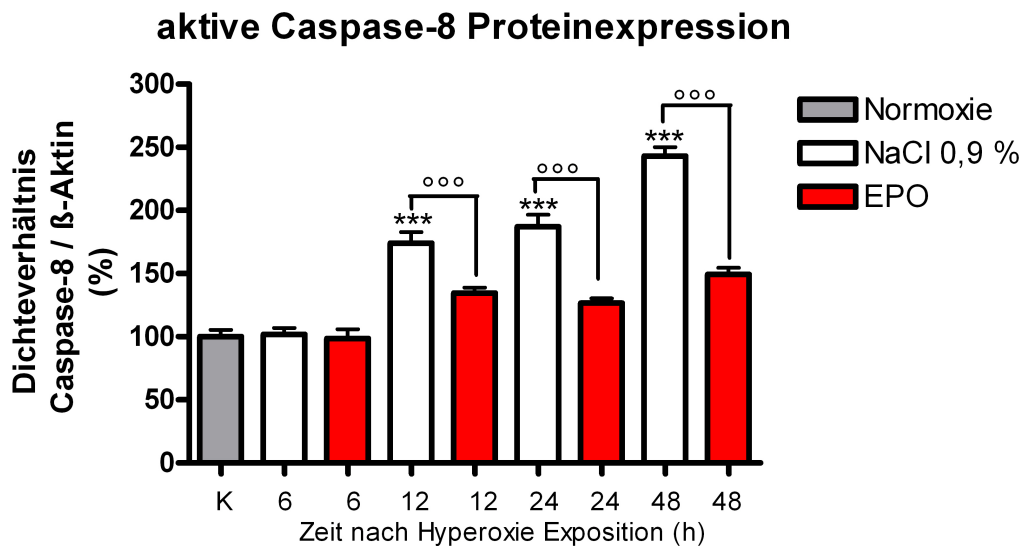


Abbildung 3.17: Proteinexpression der aktivierten Caspase- 8 über 48 Stunden im Vergleich Exposition mit Hyperoxie zu Hyperoxie plus EPO-Behandlung. Die Exposition mit 80 % O₂ führt schon nach 12 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Caspase- 8 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe, die auch noch nach 48 Stunden messbar ist (Daten mit (*) markiert, *** $p < 0,001$). Die Behandlung mit Epo vermindert dagegen den Anstieg der Caspase- 8 Proteinexpression signifikant (Daten mit (°) markiert, °°° $p < 0,001$, K = Kontrolle). Daten der Zeitstufe 2 Stunden wurden nicht abgebildet.



Abbildung 3.18: Übersichtsaufnahme Immunoblot von Caspase-8 zu den Zeitstufen 2 bis 48 Stunden im Vergleich EPO und Hyperoxie Exposition (K = Kontrolle).

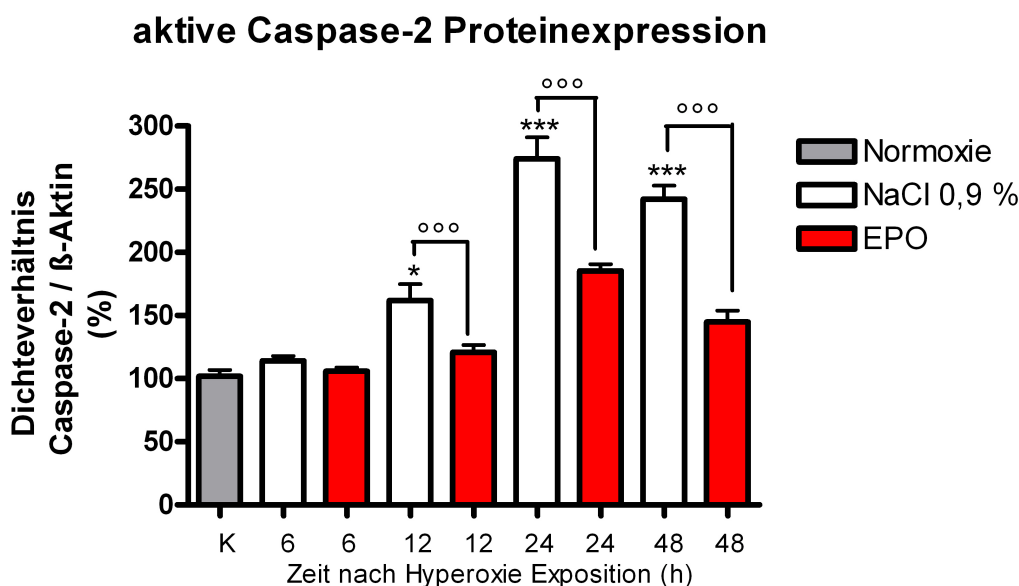


Abbildung 3.19: Proteinexpression der aktivierten Caspase-2 über 48 Stunden im Vergleich Exposition mit Hyperoxie zu Hyperoxie plus EPO-Behandlung (Kon= Kontrolle). Zum Zeitpunkt 24 Stunden zeigt sich die höchste Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Daten mit (*) markiert, * $p < 0,1$, *** $p < 0,001$). Die Behandlung mit Epo vermindert dagegen den Anstieg der Caspase- 2 Proteinexpression signifikant (Daten mit (°) markiert, °°° $p < 0,001$, K = Kontrolle). Daten der Zeitstufe 2 Stunden wurden nicht abgebildet.

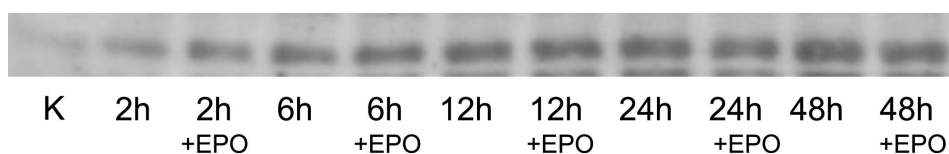


Abbildung 3.20: Übersichtsaufnahme Immunoblot von Caspase-2 über 48 Stunden, die Behandlung mit EPO führt zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität (K = Kontrolle).

Auch die Effektorcaspase-3 wird durch die Exposition mit Hyperoxie beeinflusst. Abbildung 3.12 zeigt, dass erst nach einer 12- stündigen Hyperoxie die Aktivität der Caspase-3 gesteigert wird. Dies ermöglicht die Vermutung, dass eine kürzere Exposition mit Hyperoxie keinen Einfluss auf die Aktivität der Caspase-3 hat. Sie stellt den Mittelpunkt der Zelltodmaschinerie der Caspasen dar und ist dementsprechend ein wichtiger Indikator, ob das Signal, welches über den Todesrezeptor und die Caspasen-2 und -8 vermittelt wurde, intrazellulär umgesetzt wird und es zu der Spaltung wichtiger lebensnotwendiger Proteine kommt. Wir konnten darstellen, dass es unter einer Hyperoxie Exposition zu einer kontinuierlichen Steigerung der Aktivität kommt. Nach 12 Stunden zeigt sich bereits eine signifikante Steigerung (** $p < 0,01$), die über die Zeit bis 48 Stunden weiter ansteigt (***) $p < 0,001$). Diese gesteigerter Aktivität kann durch die intraperitoneale Gabe von EPO signifikant reduziert werden ($^{\circ\circ} p < 0,05$). Eine Aussage, über welchen Mechanismus die Caspase-3 in ihrer Aktivität behindert wird, lässt sich dabei aber nicht treffen. Einerseits könnte die Signalweitergabe über den extrinsischen, rezeptorvermittelten Mechanismus, wie beispielsweise über verminderte Aktivität des DISC durch die EPO-Gabe gestört sein, oder aber EPO hat einen direkten Einfluss auf den Aktivitätsgrad der Caspase-3.



Abbildung 3.21: Übersichtsaufnahme Immunoblot von Caspase-3 über 48 Stunden, die Behandlung mit EPO führt zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität (K = Kontrolle).

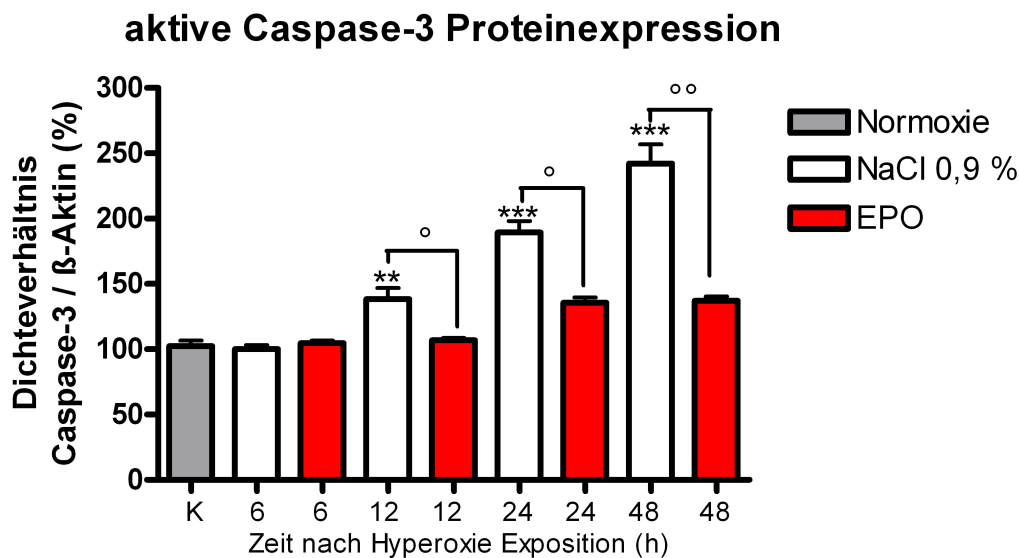


Abbildung 3.22: Proteinexpression der aktivierten Caspase-3 nach Hyperoxie Exposition über 48 Stunden und nach Gabe von EPO. Die Wirkung von EPO scheint nach 48 Stunden am effektivsten, da das Aktivitätsniveau der aktivierten Caspase-3 deutlich gesenkt wird (Daten mit (°) markiert, ° $p < 0,1$, °° $p < 0,05$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe führt die Exposition mit Sauerstoff beginnend nach 12 Stunden zu einem erhöhten Aktivitätsgrad der aktiven Caspase-3 und somit zu einem vermehrten Zelltod (Daten mit (*) markiert, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Eine kürzere Sauerstoffexposition hat zunächst keinen Einfluß auf die Aktivierung der Caspase-3. Daten der Zeitstufe 2 Stunden wurden nicht abgebildet.

3.3.4 Bestätigung der Ergebnisse mittels Caspase-2- und Caspase-8-Aktivitätsassay

Die Aktivitätsassays für Caspase-2 und Caspase-8 wurden zur Verifizierung der durchgeführten Western Blots eingesetzt, da beide eine höhere Sensitivität aufweisen. Über die Assays wird der direkte Grad an Aktivität bestimmt. Auch in dieser Untersuchungsmethode konnten unsere Ergebnisse reproduziert werden. Wie schon in der Western Blot-Analyse festgestellt wurde, kommt es bei der Caspase-2 zu einem raschen Anstieg der Aktivität nach 24 Stunden. Dort zeigt sich das Maximum an Aktivität mit einer Verdoppelung der Aktivität. Nach 48 Stunden ist die Aktivität bereits wieder abgefallen. Im Aktivitätsassay wird noch deutlicher, dass es erst nach 24 Stunden Exposition mit Hyperoxie zu einem signifikanten Aktivitätsanstieg kommt. Durch die Gabe von EPO wird die Hochregulation der Caspase-2 deutlich gemindert, das Aktivitätsniveau von Caspase-2 steigt nur um das Doppelte an.

Auch die Aktivität der Caspase-8 nimmt im Assay einen ähnlichen Verlauf wie im

Western Blot beobachtet. In Abbildung 3.24 zeigt sich deutlich, dass die Aktivität der Caspase-8 durch die Hyperoxie Exposition auf das 5-fache gesteigert wird. Im Vergleich liegt die Caspase-8 Aktivität eines Tieres, welches Normoxie ausgesetzt war bei 100, nach 24 Stunden liegt sie nach Hyperoxie Exposition bereits bei 700, bleibt das Tier über 48 Stunden in Hyperoxie, so läßt sich bereits eine Caspase-8 Aktivität von fast 1000 (***) detektieren. Hyperoxie Exposition führt zu einem deutlichen Anstieg der Caspase-8 Aktivität. Appliziert man zusätzlich EPO, so zeigt sich deutlich, dass der Aktivitätsgrad der Caspase-8 gemindert wird, er liegt über 48 Stunden nahezu konstant bei Werten um 200 und ist damit fast identisch mit dem Vergleichswert der Normoxiegruppe (°°° $p < 0,001$). Unter EPO-Therapie kommt es folglich zu einer fast vollständigen Aufhebung der induzierenden Wirkung von Hyperoxie auf die Caspase-8.

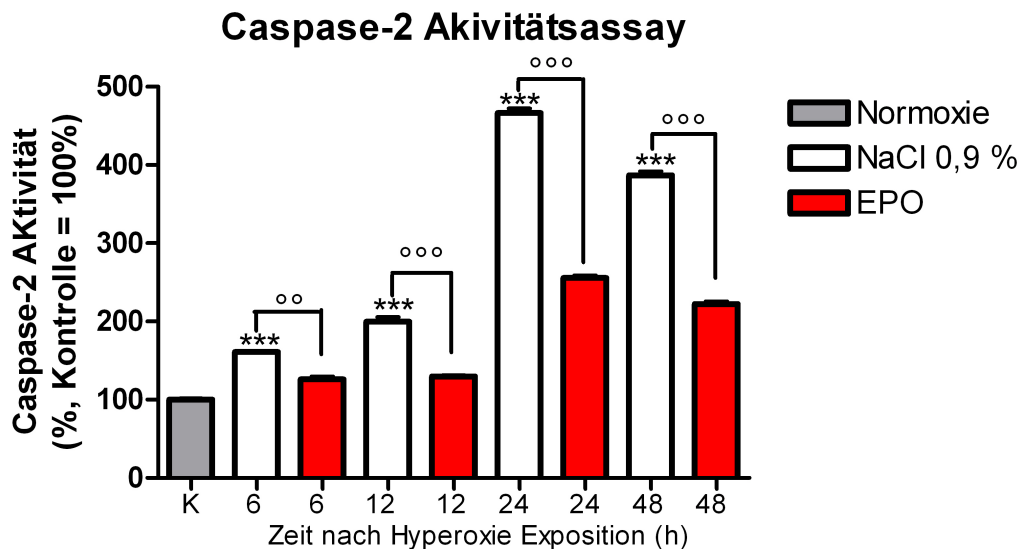


Abbildung 3.23: Caspase-2 Aktivitätsassay. Angaben der Aktivität über 48 Stunden Hyperoxie mit und ohne zusätzliche Behandlung mit EPO in Relation zu einem Kollektiv an Tieren, die Normoxie ausgesetzt waren. Die Aktivität steigt kontinuierlich an und erreicht den Höhepunkt nach 24 Stunden. Die mit dem Kreis (°) bezifferten Angaben beziehen sich auf den Vergleich der Aktivität der Tiere der gleichen Zeitstufe mit und ohne EPO-Behandlung (°° $p < 0,01$, °°° $p < 0,001$). Der Vergleich der Caspase-2-Aktivität unter Hyperoxie zur Kontrollgruppe wird mit einem Sternchen (*) beziffert (***) $p < 0,001$).

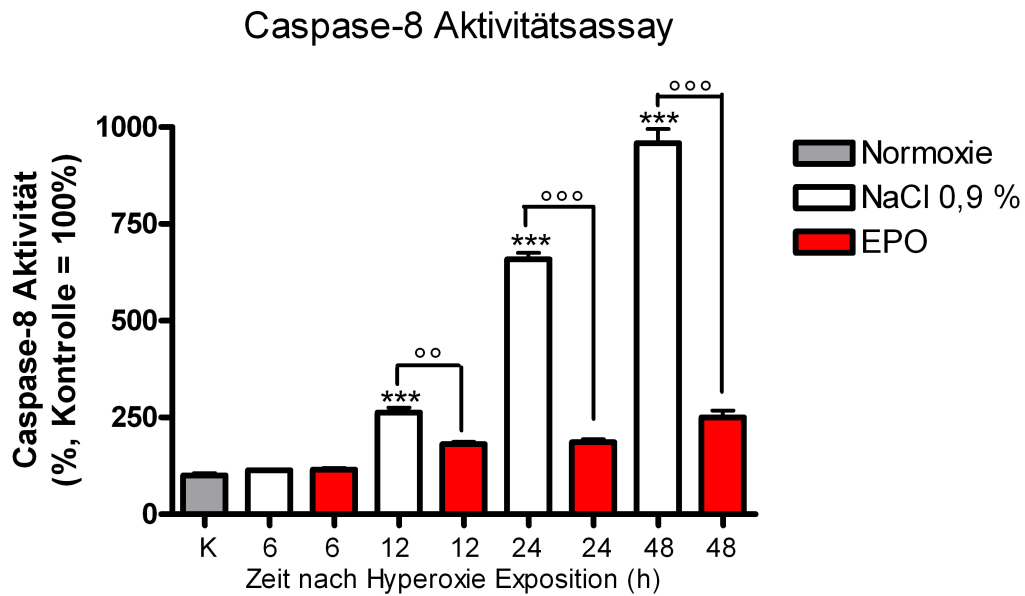


Abbildung 3.24: Caspase-8 Aktivitätsassay. Angaben der Aktivität über 48 Stunden Hyperoxie mit und ohne zusätzliche Behandlung mit EPO in Relation zu einem Kollektiv an Tieren, die Normoxie ausgesetzt waren. Die Aktivität unter Sauerstoffexposition langsam kontinuierlich über 48 Stunden an. Die mit dem Kreis (°) bezifferten Angaben beziehen sich auf den Vergleich der Aktivität der Tiere der gleichen Zeitstufe mit und ohne EPO-Behandlung (°° $p < 0,01$, °°° $p < 0,001$). Der Vergleich der Caspase-8-Aktivität unter Hyperoxie zur Kontrollgruppe wird mit einem Sternchen (*) beziffert (***) $p < 0,001$).

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Betrachtung

Ziel der Arbeit war es die Auswirkung der Hyperoxie Exposition auf das neonatale Rattengehirn im Hinblick auf mögliche schädigende Auswirkung durch Induktion des apoptotischen Zelltodes zu untersuchen. Dazu wurden die Effektorcaspase-3 als zentrales Ausführungsorgan in der apoptotischen Kaskade, sowie die Initiatorcaspasen-2 und Caspase-8 als Teil der extrinsischen Signalkaskade auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Zusätzlich sollte eine mögliche Neuroprotektion vor schädigender Hyperoxie Exposition durch die exogene Applikation von Erythropoietin analysiert werden. Hierzu wurde die Induktion von BDNF als Neurotrophin auf Gen- und Proteinebene untersucht, sowie zentrale Proteine seiner neuroprotektiven Signalübertragung wie p-Akt und p-ERK1/2.

Die Arbeit konnte zeigen, dass die Exposition des sich entwickelnden Rattengehirns mit 80%-igem Sauerstoff über 24 Stunden zu einer signifikanten massiven apoptotischen Neurodegeneration führt, wie sich beispielsweise in den histologischen Aufnahmen in der DeOlmos-Kupfer-Silber-Färbung zeigen lässt. Auf molekularbiologischer Ebene zeigt sich, dass Hyperoxie Einfluss auf unterschiedliche Faktoren ausübt, die für das Überleben von Neuronen eine entscheidende Rolle spielen. Es kommt einerseits zu einer Veränderung der Genexpression und Phosphorylierung von wichtigen Proteinen für das Überleben der Zelle und andererseits zur Aktivierung der apoptotischen Signalwege über die Caspasen-Kaskade, die zu einem vermehrten Zelluntergang führen.

Nach 12-stündiger Hyperoxie werden die Effektorcaspase-3 und der extrinsische Weg über die Initiatorcaspasen Caspase-2 und Caspase-8 beginnend hochreguliert. Auch führt die Exposition mit 80%-igem Sauerstoff zu einer Veränderung der Expression von BDNF auf Gen- und Proteinebene. Die verminderte mRNA-Synthese von BDNF führt zu einer Abnahme der schützenden Signalkaskaden über die aktivierten, phosphorylierten Formen von Akt und ERK1/2.

Es konnte auf histologischer und molekularbiologischer Ebene gezeigt werden, dass durch die intraperitoneale Gabe von EPO die Hochregulierung und die vermehrten neurodegenerativen Prozesse in Teilen wieder aufgehoben werden. Es kommt zu einer fast vollständigen Wiederherstellung der Gen- und Proteinexpression von BDNF mit konsekutiver Aktivierung der Schlüsselproteine Akt und ERK1/2, die für zwei wichtige Überlebenssignalwege der Zelle, MEK-ERK1/2 und P1(3)-Kinase-Akt, stehen. Zusätzlich konnte eine Beeinflussung der pro-apoptotischen Kaskade durch Angleichung des Aktivitätsniveaus von Caspase-2, -3 und -8 als wichtiger Bestandteil der Ausführung des aktiven Zelltodes an einen Aktivitätszustand, der fast normoxischen Bedingungen gleicht, beobachtet werden.

Beobachtungen über die Wirkweise der Neurotrophine mit den intrazellulären nachfolgenden Signalwegen über p-Akt und p-ERK1/2 als zentraler Drehpunkt im Überleben der Zelle können in anderen Schädigungsmodellen reproduziert werden. Die Behandlung von sieben Tage alten Ratten mit dem NMDA-Antagonisten MK801 führt ebenfalls zu einer verminderten Expression von BDNF sowie zu einer Abnahme von p-Akt und p-ERK1/2 [97]. Auch die Behandlung sieben Tage alter Ratten mit einem „Narkosegemisch“ aus Midazolam, Isofloran und Lachgas führt zu einer schnellen Störung der BDNF-vermittelten Überlebenswege in Neuronen, verbunden mit der Aktivierung der Neurotrophin-vermittelten apoptotischen Neurodegeneration: Herunterregulierung der Akt-Aktivität mit Hochregulierung der Caspase-9 und Caspase-3 Aktivität, wodurch der zentrale Faktor von p-Akt in der Neurotrophin-abhängigen Vermittlung der apoptotischen Kaskade unterstrichen wird [98].

4.2 Hyperoxie

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits eine 24-stündige Exposition mit Hyperoxie zu einer Zunahme der apoptotischen Zellen, einer Abnahme der schützenden Signalkaskaden über BDNF, sowie zu einer Induktion der Apoptose über die Caspasenkaskade führt. Diese Erkenntnis lässt sich auch auf andere Organsysteme wie Lunge und Retina übertragen, die anfällig für eine Sauerstoffexposition sind. In beiden Systemen konnte der durch Hyperoxie ausgelöste apoptotische Zelltod durch die Aktivierung der schützenden Signalkaskaden über ERK1/2 und Akt und durch den Wachstumsfaktor BDNF eingedämmt werden [99, 100]. In Pre-Oligodendrozyten und unreifen Oligoden-

drozytenkulturen ist nach einer 48-stündigen Exposition mit 80%-igem Sauerstoff eine verminderte Lebensfähigkeit zu beobachten, *in vivo* wird zusätzlich als Zeichen des vermehrten Zellunterganges von unreifen Oligodendrozyten eine vermehrte Caspase-3 Aktivität gemessen [101].

Als Ursache für die erhöhte Empfindlichkeit des sich entwickelnden Gehirns gegenüber Sauerstoff kann das unreife zelluläre Antioxidationssystem mit einem Mangel an Vitamin A, E und C genannt werden, sowie die Unfähigkeit die Antioxidationssysteme wie Superoxiddismutase, Katalase oder Glutathionperoxidase nach exzessiver Sauerstoffexposition adäquat hochzuregulieren. Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Exposition mit Hyperoxie eine massive Produktion von freien Sauerstoffradikalen wie iNOS induziert sowie zu einer erhöhten NO-Produktion führt. Die erhöhte Proteinsynthese führt zur Bildung von Peroxynitrit, welches schädigende Auswirkungen auf die Struktur des sich entwickelnden Gehirns hat [102]. Zusammenfassend kann man sagen, dass es durch die Exposition mit Sauerstoff zu einer Vielzahl an schädigenden Mechanismen kommt, die sowohl auf Transmitter- als auch auf Proteinebene zu einer Störung der gesamten zellulären Mechanismen führen und in eine vermehrte Neurodegeneration münden.

Die Erkenntnis, dass Sauerstoff zu Schäden in unreifen Organen wie Gehirn, Lunge und Retina beiträgt, hat zu einem Umdenken in der Benutzung von Sauerstoff bei Früh- und Neugeborenen geführt. Große Perinatalzentren wie Atlanta haben neue Kriterien zur Sauerstoff-Behandlung evaluiert um Spätschäden in beispielsweise ELBWs zu vermindern. Um Hyperoxie zu vermeiden wurden die Alarmgrenzen der O_2 -Sättigung von 92%-100% auf eine erwünschte O_2 -Sättigung zwischen 85%-93% korrigiert. Eine Kohorten-Studie mit einem Vergleich der beiden Beatmungsregime konnte dabei eine positive Auswirkung bezüglich der Schäden in Lunge und Retina aufzeigen, indem eine Erniedrigung der ROP-Rate und ein gesunkener Bedarf in der Steroidtherapie nachgewiesen wurde. Zusätzlich konnte eine signifikante Abnahme der Mortalität beobachtet werden. Bezüglich des Gehirns konnte nur festgestellt werden, dass die Vermeidung von Hyperoxie keine negativen Auswirkungen auf das langfristige neurologische Outcome der Patienten nach 18 Monaten hat, wie zunächst befürchtet wurde [103].

Um das Gehirn vor schädigenden Einflüssen durch Hyperoxie schützen zu wollen, reicht unter diesen Gesichtspunkten eine alleinige Reduzierung der Sauerstofftherapie nicht aus. Möglicherweise scheinen die schädigenden Mechanismen auf das Gehirn einen komplexeren und vielfältigeren Zusammenhang zu haben, so dass eine unterstützende medikamentöse Therapie in Betracht zu ziehen ist.

4.3 EPO und BDNF

In unserem Schädigungsmodell konnte gezeigt werden, dass es nach 24-stündiger Hyperoxie Exposition unter Gabe von EPO 24 Stunden nach der Schädigung zu einer Gegenregulation mit Hochregulierung der Genexpression von BDNF kommt. Die BDNF-Proteinexpression steigt zeitlich verzögert ebenfalls an, worin sich die physiologische Umschreibung von Gen- auf Proteinebene widerspiegelt. In vielen experimentellen Schädigungsmodellen zeigt sich, dass EPO eine längere Periode braucht, um seine neuroprotektive Wirkung zu vermitteln [76, 83]. Hintergrund dieser Tatsache könnte der Zeitbedarf für die Induktion eines schützenden Genprogrammes sein, wie beispielsweise die Induktion von BDNF. Möglicherweise kann durch die Gabe von EPO eine natürliche neuroprotektive Antwort über die Hochregulierung von BDNF verstärkt und die verzögerte endogene EPO-Reaktion ausgeglichen werden. Zusätzlich zu der Aktivierung der schützenden Signalkaskaden über p-Akt und p-ERK1/2 werden über BDNF auch verschiedene andere Signalwege aktiviert, die die wichtige Rolle von BDNF im zelleigenen Schutzmechanismus unterstreichen: in hippocampalen Neuronenkulturen induziert die Gabe von EPO die Produktion von BDNF und führt zu einer langfristigen Aktivierung von Trk, der für die Vermittlung der anti-apoptotischen Kaskade verantwortlich ist. Die Gabe eines BDNF-Antikörpers führt zu einer reduzierten Neuroprotektion und Phosphorylierung von Trk [83]. In einem *in vivo* Modell der hypoxisch-ischämischen Schädigung im sich entwickelnden Gehirn wird die Hochregulierung der Caspase-3 als Zeichen der Schädigung durch eine exogene Gabe von BDNF fast vollständig aufgehoben [104]. Auch in einem Modell der globalen Ischämie in CA1 Neuronen wird durch die Gabe von EPO die Expression von BDNF erhöht [105]. In primären Neuronenkulturen führt die Behandlung mit BDNF zu einem Schutz der Zellen vor Schädigung durch Bestrahlung und Sauerstoffentzug durch Blockade der Aktivität von Caspase-3 [106]. BDNF greift auf verschiedensten Ebenen in das Überleben der Zelle ein und wird durch die exogene Gabe von EPO induziert. In wieweit die einzelnen von uns untersuchten Kaskaden auch unabhängig von BDNF beeinflusst werden, ist dabei nicht klar zu unterscheiden.

4.4 EPO und Akt, ERK1/2

Es konnte ebenfalls aufgezeigt werden, dass eine Behandlung mit EPO signifikant zu einer Hochregulierung zweier wichtiger Signalwege im Überleben der Zelle führt: sowohl

der MEK-ERK1/2, als auch der P1(3)-Kinase-Akt-Signalweg werden aktiviert und die Herabregulierung durch eine Hyperoxie fast vollständig wieder aufgehoben.

Im Mittelpunkt der Vermittlung der anti-apoptotischen Wirkung von EPO über Akt und ERK1/2 steht JAK-2. Die Bindung von EPO an seinen Rezeptor löst die Dimerisation aus und führt zur Tyrosinphosphorylierung von Jak-2, die zur Phosphorylierung verschiedener nachstehender Signalkaskaden wie Stat-5, MAPK, PI(3)K und zur Aktivierung von NF-kappa b führt. Die Steigerung der synaptischen Übertragung in hippocampalen Zellkulturen wird dabei durch einen JAK-2 Inhibitor geblockt [107], wodurch die zentrale Rolle von JAK-2 in der Übermittlung von EPO unterstrichen wird.

Der Signalweg über PI(3)K, in dem Akt eine zentrale Funktion einnimmt, fördert das Überleben von Zellen durch seine anti-apoptotische Wirkung [108]. Durch die Aktivierung von JAK-2 und anschließender Phosphorylierung von Akt werden pro-apoptotische Proteine wie Forkhead [108], Bad [109], GSK3 [110] und Caspase-9 [111] durch Phosphorylierung inaktiviert. Akt hat zusätzlich eine stabilisierende Wirkung auf die mitochondriale Membran [112] und kann die Aktivität von Caspase-9 und Caspase-3 direkt inhibieren [113]. Die Phosphorylierung und damit der Grad der Aktivierung von Akt hängt dabei von der Aktivität der PI(3)Kinase und JAK-2 ab.

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) beinhalten die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen ERK1/2, die *c-Jun* terminale Kinase (*c-Jun-amino terminal kinase*, JNK) und die p38 Kinase. Die anti-apoptotischen Funktionen des ERK-Signalweges liegen in der Fähigkeit, CREB zu aktivieren und den mitochondrialen apoptotischen Weg über Phosphorylierung von Bad und Caspase-9 zu unterbinden [105].

In menschlichen Blutvorläuferzellen wird beispielsweise der apoptotische Zelluntergang durch Akt inhibiert [114]. Nach NO-Exposition von hippocampalen Stammzellkulturen und EPO kann eine gesteigerte Akt-Aktivität gemessen werden, die mit der Phosphorylierung und Inaktivierung von Bad verbunden ist und eine vermehrte Neuroprotektion zur Folge hat [109]. In einem Modell der Hirnischämie führt die Applikation von EPO zu einer Induktion der Aktivität von JAK-2, ERK1/2 und Akt, die mit einem erhöhten Gehalt an Bcl-Xl und erniedrigten Niveau von NO-Synthase 1 und 2 verbunden ist. Die selektive Blockierung von ERK1/2 durch den Inhibitor PD98059 und von PI(3)K durch den Inhibitor Wortmannin führt nur zu einer Reduzierung der gewebesetzenden Wirkung von EPO und nicht zu einem kompletten Ausfall der Wirkung in Bezug auf die Reduzierung der NO-Synthase1/2 Inhibierung, was die wichtige Rolle von p-Akt und p-ERK1/2 in der Vermittlung der neuroprotektiven Wirkung von EPO unterstreicht,

aber auch aufzeigt, dass es möglicherweise einen zusätzlichen alternativen Mechanismus geben kann, der für die neuroprotektive Wirkung verantwortlich ist [115].

Auch unter globaler Ischämie wird im Rattengehirn nach EPO-Applikation eine Hochregulierung von Akt beobachtet, die in einem vermehrten Überleben der Zelle mündet und durch den PI(3)K Inhibitor LY294002 vollständig aufgehoben wird [105].

Die Rolle von ERK1/2 in der Vermittlung der anti-apoptotischen Wirkung von EPO ist in der Forschung bisher widersprüchlich diskutiert worden. Je nach Schädigungsmodell scheint ERK1/2 eine untergeordnete Rolle bei der Vermittlung des antiapoptotischen Settings wie bei der Parkinsonerkrankung [116] beziehungsweise kardialer [117] oder cerebraler Ischämie [105, 118] zu spielen. Auf der anderen Seite konnten andere Arbeiten feststellen, dass die Involvierung von ERK1/2 notwendig für die antiapoptotische Vermittlung ist [115, 119]. Beispielsweise wird die neuroprotektive Wirkung von BDNF durch Verstärkung der Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 im neonatalen Hypoxie-Ischämie-Modell nur durch die Inhibierung von ERK1/2 aufgehoben, eine Blockierung von Akt reicht nicht aus [120]. Auch unsere Arbeit unterstreicht die wichtige Funktion von ERK1/2 in der Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung von EPO auch besonders im Hinblick auf den zeitlich schnelleren Anstieg von p-ERK1/2 nach EPO-Gabe.

Beobachtet man aber die Rolle von ERK1/2 in einem Modell des Schlaganfalls, so scheint ERK1/2 je nach Art der Aktivierung eine doppelte Funktion einzunehmen. Einerseits führt die Aktivierung über exogene Wachstumsfaktoren und Östrogen zu einer Neuroprotektion über die Stimulierung des anti-apoptotischen Bcl-2 und Blockierung des pro-apoptotischen Bad, andererseits kann die Aktivierung über Zytokine und freie Radikale das Ausmass der Schädigung nach einem ischämischen Ereignis vergrößern, indem es zu einer Hochregulation von IL- β beiträgt [121].

Unter ischämischen Bedingungen trägt die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Molekülen (ROS) oder freien Radikalen zu einem neuronalen Hirnschaden bei. Diese erhöhte ROS-Produktion ist aber auch mit einer erhöhten ERK1/2-Aktivität verbunden, so dass ERK1/2 möglicherweise einen Beitrag zu einem ischämischen Schaden leisten könnte. Ursache hierfür ist vielleicht die ausbleibende Inaktivierung von ERK1/2 durch Phosphatasen, da diese durch anhaltenden oxidativen Stress selber inaktiviert werden [119].

4.5 EPO und Caspasen

Die Caspasen sind an einer Vielzahl von schädigenden Mechanismen in der Zelle beteiligt. Diese Arbeit zeigt eine Hochregulierung der extrazellulären Caspasenkaskade über Caspase-2 und -8 und der Effektorcaspase-3 nach Hyperoxie Exposition und Herunterregulierung nach Gabe von EPO, die sich mit den Ergebnissen anderer Schädigungsmodelle decken. Bisher wurde dabei der Blick aber intensiv auf die Effektorcaspase-3 gelegt und nur sehr wenig über die Rolle der Initiatorcaspasen in Erfahrung gebracht.

In einem Modell der Rückenmarksverletzung konnten anti-apoptotische und anti-inflammatorische Effekte durch Reduktion der erhöhten Caspase-3-Aktivität und Myeloperoxidaseaktivität nach EPO-Applikation nachgewiesen werden [122]. Ähnliche Phänomene lassen sich auch in einem anderen Schädigungsmodell mit Anoxie und NO-Gabe in Neuronenkulturen beobachten: die intraperitoneale Gabe von EPO führt zu einer Reduzierung der Caspase-8-, Caspase-1- und Caspase-3-Aktivität [123]. In einem PC 12-Zellkultur-Schädigungsmodell des M. Parkinson, wird durch die Gabe von EPO die Apoptose verhindert, indem der Akt/GSK-3-Beta/Caspase-3 Signalweg aktiviert wird [117].

Caspase-2 und Caspase-8 als Teil des DISC werden in unseren Untersuchungen nicht zeitgleich durch Hyperoxie aktiviert, sondern zeitlich versetzt: Caspase-2 wird schon nach sechs Stunden beginnend hochreguliert und fällt nach 24 Stunden wieder ab, Caspase-8 dagegen erreicht sein Aktivitätsmaximum erst nach 48 Stunden. Die Exposition mit Hyperoxie führt dementsprechend zu einer lang anhaltenden Aktivierung des DISC und damit zur Aktivierung der extrazellulären Vermittlung der apoptotischen Kaskade [124]. Die Fähigkeit von EPO, die Aktivität der Caspasen-3,-8 und -2 zu beeinflussen, scheint eine wichtige Rolle in der Neuroprotektion von EPO zu spielen. Jedes dieser Proteine ist mit einem unabhängigen apoptotischen Mechanismus assoziiert, der zur DNA-Spaltung oder Phosphatidylserin-Exposition führt. EPO scheint in der Lage zu sein, die genomische DNA-Integrität zu erhalten und zu stabilisieren.

4.6 Affinität des EPO-R

Für die Vermittlung der hämatopoetischen Wirkung bei renaler Anämie wird in der Medizin eine EPO-Dosierung von 100-1000 U/kg empfohlen[125]. In experimentellen Studien zeigte sich aber wiederholt, dass diese niedrige Dosierung für die Vermittlung

der neuroprotektiven Wirkung nicht ausreicht. Hintergrund hierfür ist die unterschiedliche Affinität des EPO-R für EPO in verschiedenen Zellen: der EPO-R auf PC 12-Zellen und Astrozyten wird erst ab einer sehr hohen EPO-Konzentration von 10.000 pM angesprochen. Dies spiegelt sich auch in den verschiedenen Experimenten wieder: in unserem Hyperoxie-Modell zeigt sich beispielsweise, dass erst die Dosierung von 20.000 IE /kg KG im Vergleich zu 10.000 IE/kg KG zu einer signifikanten Reduzierung des apoptotischen Scores führt. Auch in einem MK-801-Modell führt erst eine Dosierung von 20.000 IE /kg KG zu einer signifikanten Reduzierung des apoptotischen Scores und eine Dosissteigerung oder zweimalige Gabe hat keinen steigernden Effekt [97]. Betrachtet man EPO und EPO-R als zelleigenes Schutzsystem, so spricht die geringe, im nanomolaren Bereich liegende Affinität des EPO-R auf PC 12-Zellen und die normalerweise im Blut zirkulierende hohe Menge an EPO (1-5 pM) dafür, dass EPO seine neuroprotektive Wirkung möglicherweise nur über den parakrinen und autokrinen Weg im Gehirn vermittelt [80, 126].

4.7 EPO und EPO-R in der Neurogenese

Die Rolle von EPO und EPO-R im Nervensystem erstreckt sich über die Gewebeoxygenierung hinaus, ihm fällt während der kritischen Phase der neuronalen Entwicklung eine entscheidende Rolle zu. EPO und EPO-R *knockout* Mäuse zeigen beispielsweise Defekte in der Neurogenese wie unterentwickelte Gehirnregionen und ein geringeres Hirnwachstum auf, die eindeutig mit dem Nichtvorhandensein von EPO und EPO-R korrelieren. Die identischen Phänotypen in Bezug auf hämatopoetisches und neuronales Verhalten von EPO- und EPO-R *knockout* Mäusen legen das Augenmerk auf die Wichtigkeit des klassischen EPO-R in der Neurogenese.

Brines *et al.* stellten fest, dass EPO an zwei verschiedene Rezeptoren binden kann, einmal an den klassischen EPO-R, für den eine hohe Affinität vorliegt und einmal an β cR (CD 131), für den nur eine sehr geringe Affinität besteht. Im zentralen Nervensystem scheint die neuroprotektive Wirkung über β cR vermittelt zu werden, wie ein Ausfall der Neuroprotektion von EPO in β cR *knockout* Mäusen zeigt [79]. Auch EPO-R *knock-down* Mäuse zeigen keinen Unterschied in der Infarktgröße nach einem evozierten Schlaganfall auf, was die Überlegung unterstreicht, dass es für die Vermittlung der Neuroprotektion einen alternativen Mechanismus geben könnte, beispielsweise über Bindung an die β -Rezeptoruntereinheit[127].

Interessanterweise zeigen β cR *knockout* Mäuse aber keine hämatopoetischen, kardialen oder sogar neurologische Defekte auf, so dass die Vermutung nahe liegt, dass das für die Neurogenese erforderliche EPO nur über den klassischen EPO-R vermittelt wird. Andere Überlegungen zeigen auf, dass sich der EPO-R des Gehirns hinsichtlich seiner Affinität für EPO, dem molekularen Gewicht und seiner assoziierten Proteine vom EPO-R im restlichen Gewebe unterscheidet.

Die Rolle von EPO und seinem Rezeptor besonders im sich entwickelnden Gehirn ist noch nicht hinreichend geklärt. Weiterhin unklar bleibt, ab wann die Neurogenese über EPO-R beendet ist und die Neuroprotektion über β cR vermittelt wird oder ob es parallele Systeme der beiden Rezeptoren gibt.

4.8 EPO als körpereigenes Schutzsystem und seine Folgen

Im Gehirn scheinen EPO und sein Rezeptor eine wichtige Rolle im ZNS-eigenen Sicherheitssystem bei hypoxischen und ischämischen Schäden zu spielen. Das Gehirn reagiert wie alle anderen Zellverbände sehr sensibel auf Hypoxie und Ischämie mit Zelluntergang. Im menschlichen Gehirn führt ein ischämischer Insult zu einer verstärkten Expression von EPO und EPO-R in Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen [128].

Werden neuronale Zellen durch Hypoxie präkonditioniert, führt dies zu einem vermehrten Überleben der Zelle bei einem folgenden schwereren hypoxischen Ereignis. Im Zentrum dieses Schutzmechanismus steht wahrscheinlich die endogene Produktion von EPO durch Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen, da bekannt ist, dass diese auf Hypoxie mit vermehrter EPO-Produktion reagieren [68]. Eine 180-minütige hypoxische Präkonditionierung im Mausmodell und anschließende Hypoxie senkt das Infarkt volumen signifikant. Hintergrund ist eine vermehrte HIF-1 DNA-Bindungsaktivität und eine erhöhte Transkription des Erythropoietingens. Durch Hinzufügen eines löslichen EPO-Rezeptors oder EPO-Antikörpers wird dieser protektive Effekt wieder um 40-88 % reduziert, aber nicht vollständig aufgehoben, was einen möglichen zusätzlichen Schutzmechanismus der Zelle vor hypoxischen Ereignissen vermuten lässt [129, 130].

Kombiniert man aber die ischämische Präkonditionierung mit der Gabe von EPO, so muss man feststellen, dass zwei schützende Mechanismen zusammen nicht zu einer Potenzierung führen, sondern ganz im Gegenteil einen schädigenden Effekt auf das Gehirn haben. Weber *et al.* konnten zeigen, dass eine vorübergehende moderate Hypoxie (10 % O_2) in Kombination mit einer hohen Dosis an EPO von 40 IU/ml zu einem ver-

mehrten neuronalen Schaden und zu einem fast vollständigen Ausfall der schützenden Wirkung führt [131]. Möglicherweise führt die Präkonditionierung durch moderate Hypoxie zu einer Hochregulierung jenes EPO-Rezeptors mit einer hohen Affinität, der aber nicht für die Vermittlung der neuroprotektiven Wirkung von EPO verantwortlich ist. Eine Präkonditionierung durch Hypoxie kann also zu einem relativen Mangel von β cR und damit zu einem Ausfall der Vermittlung der Neuroprotektion führen, da nur der klassische EPO-R überproportional hochreguliert wird [132].

4.9 Nebenwirkungen von Erythropoietin

Ein potentielles Problem bei der chronischen Applikation von EPO in hohen Dosen zur Neuroprotektion sind die möglichen unerwünschte Nebenwirkung auf die Erythropoese, die zu einer Steigerung des Blutvolumens und erhöhter Plättchenaggregabilität führt. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Steigerung des Hämatokrit durch EPO-Applikation einen Hirnschaden verursachen und vergrößern kann [133]. Pharmakologische Dosen von EPO stimulieren zusätzlich die Produktion von hyperreaktiven Thrombozyten, die eine Thrombose prädisponieren können [134]. Systemisch appliziert kann EPO auch zu Hypertonus, hypertensiver Enzephalopathie und einer gesteigerten Arteriosklerose führen [133]. Auch eine gesteigerte Mortalität konnte bei Dialysepatienten, die eine Hochdosistherapie mit EPO erhalten hatten, retrospektiv nachgewiesen werden [125].

Untersucht man neugeborene Ratten, auf die Langzeitfolgen der Hochdosis-EPO-Therapie, so finden sich im Gegensatz keine der aufgeführten Nebenwirkungen [135, 136].

Es entstand ein Bedarf an nicht-erythropoetisch wirksamen EPO-Derivaten, die aber weiterhin neuroprotektive Wirkung vermitteln können, wie AsialoEPO und CarbamylEPO (CEPO). Beide versuchen auf verschiedene Weise die hämatopoetische Wirkweise und damit einige genannte Nebenwirkungen zu umgehen.

AsialoEPO besitzt eine zu kurze Halbwertszeit (1-2 Stunden, dazu EPO im Vergleich ungefähr 5,6 Std) um die Erythropoese zu stimulieren, kann aber über EPO-R die Neuroprotektion initiieren. In verschiedenen Schädigungsmodellen wie fokaler Ischämie, neonataler Ischämie oder Rückenmarksverletzungen konnte eine äquivalente neuroprotektive Wirkung zu EPO gezeigt werden. Die unerwünschten Nebenwirkungen der Hämatopoese können aber bei chronischer und repetitiver Anwendung von AsialoEPO nicht vollkommen ausgeschlossen werden [137, 138].

Unter der Annahme, dass die neuroprotektive Wirkung von EPO über einen anderen Rezeptor als den EPO-R vermittelt wird wie zum Beispiel β cR und der Überlegung, dass die Neuroprotektion über eine Region von EPO vermittelt wird, die nicht an EPO-R bindet, wurde versucht, durch molekulare Änderungen die erythropoetische Wirkung zu neutralisieren. Durch Carbamylierung von Lysin in Homocitrullin entstand CEPO mit veränderter Proteinkonformation und Funktion. Die Halbwertszeit liegt bei 3,3 Stunden, so dass CEPO theoretisch lange genug im Blut zirkuliert, um potentiell über einen alternativen Weg die Hämatopoese zu stimulieren. Im Rattenmodell konnten selbst nach 8-wöchiger täglicher Gabe von CEPO keine Auswirkungen auf den Hämatokrit und den Hämoglobingehalt nachgewiesen werden. In verschiedenen Schädigungsmodellen zeigt CEPO die gleiche neuroprotektive Wirkung wie EPO, im Modell der Rückenmarksverletzung konnte zusätzlich ein vorteilhafter Effekt auf die neurologische Funktion gezeigt werden [139].

4.10 EPO und die Blut-Hirn-Schranke

Werden Frühgeborene mit EPO zur Behandlung der Frühgeborenenanämie mit einer Dosierung von 200-400 IU/kg behandelt, so findet sich im Liquor der Neugeborenen kein Nachweis von EPO. Das wirft die Vermutung auf, dass EPO die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht überwinden kann, da sie normalerweise für Moleküle ab einer Größe von 30 kDa impermeabel ist. Untersucht man aber das Serum und den Liquor von asphyktischen Neugeborenen oder von Neugeborenen mit einer ventrikulären Blutung, stellt man einen höheren Anteil an EPO in Blut und Liquor fest [140]. Ist die BHS geschädigt, wie beispielsweise durch eine Subarachnoidalblutung oder generalisierte Entzündung, lässt sie folglich auch große Moleküle passieren. Aber auch bei systemischer Anwendung kann ein kleiner Teil ($< 2\%$) EPO die BHS als intaktes Molekül in gesunden Individuen und Patienten mit Schizophrenie überwinden [141]. Zur Klärung, wie EPO die BHS überwindet, gibt es verschiedene Theorien. Brines *et al.* stellten im Tiermodell fest, dass der EPO-R auf der Oberfläche von Endothelzellen im Bereich von Kaveolen-Vesikeln exprimiert wird. Diese können mit der luminalen und abluminalen Membran verschmelzen, wodurch das Konzept der Rezeptorvermittelten Transcytose unterstützt wird. Die Aufnahme von EPO über die BHS geschieht dabei in einer sehr langsamen Rate, ähnlich einem nicht sättigbaren Mechanismus [142]. Nach systemischer Gabe einer hohen Dosis EPO lässt sich ein EPO-Anstieg nach drei Stunden im Liquor nachweisen, welcher einer

Kinetik erster Ordnung entsprechen würde und von der Permeabilität der BHS abhängig bleibt. Diese Untersuchungen unterstützen eher das Konzept, dass der Transport transmembranös erfolgt oder einem nicht-rezeptorvermittelten Mechanismus unterliegt [143]. Die Passierbarkeit der BHS für EPO auch im gesunden Individuum eröffnet vielfältige mögliche Therapieformen. In der Neonatologie liegen die Bestrebungen der EPO-Anwendung zum Schutz des besonders anfälligen sich entwickelnden Gehirns vor einem schädigenden Ereignis, wie beispielsweise der Beatmung mit lebensnotwendigem Sauerstoff oder vor der Gabe lebensnotwendiger Medikamente.

4.11 Klinische Studien mit EPO

Sowohl in der Neonatologie als auch in der Erwachsenenmedizin gibt es bisher sehr wenige Studien zur EPO-Wirksamkeit in Hinblick einer möglichen Neuroprotektion. Eine erste wichtige klinische Studie zum Beweis der Neuroprotektivität im menschlichen Gehirn wurde von Ehrenreich *et al.* 2002 mit der Göttinger EPO-Schlaganfall-Studie vorgestellt. Hier erhielten erstmalig Patienten in einer Phase III Studie rhEPO, die einen Schlaganfall durch den Verschluss der Arteria cerebri media erlitten hatten. In der Doppelblind-Studie konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass Patienten, die EPO im Vergleich zu einem Plazebo erhalten hatten, schon kurze Zeit nach dem Insult unter weniger prominenten neurologischen Defiziten litten und die Wiedererlangung ihrer neurologischen Funktionen verbessert wurde [144].

Auch in einer kleinen Gruppe von Patienten, die an Schizophrenie leiden wurde 2003 EPO zusätzlich zur antipsychotischen Therapie getestet. Ziel war dabei die Verbesserung der kognitiven Leistungen und einem schleichenden degenerativen Prozess entgegen zu wirken. Die Studie stellte fest, dass EPO, wenn peripher verabreicht, die intakte Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und vermehrt im Gehirn von Patienten mit Schizophrenie angereichert wird. Zusätzlich wurde ein positiver Einfluss durch eine Verbesserung der kognitiven Leistungen nachgewiesen. *In vitro* konnte zusätzlich die Reduktion der Haloperidol-induzierte Apoptose nachgewiesen werden [145].

In der Neonatologie wird Erythropoietin in einigen Neonatalzentren zur Prävention der Frühgeborenenanämie eingesetzt. Durch eine frühzeitige und hochdosierte Gabe von Erythropoietin in Kombination mit Eisen ab dem achten Lebenstag in einer Dosierung von 3 mal 250 IE/kg KG die Woche kann der postpartale Hämatokritabfall aufgehalten und

somit der Transfusionsbedarf gesenkt werden [60].

Bisher gibt es aber nur sehr wenige Studien, die die Wirkung von Erythropoietin bei Frühgeborenen in Hinblick auf seine neuroprotektive Wirkung untersuchen. So können zusätzliche Erkenntnisse über eine mögliche Neuroprotektivität nur indirekt aus anderen Studien gezogen werden. Vergleicht man das neurologische Outcome von ELBW, die mit EPO zur Senkung des Transfusionsbedarf behandelt wurden, mit dem kleiner Patienten, die nur ein Plazebo erhalten haben, so zeigt sich keine signifikante Verbesserung in der neurologischen Entwicklung nach 18 bis 22 Monaten [146]. Die Ergebnisse mit der ausbleibenden neuroprotektiven Wirkung von EPO kommen nicht unerwartet, berücksichtigt man einige Eigenarten von EPO und EPO-R im Gehirn bezüglich Expression, endogener EPO-Produktion, Gabezeitpunkt und Dosierung, besonders im Hinblick auf die Transportfähigkeit über die Blut-Hirn-Schranke. Um eine signifikante neuroprotektive Wirkung zu erzielen, muss, wie in vielen experimentellen Studien gezeigt wurde, eine hohe Dosis von EPO in einem kurzen zeitlichen Intervall zum Beginn der neuronalen Schädigung verabreicht werden, um die verzögerte endogene EPO-Produktion vier Stunden nach dem hypoxischen Ereignis im Gehirn, im Vergleich zu zwei Stunden EPO-Maximum-Peak im übrigen Gewebe auszugleichen. Es ist dementsprechend davon auszugehen, dass es in der Studie von Ohls *et al.* zu keinem signifikanten Unterschied in der neurologischen Entwicklung kam, da beide Patientengruppen die gleiche geringe Anzahl an EPO im Gehirn aufwiesen [146]. In anderen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen EPO-Konzentration und geistiger Entwicklung hergestellt werden. Brierer *et al.* untersuchten bei ELBW die Konzentration von EPO im Serum nach Applikation von 3 mal wöchentlich 400 IE / kg KG. Dabei konnte festgestellt werden, dass die geistige Entwicklung, ermittelbar mit dem *Mental Developmental Index* der Neugeborenen mit einer EPO-Serumkonzentration über 500 U/ mL weiter voran geschritten war [147]. Man kann dementsprechend von einer Korrelation zwischen der Menge an EPO, die das zentrale Nervensystem erreicht und der verbesserten geistigen Entwicklung ausgehen. Im Liquor von Erwachsenen nach systemischer EPO-Applikation konnten Ehrenreich *et al.* aufzeigen, dass EPO die gesunde Hirnschranke passiert und bis zu einer Konzentration von 17,1 mU/ ml ansteigt. Dies entspricht einer 60-100 mal höheren Konzentration im Vergleich zum Normbereich [144]. Im Liquor des gesunden Neonaten entspricht diese Konzentration dem natürlichen Durchschnittsbereich (0,6-21 mU/ ml), wodurch die Nichtvergleichbarkeit und Übertragbarkeit von Verhältnissen im adulten Organismus auf den Neonaten unterstrichen wird.

Eine neuroprotektive Wirkung kann also gerade im Hinblick auf die speziellen Verhältnisse im unreifen Gehirn des Neonaten eher nach höheren Dosen von EPO (ab 5000 IE/kg KG), zeitlich im kurzen Abstand zur Schädigung, und durch eine kurze wiederholte Gabe erreicht werden [147].

Zur Evaluierung der Pharmakokinetik und Sicherheit einer Therapie mit hochdosiertem EPO in ELBWs, einem Patientenkollektiv, welches in seiner Entwicklung besonders von neurologischen Folgeschäden betroffen ist [3], stellten Juul *et al.* 2008 ihre Phase I/II Studie vor. In dieser wurden 30 Neonaten mit 30 Kontrollpatienten verglichen, die ab Lebenstag 1 dreimalig intravenös EPO in einer Dosierung von 500, 1000 oder 2500 IE/kg erhielten. Die Administration von 1000 IE/kg und 2500 IE/kg führte zu einer Serumkonzentration, die in Tiervergleichsmodellen eine Neuroprotektion vermittelte. Zusätzlich konnten weder eine erhöhte Mortalität, Morbidität noch unerwünschte Nebenwirkungen in der EPO-Gruppe festgestellt werden, womit die kurzfristige Sicherheit einer Therapie mit hochdosiertem EPO belegt werden konnte. Aussagen über die langfristigen möglichen Nebenwirkungen, sowie Daten über eine mögliche therapeutische Neuroprotektion stehen noch aus [148].

Eine erste randomisierte double-blind Studie mit hochdosierter Erythropoietin Gabe (3000 IE/kg) an Frühgeborene zur Erfassung des neurologischen Outcomes wurde 2008 erstmals von Fauchère *et al.* vorgestellt [149]. Einerseits sollte die Sicherheit der Therapie im Bezug auf eventuelle Nebenwirkungen, die aus der Erwachsenenmedizin bekannt sind, überprüft werden, andererseits sollte versucht werden, eine Aussage über das Profitieren von Frühgeborenen von einer Hochdosistherapie zur Vermeidung eventueller neurologischer Folgeschäden getroffen werden. Die bekannten Nebenwirkungen wie ein erhöhter Hämatokrit oder ein vermehrtes Auftreten von Retinopathien konnten nicht nachgewiesen werden, aber es fand sich eine nicht weiter aufgeklärte erhöhte Mortalitätsrate in dem Patientenkollektiv, das EPO erhalten hatte. In Bezug auf eine mögliche Neuroprotektion konnte als erste wichtige Erkenntnis festgestellt werden, dass es bezüglich des kurzfristigen neurologischen Outcomes zu keinen signifikanten Unterschieden in den beiden Gruppen kam. Eine Follow-Up Studie nach 24 Monaten und 5 Jahren soll im Verlauf Auskunft über das langfristige Outcome geben.

In der klinischen Erprobung der Neuroprotektion von EPO zeigt sich, dass erste vielversprechende Studien bisher leider keine Aussagen über die langfristigen Auswirkungen, bezüglich Morbidität oder eventueller Folgeschäden liefern können.

5 Zusammenfassung

Während die Mortalität von Kindern mit Frühgeburtlichkeit und extremer Unreife in den letzten Jahren Dank der verbesserten neonatalen Intensivmedizin gesunken ist, besteht weiterhin eine Vielfalt an langfristigen neurologischen Morbiditäten, die zu einer großen Belastung für die Betroffenen und deren Familien führt und ein nicht zu unterschätzendes sozioökonomisches Problem darstellen. In vielen Fällen lässt sich auch retrospektiv kein schädigendes Ereignis identifizieren, welches eine Erklärung für die neurologische Morbidität liefern könnte. Im Tiermodell konnte die Exposition gegenüber Hyperoxie in mehreren Arbeiten als Auslöser für eine vermehrte apoptotische Degeneration von Neuronen im sich entwickelnden Gehirn erkannt werden. Auch in der neonatalen Intensivmedizin ist die Behandlung der kleinen Patienten mit Sauerstoff ein integraler Bestandteil. Wie alle unreifen Organsysteme ist das Gehirn durch seine unausgereiften antioxidativen Enzymsysteme anfällig für oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffradikale. Da eine Behandlung mit Sauerstoff in den meisten Fällen nicht zu vermeiden ist, ist die Suche nach geeigneten neuroprotektiven Massnahmen von höchster Priorität. Erythropoietin, das als bekanntes Mittel in der Behandlung der Frühgeborenanämie zugelassen ist, gilt seit seiner Entdeckung von EPO und seinem Rezeptor im Gehirn und seinen neuroprotektiven Fähigkeiten als ein erfolgsversprechender Kandidat. Besonders für die Neonatologie, wo ein EPO-Einsatz auch prophylaktisch möglich sein könnte, gilt es, seine Wirkweise auf das noch unreife Gehirn zu erforschen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Exposition mit Hyperoxie im neonatalen Rattengehirn eine Vielfalt an Mechanismen beeinflusst, die in einer vermehrten Neurodegeneration münden: die apoptotische Kaskade über die Effektorcaspase-3 und die Initiatorcaspasen-2 und -8 als Teil der extrazellulär vermittelten apoptotischen Kaskade werden signifikant hochreguliert und die zellschützenden Neurotrophine wie BDNF, sowie die damit verbundenen nachstehenden Signalkaskaden über p-Akt und p-ERK1/2 werden signifikant herunterreguliert. Histologisch können die gewonnenen molekularbiologischen Erkenntnisse durch die DeOlmos Kupfer-Silber-Färbung verdeutlicht werden, indem es nach Hyperoxie Exposition zu einer Zunahme der degenerierten Zellen kommt.

Appliziert man vor der Exposition mit Sauerstoff Erythropoietin intraperitoneal in einer Dosierung von 20.000 IE /kg KG, so lässt sich signifikant sowohl histologisch als auch molekularbiologisch auf den verschiedenen Ebenen eine Verminderung des Ausmasses der Schädigung durch Hyperoxie nachweisen. Histologisch nimmt die Anzahl an degenerierten Zellen um 2/3 ab. Auf molekularbiologischer Ebene zeigt sich, dass der erniedrigte Gehalt von BDNF durch Hyperoxie beginnend nach 12 Stunden angehoben wird und fast ein Level wie unter normoxischen Bedingungen erreicht. Auch die Herunterregulation der darunterliegenden Kaskaden über p-Akt und p-ERK1/2 werden in Teilen wieder aufgehoben. Auf Seiten der pro-apoptotischen Kaskade führt die EPO-Gabe zu einer Verminderung der Hochregulation, sowohl Caspase-3 als auch die Initiatorcaspasen-2 und -8 werden in ihrem Ausmass reduziert. Besonders in den Aktivitätsassays der Caspasen zeigt sich eindrucksvoll, wie die Gabe von EPO das Aktivitätsniveau der Caspasen negativ beeinflussen kann und somit das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptischen Signalen zu Gunsten der Neuroprotektion verschiebt.

Erythropoietin scheint ein geeignetes Mittel zu sein, um der vermehrten Neurodegeneration durch Hyperoxie entgegen zu wirken.

Obwohl viele Studien einen positiven Effekt in Bezug auf die Neuroprotektion im neonatalen Gehirn aufzeigen konnten, gibt es auch kritische Stimmen, die einem Gebrauch von EPO in der Neonatologie skeptisch gegenüber stehen. Sowohl sein Einsatz in der Behandlung der Frühgeborenenanämie ist in einigen Perinatalzentren neu überdacht worden, als auch das Auftreten einer erhöhten Mortalität während der Behandlung als Neuroprotektivum in ersten klinischen Studien zeigt uns, dass wir aufgrund vieler offener Fragen im Bezug auf Wirkweise und Nebenwirkungen noch weit am Anfang der klinischen Anwendung stehen.

Die Antwort kann nur in einer intensiveren Auseinandersetzung und Erforschung der Mechanismen im unreifen Gehirn liegen, um einen eventuell schädigenden Nebeneffekt von exogen zugeführtem EPO auszuschließen.

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumsulfat
Akt	Proteinkinase B
APAF-1	Apoptose Protease- Aktivator Faktor 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
βcR	Beta-Untereinheit
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BDNF	brain- derived neurotrophic factor
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CARD	caspase- activating recruitment domain
CEPO	CarbamylePO
c-Flip	protease-deficient protein
CREB	cAMP response element binding protein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
ELBW	extrem low birth weight
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietin Rezeptor
ERK1/2	extrazelluläre Signalprotein Kinase
FADD	Fas-associated protein with Death Domain
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FHKRL1	forkhead transcription factor
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
HIF-1	Hypoxie-induzierbaren Faktor
IL-1β	Interleukin-1 beta converting Enzym

IL-18	Interferon- gamma- induzierender Faktor
JAK-2	Janus-Kinase-2-Signalweg
JNK	c-Jun-amino terminal kinase
MAPK	mitogen aktivierte Protein Kinase
MEK	MAP-Kinase/ERK-Kinase
MOMP	äußere Mitochondrienmembran
NaCl	Natriumchlorid
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGF	nerve growth factor
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4
PI(3)K	Phosphoinositide 3-Kinase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
p75 NTR	p75 Neutrophin Rezeptor
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	Rethinopathie des Frühgeborenen
ROS	reaktives Sauerstoff-Molekül
RT	Reverse Transkription
SSW	Scwangerschaftswoche
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
TBS-T	TBS-Tween 0,1 %
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Trk	Tropomyosin zugehörige Kinase Rezeptor

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges der Apoptose	8
1.2	Signalweg der Neurotrophine über den Trk Rezeptor	10
1.3	Schematische Darstellung der Signalwege von EPO	14
2.1	ausgezählte Hirnregionen in den rostralen und kaudalen koronaren Hirnschnitten	26
3.1	Neuroprotektion durch EPO nach Hyperoxie Exposition	38
3.2	Übersichtsaufnahme Cortex frontalis	39
3.3	Übersichtsaufnahme der Thalamuskern	39
3.4	Ausschnitt Cortex frontalis, Lamina II	40
3.5	Ausschnitt Thalamus lateralis	40
3.6	Genexpression von BDNF	42
3.7	Proteinexpression von BDNF	43
3.8	Übersichtsaufnahme Immunoblot von BDNF	43
3.9	Proteinexpression der inaktiven Form von ERK1/2	44
3.10	Übersichtsaufnahme Immunoblot von ERK1/2	45
3.11	Proteinexpression der inaktiven, unphosphorylierten Form von Akt	45
3.12	Übersichtsaufnahme Immunoblot von Akt	45
3.13	Übersichtsaufnahme Immunoblot von p-Akt	46
3.14	Proteinexpression der phosphorylierten aktiven Form von p-Akt	47
3.15	Übersichtsaufnahme Immunoblot von p-ERK1/2	47
3.16	Proteinexpression der phosphorylierten aktiven Form von p-ERK1/2	48
3.17	Proteinexpression - 8	49
3.18	Übersichtsaufnahme Immunoblot von Caspase-8	50
3.19	Proteinexpression der aktivierten Caspase-2	50
3.20	Übersichtsaufnahme Immunoblot von Caspase-2	50

3.21	Übersichtsaufnahme Immunoblot von Caspase-3	51
3.22	Proteinexpression der aktivierten Caspase-3	52
3.23	Caspase-2 Aktivitätsassay	53
3.24	Caspase-8 Aktivitätsassay	54

Tabellenverzeichnis

2.1	Chemikalien	18
2.2	Puffer und Lösungen	19
2.3	Kits	20
2.4	Enzyme und Oligonukleotide	20
2.5	Antikörper	21
2.6	Geräte und Arbeitsmaterialien	22
2.7	Versuchsaufbau für die histologischen Untersuchungen	23
2.8	Versuchsaufbau für die molekularbiologischen Untersuchungen	26
2.9	Ansatz DNase-Behandlung	27
2.10	Reaktionsansatz für die RT-PCR	29
2.11	Verlaufsprogramm der semiquantitativen PCR mit β -Aktin	30
2.12	TaqMan PCR-Ansatz zur Effizienzbestimmung der BDNF-mRNA- Expression	31
2.13	TaqMan PCR-Ansatz zur Effizienzbestimmung der 18S rRNA - Expression	32
2.14	Gelzusammensetzung für 4 Mini-Gele	34
2.15	Zur Immundetektion verwendete Antikörper mit Verdünnungen	35

Literaturverzeichnis

- [1] Marlow N, Wolke D, Bracewell MA et al. Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *N Engl J Med*, 352:9–19, 2005.
- [2] Wood NS, Marlow N, Costeloe K et al. Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. *N Engl J Med*, 343:378–384, 2000.
- [3] Mikkola K, Ritari N, Tommiska V et al. Neurodevelopmental outcome at 5 years of age of a national cohort of extremely low birth weight infants who were born in 1996-1997. *Pediatrics*, 116:1391–1400, 2005.
- [4] Hack M, Taylor HG, Klein N et al. School-age outcomes in children with birth weights under 750 g. *N Engl J Med*, 331:753–759, 1994.
- [5] Herrgard E, Karvonen M, Luoma L et al. Increased number of febrile seizures in children born very preterm: relation of neonatal, febril and epileptic seizures and neurological dysfunction to seizure outcome at 16 years of age. *Seizure*, 15:590–597, 2006.
- [6] Bhutta AT, Cleves MA, Casey PH et al. Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: a meta-analysis. *JAMA*, 288:728–737, 2002.
- [7] Delobel- Ayoub M, Kaminski M, Marret S et al. Behavioral outcome at 3 years of age in very preterm infants; the EPIPAGE study. *Pediatrics*, 117:1996–2005, 2006.
- [8] Murphy DJ, Sellers S, MacKenzie IZ et al. Case-control study of antenatal and intrapartum risk factors for cerebral palsy in very preterm singleton babies. *Lancet*, 346:1449–1454, 1995.

- [9] Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol*, 9:93–117, 1999.
- [10] Sizonenko SV, Camm EJ, Garbow JR et al. Developmental changes and injury induced disruption of the radial organization of the cortex in the immature rat brain revealed by in vivo diffusion tensor MRI. *Cereb Cortex*, 17:2609–2617, 2007.
- [11] Collins MP, Lorenz JM, Jetton JR et al. Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. *Pediatr Res*, 50:712–719, 2001.
- [12] Towfighi J, Mauger D, Vannucci RC et al. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res*, 100:149–160, 1997.
- [13] Ikonomidou C, Bosch, F, Miksa M et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70–74, 1990.
- [14] Bittigau P, Sifringer M, Genz K et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:15089–15094, 2002.
- [15] Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*, 23:876–882, 2003.
- [16] Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3:79–83, 1979.
- [17] Bayer SA, Altman J, Russo RJ et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 14:83–144, 1993.
- [18] Blomgren K, Leist M, Groc L. Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis*, 12:993–1010, 2007.
- [19] Bittigau P, Sifringer M, Pohl D et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol*, 45:724–735, 1999.

- [20] Mazarakis ND, Edwards AD, Mehmet H. Apoptosis in neural development and disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 77:F165–170, 1997.
- [21] Silverman WA. Retinopathy of prematurity: oxygen dogma challenged. *Arch Dis Child*, 57:731–733, 1982.
- [22] Saugstad OD. Chronic lung disease: oxygen dogma revisited. *Acta paediatr*, 90:113–115, 2001.
- [23] Sola A, Rogido MR, Deulofeut R. Oxygen as a neonatal health hazard: call for detent in clinical practice. *Acta Paediatr*, 83:801–812, 2007.
- [24] Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M et al. Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis*, 17:273–282, 2004.
- [25] Tagliatalata G, Perez-Polo JR, Rassin DK. Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*, 25:936–942, 1998.
- [26] Yis U, Kurul SH, Kumral A et al. Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain. *Brain Dev*, 30:556–562, 2008.
- [27] Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Polley O et al. Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. *Ann Neurol*, 57:50–59, 2005.
- [28] Hu X, Qiu J, Grafe MR et al. Bcl-2 family members make different contributions to cell death in hypoxia and/or hyperoxia in rat cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci*, 21:371–377, 2003.
- [29] Sirinyan M, Sennlaub F, Dorfman A et al. Hyperoxic exposure leads to nitrate stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject. *Stroke*, 37:2807–2815, 2006.
- [30] Krammer PH. Apoptose. *Dt Ärztebl*, 97:A1752–1759, 2000.
- [31] Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T et al. Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis*, 8:359–379, 2001.

- [32] Burek MJ, Oppenheim RW. Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol*, 6:427–446, 1996.
- [33] Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ et al. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:2508–2513, 1999.
- [34] Bittigau P, Pohl D, Sifringer M et al. Modeling pediatric head trauma: mechanisms of degeneration and potential strategies for neuroprotection. *Restor Neurol Neurosci*, 13:11–23, 1998.
- [35] Chipuk JE, Green DR. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:268–275, 2005.
- [36] Spierings D, McStay G, Saleh M et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science*, 310:66–67, 2005.
- [37] Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68:383–424, 1998.
- [38] Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326:1–16, 1997.
- [39] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281:1305–1308, 1998.
- [40] Chowdhury I, Tharakan B, Bhat G. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*, 11:506–525, 2006.
- [41] Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 384:201–232, 2004.
- [42] Yuan J, Yankner B. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407:802–809, 2000.
- [43] Kuida K, Zheng TS, Na S et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, 384:368–372, 1996.
- [44] Lavrik I, Krueger A, Schmitz I et al. The active Caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ*, 10:144–145, 2003.

- [45] Lavrik IN, Golks A, Baumann S et al. Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood*, 108:559–565, 2006.
- [46] Antonsson B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem*, 256:141–155, 2004.
- [47] Murphy AN, Fiskum G. Bcl-2 and Ca(2+)-mediated mitochondrial dysfunction in neural cell death. *Biochem Soc Symp*, 66:33–41, 1999.
- [48] Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 20:245–267, 1997.
- [49] Crowan WM. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci*, 24:551–600, 2001.
- [50] Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature*, 336:123–128, 1988.
- [51] Martin PD, Schmidt RE, DiStefano PS et al. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol*, 106:829–844, 1988.
- [52] Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron*, 33:9–12, 2002.
- [53] Sizonenko SV, Bednarek N, Gressens P. Growth factors and plasticity. *Semin Fetal Neonatal Med*, 12:241–249, 2007.
- [54] Philpott KL, McCarthy MJ, Klippel A et al. Activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase promote survival of superior cervical neurons. *J Cell Biol*, 139:809–815, 1997.
- [55] Datta SR, Dudek H, Tao X et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell intrinsic death machinery. *Cell*, 91:231–241, 1997.
- [56] Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 4:299–309, 2003.

- [57] Braun JS, Novak R, Herzog KH et al. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med*, 5:298–302, 1999.
- [58] Sola A, Wen TC, Hamrick SE et al. Potential for protection and repair following injury to the developing brain: a role for erythropoietin? *Pediatr Res*, 57:110R–117R, 2005.
- [59] Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*, 72:449–489, 1992.
- [60] Roth R. Rekombinantes Erythropoietin- Jetzt auch indiziert bei Neugeborenen. *Dt Ärztebl*, 93:11 A702, 1996.
- [61] Semenza GL, Rue AE, Iyer NV et al. Assignment of the hypoxia-inducible factor 1 α gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genomics*, 34:437–439, 1996.
- [62] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin Med*, 131:207–214, 1998.
- [63] Genc S, Koroglu T, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res*, 1000:19–31, 2004.
- [64] Siren AL, Fratelli M, Brines M et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:4044–4049, 2001.
- [65] Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:3717–3720, 1995.
- [66] Nagai A, Nakagawa E, Choi HB et al. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60:386–392, 2001.
- [67] Marti, HH, Wenger RH, Rivas LH et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*, 8:2538–2544, 1996.

- [68] Siren AL, Knerlich F, Poser W et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol*, 101:271–275, 2001.
- [69] Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM et al. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol*, 2:148–158, 1999.
- [70] Yu X, Lin CS, Constantini F et al. The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse. *Blood*, 98:475–477, 2001.
- [71] Dame C, Bartmann P, Wolber EM et al. Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*, 125:69–74, 2000.
- [72] Yu X, Shacka JJ, Eells JB et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*, 129:505–516, 2002.
- [73] Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T et al. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279:E1242–1248, 2000.
- [74] Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B et al. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 81:29–42, 2000.
- [75] Spandou E, Papouttosopoulou S, Soubasi V et al. Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in neonatal rat brain. *Brain Res*, 1021:167–172, 2004.
- [76] Bernaudin M, Marti HH, Roussel S et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19:643–651, 1999.
- [77] Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H et al. Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport*, 11:3485–3488, 2000.

- [78] Wen TC, Rogido M, Genetta T et al. Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett*, 355:165–168, 2004.
- [79] Brines M, Grasso G, Fiordaliso F et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:14907–14912, 2004.
- [80] Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 6:484–494, 2005.
- [81] Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*, 412:483–492, 2001.
- [82] Viviani B, Bartsaghi S, Corsini E et al. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem*, 93:412–421, 2005.
- [83] Morishita E, Masuda S, Nagao M et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*, 76:105–16, 1997.
- [84] Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:4635–4640, 1998.
- [85] Wang L, Zhang Z, Wang Y et al. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 35:1732–1737, 2004.
- [86] Celik M, Gökmen N, Erbayraktar S et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:2258–2263, 2002.
- [87] Grasso G, Buemi M, Alafaci C et al. Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:5627–5631, 2002.

- [88] Springborg JB, Ma X, Rochat P et al. A single subcutaneous bolus of erythropoietin normalizes cerebral blood flow autoregulation after subarachnoid haemorrhage in rats. *Br J Pharmacol*, 135:823–829, 2002.
- [89] Spandou E, Papadopoulou Z, Soubasi V et al. Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res*, 1045:22–30, 2005.
- [90] Sola A, Rogido M, Lee BH et al. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res*, 57:481–487, 2005.
- [91] Chang YS, Mu D, Wendland M et al. Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatr Res*, 58:106–111, 2005.
- [92] Villa P, Bigini P, Mennini T et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*, 1989:971–975, 2003.
- [93] Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc Res*, 63:208–216, 2004.
- [94] DeOlmos JS, Ingram WR. An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminaldegeneration. *Brain Res*, 33:523–529, 1971.
- [95] Ishimaru M, Ikonomidou C, Tenkova TI et al. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol*, 408:461–476, 1999.
- [96] West MJ, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*, 296:1–22, 1990.
- [97] Dzierko M, Felderhoff-Mueser U, Sifringer M et al. Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis*, 15:177–187, 2004.

- [98] Lu LX, Yon JH, Carter LB et al. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis*, 11:1603–1615, 2006.
- [99] Buckley S, Driscoll B, Barsky L et al. ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *AM J Physiol*, 277:L159–166, 1999.
- [100] Okoye G, Zimmer J, Sung J et al. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. *J Neurosci*, 23:4164–4172, 2003.
- [101] Gerstner B, Bühner C, Rheinländer C et al. Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia. *J Neurosci Res*, 84:306–315, 2006.
- [102] Hoehn T, Felderhoff-Mueser U, Maschewski K et al. Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain. *Pediatr Res*, 54:179–185, 2003.
- [103] Deulofeut R, Critz A, Adams-Chapman I et al. Avoiding hyperoxia in infants < or = 1250g is associated with improved short- and long-term outcomes. *J Perinatol*, 26:700–705, 2006.
- [104] Han BH, D’Costa A, Back SA et al. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis*, 7:38–53, 2000.
- [105] Zhang F, Signore AP, Zhou Z et al. Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms. *J Neurosci Res*, 83:1241–1251, 2006.
- [106] Kim DH, Zhao X. BDNF protects neurons following injury by modulation of caspase activity. *Neurocrit Care*, 3:71–76, 2005.
- [107] Weber A, Maier RF, Hoffmann U et al. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res*, 958:305–311, 2002.
- [108] Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96:857–868, 1999.

- [109] Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol*, 138:1107–1118, 2003.
- [110] Shang Y, Wu Y, Wang X et al. Protective effect of erythropoietin against ketamine-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons: involvement of PI3K/Akt and GSK-3 beta pathway. *Apoptosis*, 12:2187–2195, 2007.
- [111] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282:1318–1321, 1998.
- [112] Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK et al. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrom c from mitochondria. *Mol Cell Biol*, 19:5800–5810, 1999.
- [113] Zhou H, Li XM, Meinkoth J et al. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol*, 151:483–494, 2000.
- [114] Mori M, Uchida M, Watanabe T et al. Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol*, 195:290–297, 2003.
- [115] Kilic E, Kilic U, Soliz J et al. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J*, 19:2026–2028, 2005.
- [116] Wu Y, Shang Y, Sun S et al. Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis*, 12:1365–1375, 2007.
- [117] Hanlon PR, Fu P, Wright GL et al. Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *FASEB J*, 19:1323–1325, 2005.
- [118] Sawe N, Steinberg G, Zhao H. Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res*, 86:1659–1669, 2008.

- [119] Lee SM, Nguyen TH, Park MH et al. EPO receptor-mediated ERK kinase in NF-kappaB activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 320:1087–1095, 2004.
- [120] Han BH, Holtzmann DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci*, 20:5775–5781, 2000.
- [121] Wang ZQ, Wu DC, Huang FP et al. Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 996:55–66, 2004.
- [122] Okutan O, Solaroglu I, Beskonakli et al. Recombinant human erythropoietin decreases myeloperoxidase and caspase-3 activity and improves early functional results after spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci*, 14:364–368, 2007.
- [123] Chong ZZ, Lin SH, Kang JQ et al. Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of AKT1 and induction of caspase 1,3 and 8. *J Neurosci Res*, 71:659–669, 2003.
- [124] Dzierko M, Boos V, Sifringer M et al. A critical role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia-induced brain injury. *Ann Neurol*, 64:664–73, 2008.
- [125] Zhang Y, Thamer M, Stefanik K et al. Epoetin requirements predict mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 44:866–876, 2004.
- [126] Coleman T, Brines M. Science review: recombinant human erythropoietin in critical illness: a role beyond anemia? *Crit Care*, 8:337–341, 2004.
- [127] Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci*, 26:1269–1274, 2006.
- [128] Spandou E, Papoutsopoulou S, Soubasi V et al. Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res*, 1021:167–172, 2004.
- [129] Prass K, Scharff A, Ruscher K et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke*, 34:1981–1986, 2003.

- [130] Liu J, Narasimhan P, Yu F et al. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. *Stroke*, 36:1264–1269, 2005.
- [131] Weber A, Dzietko M, Berns M et al. Neuronal damage after moderate hypoxia and erythropoietin. *Neurobiol Dis*, 20:594–600, 2005.
- [132] Bühner C, Felderhoff-Mueser U, Wellmann S. Erythropoietin and ischemic conditioning-why two good things may be bad. *Acta Paediatr*, 96:787–789, 2007.
- [133] Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D et al. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21:857–864, 2001.
- [134] Wolf RF, Peng J, Friese P et al. Erythropoietin administration increases production and reactivity of platelets in dogs. *Thromb Haemost.*, 78:1505–1509, 1997.
- [135] McPherson RJ, Juul SE. Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *Int J Dev Neurosci*, 26:103–111, 2008.
- [136] McPherson RJ, Demers EJ, Juul SE. Safety of high-dose recombinant erythropoietin in a neonatal rat model. *Neonatology*, 91:36–43, 2007.
- [137] Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie Q, Coleman T, Kreilgaard M, Brines M et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:6741–6746, 2003.
- [138] Wang X, Zhu C, Wang X et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem*, 91:900–910, 2004.
- [139] Leist M, Ghezzi P, Grasso G et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*, 305:239–242, 2004.
- [140] Juul SE, Stallings SA, Christensen RD. Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury. *Pediatr Res*, 46:36–42, 1999.
- [141] Ehrenreich H, Degner D, Meller J et al. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 9:42–54, 2004.

- [142] Brines ML, Ghezi P, Keenan S et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 19:10526–10531, 2000.
- [143] Xenocostas A, Cheung WK, Farrell F et al. The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. *Eur J Clin Pharmacol*, 61:189–195, 2005.
- [144] Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*, 8:495–505, 2002.
- [145] Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Maier W et al. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry*, 12:206–220, 2007.
- [146] Ohls RK, Ehrenkranz RA, Das A et al. Neurodevelopmental outcome and growth at 18 to 22 months corrected age in extremely low birth weight infants treated with early erythropoietin and iron. *Pediatrics*, 114:1287–1291, 2004.
- [147] Dame C, Fahnenstich H. Don't give up on erythropoietin as a neuroprotective agent. *Pediatrics*, 116:521–522, 2005.
- [148] Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA et al. A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics*, 122:383–391, 2008.
- [149] Fauchère JC, Dame C, Vonthein R et al. An approach of using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *Pediatrics*, 122:375–382, 2008.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Rebekka Löber, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die protektive Wirkung von Erythropoietin in einem Neurodegenerationsmodell der neonatalen Ratte nach Hyperoxie Exposition“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

28.02.2011

Rebekka Löber