

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Neurologie und
dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Perinatale Hirnschäden und Neuroprotektion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea Johanna Maria Koppelstätter
aus Innsbruck/Österreich

Datum der Promotion: 14. September 2018

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung der Publikationspromotion

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung und Zielstellung | 1 |
| 1.1 Entwicklung des Gehirns | 1 |
| 1.2 Ursachen perinataler Hirnschäden | 2 |
| 1.3 Neuroprotektive Strategien | 3 |
| 1.4 Zielstellung | 4 |
| 2. Methodik | 5 |
| 2.1 Modelle perinataler Hirnschädigung | 5 |
| 2.2 Tierversuche | 5 |
| 2.3 Histologische Untersuchung und Quantifizierung von Zelltod in unterschiedlichen Hirnregionen | 6 |
| 2.4 Untersuchung der Proteincarbonylierung | 7 |
| 2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese | 7 |
| 2.6 Proteinidentifizierung | 8 |
| 2.7 Semiquantitative Real-time-PCR | 9 |
| 2.8 Messung der Caspase-2- und Caspase-8-Enzymaktivität | 9 |
| 2.9 Western Blots | 9 |
| 2.10 Fragebogen zum Gebrauch von Levetiracetam | 10 |
| 3. Ergebnisse | 11 |
| 3.1 Untersuchung zum protektiven Effekt von Erythropoietin auf das sich entwickelnde Gehirn im Hyperoxieversuch und die Veränderungen am Proteom | 11 |
| 3.2 Die Auswirkungen veränderter Neurotransmission am NMDA- und GABA _A -Rezeptor auf das Proteom des sich entwickelnden Neokortex | 13 |
| 3.3 Die Behandlung von Neugeborenen mit Levetiracetam | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Diskussion | 17 |
| 5. Literaturverzeichnis | 20 |
| Eidesstattliche Erklärung | 28 |
| Anteilserklärung an den ausgewählten Publikationen | 29 |
| Druckexemplare der ausgewählten Publikationen | 31 |
| Lebenslauf | 64 |
| Publikationsliste | 66 |
| Danksagung | 67 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| 2-DE | Zweidimensionale Gelelektrophorese |
| BDNF | Brain-derived-neurotrophic-Faktor |
| Crmp | Collapsin-response-mediator-Proteinfamilie |
| ERK 1/2 | Extracellular-signal-regulated-kinase 1/2-Protein |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| G-CSF | Granulozyten kolonie-stimulierender Faktor |
| GABA _A | γ-Amino-Buttersäure |
| Glo1 | Glyoxalase 1 |
| I.E. | internationale Einheiten |
| i.p. | intraperitoneal |
| IEF | isoelektrische Fokussierung |
| KG | Körpergewicht |
| kg | Kilogramm |
| LEV | Levetiracetam |
| MALDI | Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation |
| MK801 | Dizocilpin |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| NaCl | Natriumchlorid |
| nHPLC | nano Hochleistungschromatographie |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| pAkt | Proteinkinasen B |
| PB | Phenobarbital |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PEA15 | Phosphoprotein-enriched-in-Astrocytes-Protein |
| pO ₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| rEPO | rekombinantes Erythropoietin |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TOF | time of flight |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

Zusammenfassung

Perinatale Hirnschäden tragen wesentlich zu frühkindlicher Mortalität und Morbidität bei. In der Vergangenheit konnten unterschiedlichste Noxen und Auslöser perinataler Hirnschäden wie Alterationen des Sauerstoffpartialdrucks, Medikamente, Drogen, Traumata und andere identifiziert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Tiermodell mittels molekularbiologischer und biochemischer Methoden verschiedene Schädigungsmechanismen und das Neuroprotektivum rekombinantes Erythropoietin (rEPO) im unreifen Gehirn auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Zudem sollte in einer Umfrage an deutschen Universitätskliniken eine Übersicht zum Gebrauch des modernen Antikonvulsivums Levetiracetam, welches im Tiermodell eine geringere Neurotoxizität als etablierte Antikonvulsiva aufweist, erstellt werden.

Wir fanden, dass eine Behandlung mit rEPO sauerstoff-induzierte Apoptose in Nagetier-Gehirnen deutlich senken kann. Zudem wurden die hyperoxie-induzierten Proteomveränderungen durch rEPO inhibiert. Dabei spielten Mechanismen wie Reduktion des oxidativen Stresses, die Normalisierung einer gesteigerten Caspaseaktivität und die Erniedrigung bestimmter Neurotrophine im Gehirn eine Rolle.

Weiterhin konnten wir sowohl akute als auch langfristige Effekte auf das Proteom des Gehirns durch die perinatale Gabe von Dizocilpin (NMDA-Rezeptor-Antagonist) und Phenobarbital (GABA_A-Rezeptor-Agonist) nachweisen. Unsere Ergebnisse zeigen Veränderungen in verschiedenen Signalwegen auf, welche durch verminderte neuronale Erregbarkeit moduliert werden. Hierdurch können wiederum wichtige Schritte der neuronalen Entwicklung beeinflusst werden, was die besondere Bedeutung der Signaltransduktion über NMDA- und GABA_A-Rezeptoren hervorhebt.

Da aus diesem Grund der Gebrauch von Medikamenten wie Phenobarbital mittlerweile kritisch gesehen wird, untersuchten wir im Rahmen einer fragebogen-gestützten Umfrage den klinischen „off label“ Einsatz des neuen Antikonvulsivums Levetiracetam bei Frühgeborenen und Reifgeborenen. Es zeigte sich, dass Levetiracetam bereits in vielen neonatologischen Abteilungen in Deutschland angewandt wird. Damit wird klar, dass dringend eine systematische Erfassung von Wirksamkeit und Nebenwirkungen dieses Medikaments erforderlich ist.

Abstract

Perinatal brain damage is a main factor for mortality and long-term morbidity in infants. Several mechanisms have been identified which can lead to perinatal brain injury, such as alterations of oxygen pressure, pharmaceuticals, drugs of abuse, and trauma. The aim of our study was to identify the pathways and mechanisms leading to brain damage on a molecular and biochemical basis and to analyze the effect of the neuroprotective drug recombinant erythropoietin (rEPO). A further aim was to describe the use of the newer and potentially less harmful antiepileptic drug levetiracetam, which shows little neurotoxicity in experimental animal models and has a good safety record in adults and children.

We found that the treatment with rEPO in rodents showed a reduction in hyperoxia induced apoptosis and led to an inhibition of the induced proteome changes. These changes were accompanied by reduction in oxidative stress levels, normalization of raised caspase activity, and reduction of neurotrophins in the brain.

In a next step, we investigated acute and long term effects of the administration of dizocilpin (NMDA receptor antagonist) and phenobarbital (GABA_A receptor agonist) on the developing brain proteome. Our results highlight various signaling pathways leading to decreased neuronal excitability, particularly when neuronal transduction was altered via NMDA and GABA_A receptors.

Since the use of such potentially harmful anticonvulsive drugs is seen critically, we studied the off label use of levetiracetam in term and preterm infants among neonatologists and pediatric neurologists in German university hospitals. Our results revealed a widespread use of this drug and thus call for randomized and controlled trials investigating efficacy and safety in these cohorts.

1. Einleitung und Zielstellung

1.1 Entwicklung des Gehirns

Die normale Funktion des reifen zentralen Nervensystems erfordert während dessen Entstehung ein zeitgerechtes Zusammenspiel verschiedener intra- und interzellulärer Vorgänge. Wichtige Teilschritte der Entwicklung beispielsweise von Neuronen sind Zellproliferation (von Vorläuferzellen), Zellmigration, Zelldifferenzierung und die Bildung interzellulärer Verbindungen im Sinne neuronaler Netzwerke und Modifizierung (1). Während der Migrationsvorgänge wandern sich differenzierende Neurone vom Ort ihrer Entstehung entlang einem Netzwerk von Gliazellen (radiäre Gliazellen) zu ihrem späteren Funktionsort. Zu den Differenzierungsprozessen von Nervenzellen gehören neben der Aussprossung von Fortsätzen auch Prozesse der Synaptogenese, also der Bildung von interzellulären Kontaktstellen und damit von Schaltkreisen. Dabei werden zunächst vorläufige Verbindungen zwischen einzelnen Zellen oder Zellverbänden geknüpft und diese erst nach einer erneuten Modifikation durch Apoptose bestimmter Zellen und einer ausgedehnten Reorganisation der Synapsen stabilisiert. Die Eliminierung überschüssiger Synapsen ist schließlich ein wichtiger Schritt hin zu spezifischen, funktionellen neuronalen Netzwerken. Apoptotische Neurodegeneration spielt also während der physiologischen Entwicklung des Gehirns eine wichtige Rolle (2). Sie dient der Anpassung der Neuronenzahl und repräsentiert den natürlichen Prozess der Auslese redundanter Neurone (3). Während der Neurogenese werden etwa doppelt so viele Neuronen gebildet, wie im erwachsenen Organismus überleben (4).

Die Prozesse laufen dabei in den verschiedenen Abschnitten des zentralen Nervensystems zu unterschiedlichen Zeiten ab. Zudem ist die Geschwindigkeit, mit welcher sich diese Vorgänge ereignen, nicht in allen Teilen des Nervensystems konstant. Die von Dobbing und Sands als „brain growth spurt“ bezeichnete Phase beschreibt einen bestimmten Zeitraum der Entwicklung des Gehirns, der durch besonders rasches Wachstum gekennzeichnet ist (5, 6) und in welcher vor allem Vorgänge wie Synaptogenese sowie Migrations- und Selektionsprozesse stattfinden.

1.2 Ursachen perinataler Hirnschäden

Hinsichtlich der zugrundeliegenden Schädigungsmechanismen konnten in der Vergangenheit verschiedene Auslöser perinataler Hirnschädigungen identifiziert werden, wie z. B. die Beeinflussung von Neurotransmittersystemen, Traumata und Alterationen des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) (7, 8, 9, 10, 11, 12).

Es kann sowohl eine Hypoxie als auch eine Hyperoxie das unreife Gehirn schädigen (13, 14, 15, 16). Während Hyperoxie gerade das Gehirn Frühgeborener gefährdet, sind perinatale Hirnschäden Reifgeborener oftmals durch Hypoxie-Ischämie verursacht. Unter physiologischen Bedingungen erfährt das Ungeborene intrauterin eine konstante Perfusion und damit eine gleichmäßige Versorgung mit Sauerstoff. Dabei ist der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) im Mutterleib mit circa 25 mmHg viel niedriger als postnatal in ‚physiologischer‘ Raumluft. Um den Sauerstoff aus dem mütterlichen Blut aufzunehmen, wird während der Fetalperiode fetales Hämoglobin gebildet, welches eine viel höhere Sauerstoffaffinität als adultes Hämoglobin aufweist. Dadurch wird eine ausreichende Versorgung des Fötus mit Sauerstoff ermöglicht. Beim Frühgeborenen findet postnatal diese konstante Versorgung über die Mutter nicht mehr statt. Eine vorzeitige Geburt bedeutet folglich für das Frühgeborene eine vorzeitige Konfrontation mit einer relativ zu hohen Sauerstoffkonzentration. Erschwert wird dieser Umstand durch eine Unreife der Lunge und des Hirnstamms (17) sowie durch nicht vollständig ausgebildete Abwehrmechanismen gegenüber Sauerstoffradikalen (18). Zusätzlich können perinatale Infektionen das Frühgeborene mit noch mehr Radikalen belasten (19). Auch wenn der Einsatz von Sauerstoff als therapeutisches Mittel zurückhaltender erfolgen sollte (20, 21), so ist eine Behandlung mit Sauerstoff allerdings oft bei vielen Frühgeborenen unumgänglich. Auf der anderen Seite kann es durch eine perinatale Asphyxie zu einer hypoxisch-ischämischen Minderversorgung kommen, die zu Organschäden und im Speziellen zu Gehirnschädigungen führen kann. Mögliche neurologische Erkrankungen wie eine infantile Zerebralparese, motorische und mentale Retardierung, Epilepsie und Sehschwäche können als Folge entstehen (22, 23). Insgesamt tritt die perinatale Asphyxie bei 2-3 von 1000 Lebendgeborenen auf (24). Bei Reifgeborenen führt sie typischerweise zu Läsionen im Bereich der Basalganglien und des Thalamus (25). Im Unterschied dazu kommt es bei Frühgeborenen häufig zur

sogenannten periventrikulären Leukomalazie, bei sehr unreifen Frühgeborenen vor allem zu intra- bzw. periventrikulären Hirnblutungen.

Weiterhin kann eine veränderte synaptische Aktivität unter anderem an γ -Aminobuttersäure (GABA_A)-Rezeptoren (Barbiturate, Benzodiazepine, Anästhetika), an N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (Ketamin, NO) sowie an Natrium-Kanälen (Phenytoin, Valproat) zu einem ausgedehnten Verlust vieler Neurone durch programmierten Zelltod (Apoptose) führen, wie in verschiedenen Studien an Nagetieren gezeigt werden konnte (8, 9). Viele dieser apoptose-auslösenden Wirkstoffe werden sowohl in der Pädiatrie als auch in der geburtshilflichen Medizin im Rahmen von Sedierung, Narkose und zur Behandlung von Krampfanfällen eingesetzt. Die genannten neurotoxischen Effekte haben im Nagetiermodell vor allem während der Phase des schnellen Hirnwachstums deletäre Folgen.

1.3 Neuroprotektive Strategien

Der Neuroprotektion des unreifen Gehirns kommt in der modernen Medizin eine besondere Bedeutung zu, da perinatale Hirnschäden eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität Neugeborener darstellen (26). Neuroprotektive Maßnahmen, die bereits klinische Anwendung finden bzw. in der Vergangenheit verfolgt wurden, umfassen u.a. eine permissive Hypothermie (27 , 28) oder die Gabe von Substanzen wie Granulozyten-kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) (29, 30) oder Erythropoietin (EPO) (31 , 32 , 33 , 34 , 35). Dabei rückt die nicht-hämatopoetische Wirkung von rekombinantem Erythropoietin (rEPO) seit einigen Jahren zunehmend in den Vordergrund. Neben einer Reihe von Arbeiten (36, 37, 38), die einen neuroprotektiven Effekt von hochdosiertem rEPO zeigten, konnte in einer neueren Untersuchung von Dame et al gezeigt werden, dass die molekularen Mechanismen der Wirkung von EPO abhängig von unterschiedlich regulierten EPO-Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren sind (39). Das für Frühgeborene zugelassene rEPO hat in der Therapie und Prävention der Frühgeborenenanämie (36) in den letzten Jahren an Bedeutung verloren. Der Einsatz wird aufgrund mangelnder Effektivität bei der Vermeidung von Bluttransfusionen und bezüglich der Nebenwirkungen (z.B. Retinopathie, nekrotisierende Enterokolitis, intraventrikuläre Hämorrhagie) kritisch hinterfragt (40). Des Weiteren wurden in experimentellen Studien vielversprechende Ansätze wie die

Reduktion des oxidativen Stresslevels durch Antioxidantien oder Chelatbildner wie Deferoxamin untersucht (41, 42, 43, 44).

Neuroprotektive Strategien umfassen außerdem Maßnahmen wie die Vermeidung der Gabe neurotoxischer Medikamente, da z. B. für die Therapie von Schwangeren als auch von Neugeborenen und Kleinkindern mit Antikonvulsiva bleibende Schäden des sich entwickelnden Gehirns gezeigt werden konnten (45, 46, 47, 48, 49, 50). Hohe Spiegel im mütterlichen Blut und die Kombinationen aus mehreren Antiepileptika gehen mit einem erhöhten Risiko einer Schädigung auf das menschliche Kind einher (51).

1.4 Zielstellung

Ziel der vorgestellten Arbeiten war es, die der neuroprotektiven Wirkung von rEPO zugrundeliegenden Signalwege im Hyperoxie-Modell des Nagetiers zu beschreiben, da ein neuroprotektiver Effekt von rEPO bereits mehrfach nachgewiesen wurde. Weiterhin untersuchten wir den Einfluss von Dizocilpin (NMDA-Rezeptor Antagonist) und von Phenobarbital (GABA_A-Rezeptor Agonist) auf das Proteom des sich entwickelnden Gehirns, da für diese Wirkstoffe potentiell schädliche Auswirkungen bereits nachgewiesen wurden. Da aus diesem Grund der Gebrauch von Medikamenten wie Phenobarbital mittlerweile kritisch gesehen wird, untersuchten wir außerdem im Rahmen einer Umfrage den klinischen Einsatz des neuen Antikonvulsivums Levetiracetam (LEV) in der Neonatologie an deutschen Universitätskliniken und erfassten dabei Verträglichkeitseinschätzungen der befragten Ärzte. Vorausgehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass dieses Antiepileptikum keine vermehrte Apoptose im sich entwickelnden Nagetiergehirn auslöst (52).

2. Methodik

2.1 Modelle perinataler Hirnschädigung

In der modernen Neurowissenschaft existieren verschiedene klinische und experimentelle Modelle mit deren Hilfe die Pathomechanismen untersucht werden können, die das sich entwickelnde Gehirn betreffen. Vor allem experimentelle Studien an Säugetieren haben dabei zu einem tiefen Verständnis der Entwicklung des Gehirns bzw. verschiedenen störenden Einflüssen geführt. Voraussetzung für die Übertragbarkeit von experimentell gewonnen Erkenntnissen auf den Menschen ist dabei die Vergleichbarkeit der Entwicklungsgeschwindigkeit von Menschen und anderen Säugetieren. Das Entwicklungsalter des Gehirns von Mensch und Nagetier lässt sich hierbei durch das Vorhandensein bestimmter Marker-Regionen vergleichen, auch dann, wenn das exakte Lebensalter nicht das gleiche ist. Bei Mäusen und Ratten ereignet sich die Phase des „rapid growth spurt“ in den ersten zwei bis drei Lebenswochen (53), d.h. ausschließlich postnatal. Im Gegensatz dazu beginnt der vergleichbare Zeitraum beim Menschen schon pränatal im sechsten Schwangerschaftsmonat, erreicht seinen Höhepunkt rund um die Geburt und endet im dritten Lebensjahr (6).

2.2 Tierversuche

Im Rahmen der Untersuchungen zum Effekt von rEPO auf die Hyperoxie induzierte Hirnschädigung wurden *C57BL/6*-Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und Wistar Ratten (Charité) eingesetzt. Sechs Tage alte Jungtiere wurden randomisiert den verschiedenen Versuchsgruppen zugeordnet. Die Tiere wurden zusammen mit einem Muttertier für unterschiedliche Zeitspannen (2, 6, 12, 24, 48 Stunden (h)) einer Hyperoxie mit 80% Sauerstoff ausgesetzt. Kontrolltiere wurden bei Normoxie gehalten. Unmittelbar vor der Hyperoxie erhielten die Versuchstiere randomisiert 20.000 internationale Einheiten (I.E.) rEPO (Recormon®) je kg Körpergewicht (KG) oder physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) intraperitoneal (i.p.).

Für die Untersuchung des antiapoptotischen Effekts von rEPO mittels DeOlmos Silberfärbung wurde eine fünfte Gruppe mit Hyperoxie über 24 h und einer Injektion von

10.000 IE/kg KG rEPO i.p. behandelt. Nach Tötung und Dekapitation der Tiere wurden die Gehirne entnommen, das Kleinhirn verworfen, die Hemisphären sagittal geteilt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für eine optimale Vergleichbarkeit wurden die Proteinextrakte der Mäuse von jedem nach Alter und Geschlecht gepaartem Probenpaar gemeinsam mittels der zweidimensionalen Elektrophorese (2-DE) untersucht.

Für die Untersuchungen zu NMDA- oder GABA_A-Rezeptor-vermittelter Neurotransmission auf den sich entwickelnden Neokortex wurden C57BL/6-Mäuse (Charles River) mit Phenobarbital (Desitin, Hamburg, Deutschland) 30 mg/kg KG i.p. und CD1-Mäuse (Charles River) mit Dizocilpin (MK801; Tocris, Bristol, England) 0,5 mg/kg KG i.p. oder physiologischer Kochsalzlösung am postnatalen Tag 6 (P6) behandelt. Die Veränderungen des Proteoms der behandelten Mäuse wurden dabei nach einem Tag (P7), nach einer Woche (P14) und nach vier Wochen (P35) untersucht. Um zu untersuchen, inwieweit die durch Phenobarbital und Dizocilpin induzierten Hirnproteinveränderungen spezifisch für junge Nagetiere sind, wurden acht Wochen alte Mäuse ebenfalls einer Behandlung mit diesen Wirkstoffen oder NaCl behandelt und anschließend das Proteom dieser Tiere untersucht. Die Gehirne wurden nach Dekapitation der Tiere entnommen und der frontale, parietale, zinguläre und retrospleniale Kortex der linken Hemisphäre des Gehirns isoliert. Nach Extraktion des Gesamtproteins (54) erfolgte ein Vergleich von alters- und geschlechtsgepaarten Proben. Die Konzentrationen des Gesamtproteins wurden mithilfe des Bio-Rad Detergent Compatible Protein Assay nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt.

2.3 Histologische Untersuchung und Quantifizierung von Zelltod in unterschiedlichen Hirnregionen

Die Untersuchung der Anzahl an degenerierten Zellen erfolgte mittels DeOlmos Silberfärbung von Gehirn-Paraffinschnitten der Versuchstiere (55). Apoptotische Zellen zeigten dabei eine ausgeprägte dunkle Erscheinung durch die Silberimprägnierung. Der Grad der Apoptose der verschiedenen Hirnregionen wurde mittels stereologischer Dissektion („stereological dissector“) bestimmt (56). Gemessen wurde die durchschnittliche numerische Dichte degenerierter Zellen (Zellen/mm³).

2.4 Untersuchung der Proteincarbonylierung

Um das Ausmaß der Carbonylgruppen als Marker für oxidativen Stress zu untersuchen, erfolgte eine Proteinextraktion des Gesamthirnllysats der behandelten Tiere. Proteinproben wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit* (Chemicon) entsprechend der Anweisungen des Herstellers untersucht.

2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Proteinextrakte wurden auf 2-DE-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (57). Dabei wurden die Proteine zunächst in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (isoelektrische Fokussierung, IEF) und anschließend nach ihrem Molekulargewicht mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Kombination der beiden orthogonal zueinander ausgeführten Trenntechniken resultiert in einer besonders hohen Auflösung. In den dadurch entstandenen Gelen (40 cm (IEF) x, 30 cm (SDS-PAGE) x, 0,75 mm Dicke) wurden die Proteine durch eine hochsensitive Silberfärbung visualisiert (58).

Die Bewertung der Gele erfolgte zunächst durch erfahrene Untersucher an einem Leuchtkasten (Biotec-Fischer, Reiskirchen, Deutschland). Die Proteine waren in den gefärbten Gelen als sogenannte Spots („Flecken“) erkennbar. In einem 2-DE-Gel kann ein Protein durch einen Spot dargestellt sein oder durch ein Muster multipler Spots (Isospots), verursacht durch eine ko- und/oder posttranslationale Modifikation des ursprünglichen Proteins. Die Spots wurden hinsichtlich ihrer An- oder Abwesenheit, auf quantitative Abweichungen sowie auf ein verändertes Bewegungsmuster innerhalb des Gels untersucht. Ein verändertes Bewegungsmuster, auch Driftbeweglichkeit genannt, bedeutet, dass das Protein an eine andere Position im Gel wandert. Hervorgerufen wird dies durch eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes und/oder durch Veränderungen des Molekulargewichts. Eine dadurch geänderte Spotintensität entspricht einer Abnahme der relativen Konzentration eines unmodifizierten Proteins.

Nach der visuellen Analyse der Gele erfolgte eine exakte Bestimmung der Spotintensitäten mittels der *ProteomweaverTM imaging software* Version 4.0.0.5 (Definiens, München, Deutschland), welche eine automatisierte Messung der relativen

Intensitäten erlaubt. Von den fertig entwickelten 2-DE-Gelen wurden hierzu digitale Bilder erzeugt. Dies geschah durch Scannen der Gele mit einem Densitometer. Anschließend erfolgte eine automatische Spot Detektion und Gel Normalisierung sowie ein Spot Abgleich zwischen allen untersuchten Gelen. Die relativen Intensitätsunterschiede der individuellen Spots wurden mittels Graustufenanalyse quantifiziert.

2.6 Proteinidentifizierung

Zur Proteinidentifizierung wurden im Rahmen der rEPO-Studie 2-DE-Gele mit einer MS-kompatiblen Silberfärbung gefärbt (59). Es wurden hierfür die gleichen Laufbedingungen wie bei den analytischen Gelen angewandt. Weiter zu untersuchende Proteinspots wurden aus dem 2-DE-Gel ausgeschnitten, einem Verdau mit Trypsin unterzogen und die entstehenden Fragmente mithilfe einer Nano-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (nHPLC) (Dionex/LC Packings, Amsterdam, Niederlande)/ESI-MS (Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie) oder -MS/MS an einer LCQ Deca XP Ionen Falle (Thermo Finigan, Waltham, MA, USA) analysiert. Dabei war die nHPLC direkt an die ESI-MS-Untersuchung gekoppelt. Die Erfassung der ESI-MS-Daten erfolgte durchgehend während des gesamten Chromatographielaufs. Die Rohdaten wurden durch den TurboSEQUENT-Algorithmus extrahiert, autolytische Trypsinfragmente und bekannte Keratinpeptide wurden anschließend gefiltert. Die gewonnenen Massenspektren wurden mit Hilfe einer automatisierten Suche in der Datenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, MD, USA) abgeglichen.

Für die Untersuchungen zum Einfluss veränderter Neurotransmission auf das Proteom des sich entwickelnden Gehirns wurden die Proteine wie bereits oben beschrieben elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. War keine eindeutige Zuordnung des Proteinspots möglich, so erfolgten hier allerdings zusätzliche Verdauerschritte für eine Analyse durch MALDI-MS. Dabei wurden Massenspektren von Peptidgemischen mit Hilfe eines Bruker Reflex IV MALDI-TOF (*time of flight*) Massenspektrometers (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) im Reflektor Betrieb generiert. Für die Datenverarbeitung wurde die Software XMASS/NT 5.1.16 (Bruker Daltonik GmbH) verwendet. Falls auch diese

Analyse mittels MALDI-MS keine exakte Identifizierung eines Proteinspots erlaubte, wurde der Spot aus der Studie ausgeschlossen.

2.7 Semiquantitative Real-time-PCR

Für die semiquantitative Real-time-Polymerase-Kettenreaktion erfolgte nach Tötung und Dekapitation der Versuchstiere die Entfernung des Riechkolbens und des Kleinhirns. Anschließend wurden die Gehirnhälften im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mittels einer Phenol/Chloroform-Extraktion. Nach Transkribierung und Amplifikation der entstandenen cDNA erfolgte eine Polyacrylamid Gelelektrophorese und anschließende Silberfärbung sowie densitometrische Untersuchung mit dem Bildanalyseprogramm BioDocAnalyze (Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland). Die RT-PCR wurde für Brain-derived-neurotrophic-Faktor (BDNF), Collapsing-response-mediator-Protein (Crmp) 2 und 4 messenger RNA (mRNA) durchgeführt.

2.8 Messung der Caspase-2- und Caspase-8-Enzymaktivität

Die Aktivität der Enzyme Caspase-2 und -8 wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-Assays (Caspase-2; Chemicon, Planegg-München, Deutschland; Caspase-8; Sigma, St. Louis, MO, USA) nach den Protokollen des Herstellers gemessen.

2.9 Western Blots

Western Blots wurden angefertigt, um Isospots von Collapsin-response-mediator Protein-2 (CRMP2) und Phosphoprotein-enriched-in-Astrocytes-Protein 15 (PEA15) zu identifizieren sowie um die Konzentrationen der Proteine Caspase-2, -3, -8, BDNF, Extracellular-signal-regulated-Kinasen 1 and 2 (ERK1/2), phospho-ERK1/2, Akt, phospho-Akt, Crmp2, Crmp4, and glyoxalase 1 (Glo1) zu untersuchen.

2.10 Fragebogen zum Gebrauch von Levetiracetam

Um den Gebrauch von Levetiracetam bei Säuglingen zu erfassen, wurde ein Fragebogen an Neonatologen und Neuropädiater aller 36 Universitätskliniken in Deutschland versandt. Von Interesse war vor allem, seit wann Erfahrung im Umgang mit Levetiracetam bestand und wie viele reife und unreife Neugeborene behandelt worden waren. Weiterhin wurden die durchschnittliche applizierte Dosis, die subjektiv eingeschätzte Wirksamkeit und etwaige beobachtete Nebenwirkungen unter Levetiracetam abgefragt. Schließlich wurde erfasst, ob Levetiracetam als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Pharmaka eingesetzt wurde und ob das Medikament als „first-line“ Therapie oder nur bei Versagen anderer Medikament eingesetzt wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung zum protektiven Effekt von Erythropoietin auf das sich entwickelnde Gehirn im Hyperoxieversuch und die Veränderungen am Proteom

(Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes, 2008)

In infantilen Rattengehirnen induzierte eine Hyperoxie eine disseminierte apoptotische Neurodegeneration, was wir mittels einer Silberfärbung zeigen konnten. Eine signifikante Reduktion der Apoptoserate zeigte sich nach einer einmaligen Behandlung der Versuchstiere mit rEPO vor der 24-stündigen Hyperoxie. Dabei war die Protektion mit 20.000 I.E. rEPO/kg KG ausgeprägter als unter 10.000 I.E.

Nach Hyperoxie und rEPO konnten am Gehirnproteom der Versuchstiere reproduzierbare qualitative Unterschiede an 25 Proteinspots mittels 2-DE-Gelen nachgewiesen werden (60). Die Unterschiede in der Spotintensität lagen dabei zwischen +10 und -40%. Ebenfalls konnten wir bei sieben Proteinen Mobilitätsunterschiede nachweisen, was auf Proteinmodifikationen bzw. Veränderungen des isoelektrischen Punkts rückschließen lässt. Durch die Massenspektrometrie wurden 24 Proteine identifiziert. Die Proteine, die in signifikant veränderter Konzentration nach Hyperoxie und Behandlung mit rEPO vorlagen, spielen dabei eine wichtige Rolle in der Abwehr freier Radikale, bei der Apoptose und der Regulation des Zellwachstums. rEPO inhibierte die meisten der beobachteten Proteomveränderungen, welche nach Hyperoxie aufgetreten waren.

In einem nächsten Schritt untersuchten wir den Effekt von rEPO auf das Proteom im Vergleich zu NaCl unter normoxischen Bedingungen. Hierbei konnten qualitative Unterschiede in 37 Proteinspots festgestellt werden. Die Intensitätsunterschiede lagen dabei zwischen +10 und -40%. Ebenfalls konnten wir Mobilitätsunterschiede bei fünf Proteinen feststellen. Durch die MS wurden 36 der 37 Proteine identifiziert. Die veränderten Proteine nach rEPO-Gabe spielen eine wichtige Rolle bei Prozessen wie oxidativem Stress, Inflammation, Zellwachstum und Bildung neuronaler Schaltkreise.

Mit Hilfe von Western Blot und Aktivitätsassay konnten wir eine Steigerung der Konzentration der Caspasen 2, 3 und 8 sowie der Aktivität der Caspase 2 und 8 im neonatalen Rattengehirn durch Hyperoxie nach 6-48 h nachweisen. Die Konzentration der Caspasen stieg nach 12 h an und war auch 48 h nach Behandlungsbeginn noch erhöht messbar. rEPO führte zu einer signifikanten Senkung sowohl der Enzymkonzentrationen als auch der gesteigerten Aktivität der Caspase-2, -3 und -8. Die alleinige Behandlung mittels rEPO ohne Änderung des pO_2 führte zu keinem signifikanten Unterschied der Enzymaktivität. Die Behandlung mit rEPO induziert weiterhin quantitative und qualitative Veränderungen mehrerer Proteine, welche mit oxidativem Stress assoziiert sind wie beispielsweise Peroxiredoxin-Isoformen, Glyoxalase 1 und Latexin.

Um zu untersuchen, in wie weit eine reduzierte Apoptoserate mit einer Reduktion des oxidativen Stresses in Verbindung gebracht werden kann, untersuchten wir infantile Nagetiergehirne bei Hyperoxie und Normoxie nach Behandlung mit rEPO oder NaCl. Als allgemeiner Marker für oxidativen Stress fungierte dabei das Ausmaß der Proteincarbonylierung.

Mittels semiquantitativer RT-PCR und Western Blot konnten wir außerdem zeigen, dass Hyperoxie zu einer Reduktion des neurotrophen Faktors BDNF im Gehirn der neonatalen Ratte führt. Zudem wurden die phosphorylierten Formen der Kinasen Akt sowie ERK1/2 nach Hyperoxie signifikant herabreguliert. Durch die Gabe von 20.000 I.E. rEPO vor der Hyperoxie konnte eine signifikante Erhöhung von BDNF, pAkt und pERK1/2 im neonatalen Gehirn der Ratte erreicht werden.

3.2 Die Auswirkungen veränderter Neurotransmission am NMDA- und GABA_A-Rezeptor auf das Proteom des sich entwickelnden Neokortex

(Brief alteration of NMDA or GABA_A receptor-mediated neurotransmission has long term effects on the developing cerebral cortex, 2008)

Wir untersuchten in einer weiteren Forschungsarbeit die Auswirkung veränderter Neurotransmission auf das Proteom des sich entwickelnden Neokortex (61). In einem ersten Schritt untersuchten wir die physiologischen Veränderungen des Proteoms, welche während der normalen Entwicklung des Gehirns ablaufen. Dazu wurde das Gesamtprotein des linkshemispheriellen Kortex elektrophoretisch getrennt und anschließend silbergefärbt. Bei ca. 6000 detektierten Proteinen konnte eine mit dem Alter der Versuchstiere zunehmende Komplexität des Proteoms beobachtet werden. Dies werteten wir als Folge einer zunehmenden Zahl von Proteinen bzw. dem gleichzeitigen Vorkommen verschiedener Isoproteine. Letzteres ist wiederum die Folge von ko- und/oder posttranslationaler Modifizierung des ursprünglichen Proteins und führt zu Veränderungen des Molekulargewichts, des isoelektrischen Punkts und der Konformation und letztlich zu einer veränderten Position des Proteins nach Wanderung im Gel. Wir teilten die Proteine in verschiedene Expressionsgruppen ein. Proteine, welche zu einem frühen Zeitpunkt der Hirnentwicklung nachweisbar waren, aber im weiteren Verlauf nicht mehr auftraten, ordneten wir der frühen Expressionsgruppe zu. Proteine, welche nur zu einem späten Zeitpunkt nachweisbar waren, wurden der späten Gruppe zugeteilt. Vervollständigt wurde diese Einteilung durch eine transiente Gruppe von Proteinen, welche nur innerhalb eines bestimmten Zeitraums nachweisbar waren und eine stabile Gruppe von Proteinen, welche nahezu unverändert über den gesamten beobachteten Zeitraum nachweisbar waren. Wir konnten des Weiteren beobachten, dass diese Klassifikation letztlich nicht für die Gesamtheit aller Isoproteine eines Proteins galt. So wurde beispielsweise Crmp2 mittels Gelelektrophorese der frühen Expressionsgruppe zugeordnet. In der Western Blot Analyse und anschließender MS waren hingegen bestimmte Isoproteine von Crmp2 ausschließlich zu einem späten Zeitpunkt nachweisbar.

In einem nächsten Schritt konnten wir nun zeigen, dass die einmalige Behandlung mit Dizocilpin oder Phenobarbital zum Zeitpunkt P6 nicht nur kurzfristige, sondern auch

langfristige Effekte auf den zerebralen Kortex hat. Durch Vergleich der Gele der Kontrolltiere mit denen der behandelten Tiere konnten reproduzierbare qualitative und quantitative Unterschiede in 28 (P7), 14 (P14) und 18 (P35) Proteinspots der mit Dizocilpin und in 24 (P7), 19 (P14) und vier (P35) der mit Phenobarbital behandelten Tiere gezeigt werden. Die Intensitätsunterschiede lagen dabei zwischen 10-150%. Außerdem konnte bei sechs Proteinen eine veränderte elektrophoretische Wanderung nachgewiesen werden. Mithilfe der MS wurden von den o.g. Proteinveränderungen 25, 12 und 16 (Dizocilpin) sowie 19, 18 und vier (Phenobarbital) Proteine zu den Zeitpunkten P7, P14 und P35 identifiziert.

Die unterschiedlich regulierten Proteine konnten dabei allen vier oben genannten Expressionsgruppen zugeordnet werden. Die Expression einiger Proteine war sowohl nach Gabe von Dizocilpin als auch mit Phenobarbital verändert. Dies konnte z. B. bei Peroxiredoxin 1 und 2, ein wichtiges Protein bei der Abwehr freier Radikale, beobachtet werden. Dizocilpin induzierte außerdem zwei bzw. vier Wochen nach der Behandlung eine Änderung der Carboanhydrase. Diese Veränderungen traten nach Behandlung des adulten Gehirns nicht auf.

Weiterhin konnten wir Veränderungen von Proteinen zeigen, welche wichtige Funktionen im Rahmen von Proliferation bzw. Ausbildung neuronaler Netzwerke haben. Dies konnte für Rab- und Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor-1-Protein (RABGDI1 und RHOGDI1) in der Dizocilpin-Gruppe und für die Crmp Isoformen 1, 2 und 4, Profilin 2 nach Behandlung mit Dizocilpin oder Phenobarbital gezeigt werden.

Um einen möglichen Unterschied in der unterschiedlichen Regulation von Crmp bereits auf RNA-Ebene zu untersuchen, führten wir eine semiquantitative RT-PCR durch. Hier konnten wir zeigen, dass es zu einer Zunahme von *Crmp2* und *Crmp4* mRNA Konzentrationen sechs und 12 h nach der medikamentösen Therapie gekommen war, welche auch über 24 h später noch nachweisbar war. Die Effekte von Dizocilpin und Phenobarbital waren dabei abhängig vom Entwicklungsalter und traten bei der Behandlung adulter Tiere nicht auf.

Die beobachteten Proteomveränderungen lassen auf eine Fehlregulation von Proteinen schließen, welche bei Apoptose, bei oxidativem Stress, im Rahmen von Inflammation, Zellproliferation und der Entstehung neuronaler Netzwerke eine Rolle spielen. Der Behandlungszeitpunkt scheint von Bedeutung zu sein, da die beschriebenen Veränderungen nicht nach einer Behandlung des reifen Gehirns auftraten. Eine

Ausnahme stellen die Proteasom- α 5-Untereinheit (PSAM5), Prohibitin (PHB) sowie das nukleäre Ribonucleoprotein-A3 (HNRNPA3) dar. Die Ergebnisse ergänzen die bereits früher beobachteten ausgedehnten apoptotischen Veränderungen und verminderte Zellproliferation nach einer Behandlung mit Dizocilpin oder Phenobarbital (8, 9).

3.3 Die Behandlung von Neugeborenen mit Levetiracetam

(Treating Neonates with Levetiracetam: a survey among German University Hospitals, 2011).

Wir untersuchten deutschlandweit die Anwendung des neueren Antiepileptikums Levetiracetams bei Neugeborenen an Universitätskliniken mittels eines standardisierten Fragebogens (62). Wir erhielten von 35 der 36 angeschriebenen Universitätskliniken einen ausgefüllten Antwortbogen. In 46% der kontaktierten Kliniken war Levetiracetam zumindest einmal verwendet worden, in den meisten Fällen innerhalb der letzten drei Jahre und überwiegend bei Reifgeborenen. In sechs Kliniken wurde das Medikament auch bei Frühgeborenen angewendet. An den meisten Krankenhäusern wurde Phenobarbital bei Anfällen von Neugeborenen vor der Benutzung von Levetiracetam appliziert. In fünf Krankenhäusern bestand bereits größere Erfahrung in der Behandlung mit Levetiracetam bei Neugeborenen (12-38 Fälle). In den restlichen Häusern lag die Anzahl der behandelten Patienten zwischen einem und acht Kindern. Die Durchschnittsdosis lag bei 40 mg/kg/d, wobei die Dosierungen von 10 bis 80 mg/kg/d reichten. Bei ca. 55% der Patienten wurde nach der Gabe von Levetiracetam eine vorübergehende Anfallsfreiheit erreicht. In 65 von 172 beschriebenen Fällen konnte eine längere Anfallsfreiheit erreicht werden. Nebenwirkungen wurden insgesamt selten beobachtet. Aus sechs Krankenhäusern wurde über Agitation, Schlafstörungen, Hyperkinesie, Müdigkeit, Thrombozytopenie und Leberfunktionsstörung berichtet sowie einmalig von einer Blutauflagerung auf dem Stuhl eines Neugeborenen. Ein direkter Zusammenhang zur Verwendung von Levetiracetam konnte jeweils nicht gezeigt werden. Insgesamt bestand seitens der befragten Mediziner großes Interesse an weiteren Studien bzw. der Teilnahme an einem Register, um die Anwendung von Levetiracetam bei Neugeborenen und Frühgeborenen systematisch aufarbeiten zu können.

4. Diskussion

Der Neuroprotektion des unreifen Gehirns kommt in der modernen Medizin eine besondere Bedeutung zu, da perinatale Hirnschäden eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität in diesem Lebensabschnitt darstellen. Der Zeitpunkt der größten Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns fällt dabei zeitlich zusammen mit dem Zeitpunkt des schnellsten Gehirnwachstums, welcher bei Menschen in der mittleren Schwangerschaft beginnt und bis zum dritten postnatalen Jahr andauert. In der Vergangenheit konnte mehrfach die stark apoptotische Wirkung einer Hyperoxie auf das sich entwickelnde Gehirn von Nagetieren nachgewiesen werden (17, 63). In klinischen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass eine erhöhte Sauerstoffkonzentration mit einem schlechteren neurologischen Ergebnis bei Überlebenden einer Frühgeburt assoziiert ist (64, 65). Das ZNS von Frühgeborenen reagiert besonders empfindlich auf den durch freie Radikale vermittelten oxidativen Stress (66). Frühgeborene zeigen außerdem nicht nur eine Entwicklungsunreife ihrer Abwehr gegenüber freien Radikalen, sondern sind zusätzlich einer relativen Hyperoxie ausgesetzt, verglichen mit dem intrauterin herrschenden Milieu. Wir konnten zeigen, dass die ausgedehnten Veränderungen, welche durch eine Hyperoxie induziert werden, zum Teil durch die Gabe von rEPO verhindert werden können. Dies konnte sowohl auf histologischer als auch auf Protein- und Nukleinsäureebene nachgewiesen werden. In unseren Studien zeigen wir außerdem mögliche, in diesen Prozess involvierte, molekulare Mechanismen. Wir vermuten, dass eine systemische rEPO-Gabe das unreife Gehirn vor hyperoxie-induzierten Schäden schützen kann. Dabei erfolgt bezüglich der klinischen Anwendung von rEPO aktuell eine rege Diskussion über die Sinnhaftigkeit dieser Intervention bezüglich der Vermeidung von Bluttransfusionen.

Auch therapeutische Maßnahmen wie die Gabe von Benzodiazepinen oder Phenobarbital können das sich entwickelnde Gehirn schädigen. So konnten wir zeigen, dass die einmalige Behandlung mit Dizocilpin oder Phenobarbital zu einem bestimmten Zeitpunkt, langfristige Effekte auf das sich entwickelnde Nervensystem hat. Die beobachteten Proteomveränderungen zeigen eine Fehlregulation von Proteinen, die bei der Apoptose, bei oxidativem Stress, im Rahmen von Inflammation, Zellproliferation und bei der Entstehung neuronaler Netzwerke eine Rolle spielen. Unsere Ergebnisse sind aus klinischer Perspektive hochrelevant, da sowohl die Sauerstoffgabe als auch eine antikonvulsive Therapie bei Neonaten oft unumgänglich ist.

Für das Medikament Levetiracetam konnte in der Vergangenheit in verschiedenen Tierstudien gezeigt werden, dass es im Gegensatz zu etablierten und weitverbreiteten Medikamenten wie Phenobarbital und Diazepam keine erhöhte Apoptoserate im unreifen Gehirn nach sich zieht (52). Darüber hinaus konnte in einer Tierstudie ein vermeintlich direkter neuroprotektiver Effekt im Sinne einer geringeren Apoptoserate von Levetiracetam nach hypoxisch-ischämischem Hirnschaden gezeigt werden (67). Dabei ist Levetiracetam ein effektives und sicheres Therapeutikum bei Kindern nach der neonatalen Periode und bei Erwachsenen. In „off label“-Studien konnte des Weiteren gezeigt werden, dass auch ein Einsatz bei Neugeborenen effektiv und sicher sein kann (68, 69, 70, 71, 72, 73). In einer Untersuchung an sechs Neugeborenen konnte erstmals die gute Effektivität bei offensichtlich hoher Therapiesicherheit prospektiv bestätigt werden (73). Eine größere retrospektive Studie mit 280 Kindern konnte zeigen, dass Phenobarbital mit einem schlechteren Ergebnis bezüglich der neuronalen Entwicklung einhergeht als Levetiracetam (74).

Um zu untersuchen, inwieweit das Medikament Levetiracetam an deutschen Universitätskliniken bereits eingesetzt wird, führten wir eine entsprechende Umfrage durch. Dabei konnten wir zeigen, dass bereits in knapp der Hälfte der befragten Krankenhäuser erste Erfahrungen beim Einsatz von Levetiracetam gemacht worden waren und das Medikament im Allgemeinen als gut verträglich eingestuft wurde. Die kurzfristige Anfallsfreiheit lag bei 55%, was angesichts der Tatsache, das Levetiracetam nahezu immer als Zweitlinientherapie eingesetzt worden war, durchaus hoch ist. Von der Mehrheit der befragten Ärzte wurde Interesse an systemischen, prospektiven Untersuchungen zu Levetiracetam bei Neu- und Frühgeborenen bekundet. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurde bisher keine große randomisierte kontrollierte Studie im Hinblick auf Sicherheit und Wirksamkeit von Levetiracetam bei Neugeborenen veröffentlicht. Aktuell erfolgen sechs Studien zu Pharmakokinetik, Sicherheit, Wirksamkeit und Dosisfindung für die Behandlung neonataler Anfälle mit Levetiracetam. Vier Studien sind abgeschlossen, die Ergebnisse sind noch nicht publiziert (www.clinicaltrials.gov).

Dies zeigt, welchen Stellenwert der Neuroprotektion in der modernen neonatalen Medizin zukommt und von welchem großem Interesse dieses Thema für viele in Deutschland tätige Ärzte ist. Sowohl Studien, die zum genaueren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen beitragen als auch interventionelle

Untersuchungen, beispielsweise zur Gabe von Erythropoietin und zum Einsatz moderner antikonvulsiver Medikamente sollten daher vermehrt unternommen werden.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Linderkamp O, Janus L, Linder R, Skoruppa DB. Entwicklungsschritte des fetalen Gehirns. *Int. J. Prenatal and Perinatal Psychology and Medicine* 2009;21:91–105.
- 2 Ikonomidou C. Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain. *Neuronal Death by Accident or by Design, Research and Perspectives in Neurosciences* 2001; pp 89-96.
- 3 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug;26(4):239-57.
- 4 Johnson EM Jr. and Deckwerth TL. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1993;16:31-46.
- 5 Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* 1974;53(1):2-6.
- 6 Dobbing J and Sands J. Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child* 1973;48: 757-67.
- 7 Olney JW, Farber NB, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V and Ikonomidou C. Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Environ Health Perspect* 2000;108 Suppl 3: 383-8.
- 8 Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999;283: 70-4.
- 9 Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 2000;287: 1056-60.
- 10 Bittigau P, Siffringer M, Pohl D, Stadthaus D, Ishimaru M, Shimizu H et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 1999;45: 724-35.

-
- 11 Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hubner C, Olney JW et al. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 2508-13.
 - 12 McQuillen PS and Ferriero DM. Selective vulnerability in the developing central nervous system. *Pediatr Neurol* 2004;30: 227-35.
 - 13 Folkerth RD. The neuropathology of acquired pre- and perinatal brain injuries. *Semin Diagn Pathol* 2007;24: 48-57.
 - 14 Vexler ZS and Ferriero DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2001;6: 99-108.
 - 15 Brehmer F, Bendix I, Prager S, van de Looij Y, Reinboth BS, Zimmermanns J, Schlager GW, Brait D, Sifringer M, Endesfelder S, Sizonenko S, Mallard C, Bühner C, Felderhoff-Mueser U, Gerstner B. Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage. *PLoS One* 2012;7(11):e49023.
 - 16 Deuber C, Terhaar M. Hyperoxia in very preterm infants: a systematic review of the literature. *J Perinat Neonatal Nurs* 2011 Jul-Sep;25(3):268-74.
 - 17 Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M, Jarosz B, Korobowicz E, Mahler L, Piening T, Moysich A, Grune T, Thor F, Heumann R, Bühner C, Ikonomidou C. Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis* 2004 Nov;17(2):273-82.
 - 18 Gerstner B, Bühner C, Rheinländer C, Polley O, Schüller A, Berns M, Obladen M, Felderhoff-Mueser U. Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia. *J Neurosci Res* 2006 Aug 1;84(2):306-15.
 - 19 Brehmer F, Bendix I, Prager S, van de Looij Y, Reinboth BS, Zimmermanns J, Schlager GW, Brait D, Sifringer M, Endesfelder S, Sizonenko S, Mallard C, Bühner C, Felderhoff-Mueser U, Gerstner B. Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage. *PLoS One* 2012;7(11):e49023.
 - 20 Saugstad OD. Is oxygen more toxic than currently believed? *Pediatrics* 2001 Nov;108(5):1203-5.

-
- 21 Saugstad OD. Optimal oxygenation at birth and in the neonatal period. *Neonatology* 2007;91(4):319-22.
 - 22 Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001;7(1):56-64.
 - 23 Volpe JJ. The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Semin Pediatr Neurol.* 2009 Dec;16(4):167-78.
 - 24 Evans K, Rigby AS, Hamilton P, Titchiner N, Hall DM. The relationships between neonatal encephalopathy and cerebral palsy: a cohort study. *J Obstet Gynaecol.* 2001 Mar;21(2):114-20.
 - 25 Rorke LB. Anatomical features of the developing brain implicated in pathogenesis of hypoxic-ischemic injury. *Brain Pathol.* 1992 Jul;2(3):211-21.
 - 26 Saliba E, Favrais G and Gressens P. Neuroprotection of the newborn: from bench to cribside. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12: 239-40.
 - 27 Traudt CM, McPherson RJ, Bauer LA, Richards TL, Burbacher TM, McAdams RM, Juul SE. Concurrent erythropoietin and hypothermia treatment improve outcomes in a term nonhuman primate model of perinatal asphyxia. *Dev Neurosci.* 2013;35(6):491-503.
 - 28 Rutherford MA, Azzopardi D, Whitelaw A, Cowan F, Renowden S, Edwards AD, Thoresen M. Mild hypothermia and the distribution of cerebral lesions in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2005 Oct;116(4):1001-6.
 - 29 Schlager GW, Griesmaier E, Wegleiter K, Neubauer V, Urbanek M, Kiechl-Kohlendorfer U, Felderhoff-Mueser U, Keller M. Systemic G-CSF treatment does not improve long-term outcomes after neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Exp Neurol.* 2011 Jul;230(1):67-74.
 - 30 Yata K, Matchett GA, Tsubokawa T, Tang J, Kanamaru K, Zhang JH. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res.* 2007 May 11;1145:227-38.

-
- 31 Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Jun;19(6):643-51.
 - 32 Weber A, Maier RF, Hoffmann U, Grips M, Hoppenz M, Aktas AG, Heinemann U, Obladen M, Schuchmann S. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 2002 Dec 27;958(2):305-11.
 - 33 Juul S, Felderhoff-Mueser U. Epo and other hematopoietic factors. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007 Aug;12(4):250-8.
 - 34 Fauchère JC, Dame C, Vonthein R, Koller B, Arri S, Wolf M, Bucher HU. An approach to using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *Pediatrics.* 2008 Aug;122(2):375-82.
 - 35 Juul SE, McPherson RJ, Bammler TK, Wilkerson J, Beyer RP, Farin FM. Recombinant erythropoietin is neuroprotective in a novel mouse oxidative injury model. *Dev Neurosci.* 2008;30(4):231-42.
 - 36 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.* 2004;114:1287–1291.
 - 37 Bierer R, Peceny MC, Hartenberger CH, Ohls RK. Erythropoietin concentrations and neurodevelopmental outcome in preterm infants. *Pediatrics.* 2006;118:e635–640.
 - 38 Brown MS, Eichorst D, Lala-Black B, Gonzalez R. Higher cumulative doses of erythropoietin and developmental outcomes in preterm infants. *Pediatrics.* 2009;124:e681–687.
 - 39 Dame C, Langer J, Koller BM, Fauchère JC, Bucher HU. Urinary erythropoietin concentrations after early short-term infusion of high-dose recombinant epo for neuroprotection in preterm neonates. *Neonatology.* 2012;102(3):172-7.

-
- 40 Ohlsson A, Aher SM. Early erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Sep 12;9:CD004863.
 - 41 Taskin E, Ozcan K, Canacankatan N, Satar M, Yapicioglu HY, Erdogan S. The effects of indomethacin on caspases, glutathione level and lipid peroxidation in the newborn rats with hypoxic-ischemic cerebral injury. *Brain Res*. 2009 Sep 15;1289:118-23.
 - 42 Torrance HL, Benders MJ, Derks JB, Rademaker CM, Bos AF, Van Den Berg P, Longini M, Buonocore G, Venegas M, Baquero H, Visser GH, Van Bel F. Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood levels of the brain injury marker S-100B. *Pediatrics*. 2009 Jul;124(1):350-7.
 - 43 Sarco DP, Becker J, Palmer C, Sheldon RA, Ferriero DM. The neuroprotective effect of deferoxamine in the hypoxic-ischemic immature mouse brain. *Neurosci Lett*. 2000 Mar 17;282(1-2):113-6.
 - 44 van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Combination of deferoxamine and erythropoietin: therapy for hypoxia-ischemia-induced brain injury in the neonatal rat? *Neurosci Lett*. 2009 Feb 20;451(2):109-13.
 - 45 Rogawski MA and Loscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med*. 2004;10: 685-92.
 - 46 Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 2000 Apr 6;404(6778):629.
 - 47 Crestani F, Martin JR, Mohler H and Rudolph U. Mechanism of action of the hypnotic zolpidem in vivo. *Br J Pharmacol*. 2000 Dec;131(7): 1251-4.
 - 48 French-Mullen JM, Barker JL and Rogawski MA. Calcium current block by (-)-pentobarbital, phenobarbital, and CHEB but not (+)-pentobarbital in acutely isolated hippocampal CA1 neurons: comparison with effects on GABA-activated Cl⁻ current. *J Neurosci*. 1993 Aug;13(8): 3211-21.

-
- 49 Kleckner NW, Glazewski JC, Chen CC and Moscrip TD. Subtype-selective antagonism of N-methyl-D-aspartate receptors by felbamate: insights into the mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 May;289(2):886-94.
 - 50 Macdonald RL and Olsen RW. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17: 569-602.
 - 51 Holmes LB, Harvey EA, Coull BA, Huntington KB, Khoshbin S, Hayes AM, Ryan LM. The teratogenicity of anticonvulsant drugs. *N Engl J Med.* 2001 Apr 12;344(15):1132-8.
 - 52 Manthey D, Asimiadou S, Stefovaska V, Kaindl AM, Fassbender J, Ikonomidou C, Bittigau P. Sulthiame but not levetiracetam exerts neurotoxic effect in the developing rat brain. *Exp Neurol.* 2005 Jun;193(2):497-503.
 - 53 Dobbing J and Sands J. Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child.* 1973 Oct;48(10):757-67.
 - 54 Zabel C and Klose J. Protein extraction for 2DE. *Methods Mol Biol.* 2009;519:171-96.
 - 55 DeOlmos JS and Ingram WR. An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration. *Brain Res.* 1971 Oct 29;33(2):523-9.
 - 56 West MJ and Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol.* 1990;296:1–22.
 - 57 Klose J and Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis.* 1995;16:1034 –1059.
 - 58 Klose J, Nock C, Herrmann M, Stühler K, Marcus K, Blüggel M, Krause E, Schalkwyk LC, Rastan C, Brown SD, Büssow K, Himmelbauer H, Lehrach H. Genetic analysis of the mouse brain proteome. *Nat Genet* 2002 Apr;30(4):385–39.
 - 59 Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996;68:850–858.
 - 60 Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, Boerner C, Stuwe J, Klose J, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin protects the developing brain from

-
- hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol.* 2008 Nov;64(5):523-34.
- 61 Kaindl AM, Koppelstaetter A, Nebrich G, Stuwe J, Sifringer M, Zabel C, Klose J, Ikonomidou C. Brief alteration of NMDA or GABAA receptor-mediated neurotransmission has long term effects on the developing cerebral cortex. *Mol Cell Proteomics* 2008 Dec;7(12):2293-310.
- 62 Koppelstätter A, Bühner C, Kaindl AM. [Treating Neonates with Levetiracetam: a survey among German University Hospitals]. *Klin Padiatr.* 2011 Dec;223(7):450-2.
- 63 Hoehn T, Felderhoff-Mueser U, Maschewski K, Stadelmann C, Sifringer M, Bittigau P, Koehne P, Hoppenz M, Obladen M, Bühner C. Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain. *Pediatr Res.* 2003 Aug;54(2):179 –184.
- 64 Iwamoto HS, Teitel D, Rudolph AM. Effects of birth-related events on blood flow distribution. *Pediatr Res.* 1987 Dec;22(6):634-40.
- 65 Darlow BA, Cust AE, Donoghue DA. Improved outcomes for very low birthweight infants: evidence from New Zealand national population based data. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003 Jan;88(1):F23-8.
- 66 Perrone S, Negro S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Oct;23 Suppl 3:63-5.
- 67 Kilicdag H, Daglioglu K, Erdogan S, Guzel A, Sencar L, Polat S, Zorludemir S. The effect of levetiracetam on neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Early Hum Dev.* 2013 May;89(5):355-60.
- 68 Shoemaker MT and Rotenberg JS. Levetiracetam for the treatment of neonatal seizures. *J Child Neurol* 2007;22(1):95-8.
- 69 Silverstein FS and Ferriero DM. Off-label use of antiepileptic drugs for the treatment of neonatal seizures. *Pediatr Neurol.* 2008;39(2):77-9.
- 70 Ramantani G, Ikonomidou C, Walter B, Rating D, Dinger J. Levetiracetam: safety and efficacy in neonatal seizures. *Eur J Paediatr Neurol.* 2011;15(1):1-7.

-
- 71 Abend NS, Gutierrez-Colina AM, Monk HM, Dlugos DJ, Clancy RR. Levetiracetam for treatment of neonatal seizures. *J Child Neurol.* 2011;26(4):465-470.
- 72 Khan O, Chang E, Cipriani C, Wright C, Crisp E, Kirmani B. Use of intravenous levetiracetam for management of acute seizures in neonates. *Pediatr Neurol.* 2011;44(4):265-9.
- 73 Fürwentsches A, Bussmann C, Ramantani G, Ebinger F, Philippi H, Pöschl J, Schubert S, Rating D, Bast T. Levetiracetam in the treatment of neonatal seizures: a pilot study. *Seizure* 2010 Apr;19(3):185-9.
- 74 Maitre NL, Smolinsky C, Slaughter JC, Stark AR. Adverse neurodevelopmental outcomes after exposure to phenobarbital and levetiracetam for the treatment of neonatal seizures. *J Perinatol.* 2013 Nov;33(11):841-6.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Andrea Johanna Maria Koppelstätter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Perinatale Hirnschäden und Neuroprotektion“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 20.06.2014

Unterschrift

Anteilerklärung an den ausgewählten Publikationen

Publikation 1:

Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, Boerner C, Stuwe J, Klose J, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. Ann Neurol. 2008 Nov;64(5):523-34.

Beitrag im Einzelnen:

Probenvorbereitung und Durchführung der Säulenchromatographie und Massenspektrometrie. Wartung und Reparatur der nanoHPLC-Anlage, Anpassung der Programme entsprechend der Fragestellung und computergestützte Steuerung der Anlage. Wartung und Kalibrierung der Massenspektrometer, Datentransfer und Umwandlung der Massenprofile und abschließend die Proteinidentifizierung durch eine Datenbankanalyse mit dem Programm Mascot. Auswertung der Suchergebnisse und Diskussion der Ergebnisse.

Publikation 2:

Kaindl AM, Koppelstaetter A, Nebrich G, Stuwe J, Sifringer M, Zabel C, Klose J, Ikonomidou C. Brief alteration of NMDA or GABAA receptor-mediated neurotransmission has long term effects on the developing cerebral cortex. Mol Cell Proteomics. 2008 Dec;7(12):2293-310.

Beitrag im Einzelnen:

Probenvorbereitung und Durchführung der Säulenchromatographie und Massenspektrometrie. Wartung und Reparatur der nanoHPLC-Anlage, Anpassung der Programme entsprechend der Fragestellung und computergestützte Steuerung der Anlage. Wartung und Kalibrierung der Massenspektrometer, Datentransfer und Umwandlung der Massenprofile und abschließend die Proteinidentifizierung durch eine Datenbankanalyse mit dem Programm Mascot. Auswertung der Suchergebnisse und Diskussion der Ergebnisse. Beteiligung am Schreiben des Manuskripts.

Publikation 3:

Koppelstätter A, Bühner C, Kaindl AM. [Treating Neonates with Levetiracetam: a survey among German University Hospitals]. Klin Padiatr. 2011 Dec;223(7):450-2.

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an der Versuchsplanung, Auswertung der Fragebögen und statistische Analyse sowie Mithilfe beim Verfassen des Manuskripts.

Berlin, den 20.06.2014

cand. med. Andrea J.M. Koppelstätter

(Doktorandin)

PD Dr. Angela M. Kaindl

(Hochschullehrerin)

Publikation 1:

Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, Boerner C, Stuwe J, Klose J, Felderhoff-Mueser U. Ann Neurol. 2008 Nov;64(5):523-34.

<https://doi.org/10.1002/ana.21471>

Publikation 2:

Brief alteration of NMDA or GABAA receptor-mediated neurotransmission has long term effects on the developing cerebral cortex. Kaindl AM, Koppelstaetter A, Nebrich G, Stuwe J, Sifringer M, Zabel C, Klose J, Ikonomidou C. Mol Cell Proteomics. 2008 Dec;7(12):2293-310.

<https://doi.org/10.1074/mcp.M800030-MCP200>

Publikation 3:

[Treating Neonates with Levetiracetam: a survey among German University Hospitals]. Koppelstätter A, Bühner C, Kaindl AM. *Klin Padiatr.* 2011 Dec;223(7):450-2.
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1287822>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Originalpublikationen

1. **Koppelstätter A**, Bühner C, Kaindl AM. [Treating Neonates with Levetiracetam: a survey among German University Hospitals]. *Klin Padiatr.* 2011 Dec;223(7):450-2.
2. Diedrich M, Kitada T, Nebrich G, **Koppelstaetter A**, Shen J, Zabel C, Klose J, Mao L. Brain region specific mitophagy capacity could contribute to selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Proteome Sci.* 2011 Sep 23;9:59.
- 3 Mao L, Römer I, Nebrich G, Klein O, **Koppelstätter A**, Hin SC, Hartl D, Zabel C. Aging in mouse brain is a cell/tissue-level phenomenon exacerbated by proteasome loss. *J Proteome Res.* 2010 Jul 2;9(7):3551-60.
4. Zabel C, Mao L, Woodman B, Rohe M, Wacker MA, Kläre Y, **Koppelstätter A**, Nebrich G, Klein O, Grams S, Strand A, Luthi-Carter R, Hartl D, Klose J, Bates GP. A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for huntington disease. *Mol Cell Proteomics.* 2009 Apr;8(4):720-34.
5. Kaindl AM, **Koppelstaetter A**, Nebrich G, Stuwe J, Sifringer M, Zabel C, Klose J, Ikonomidou C. Brief alteration of NMDA or GABAA receptor-mediated neurotransmission has long term effects on the developing cerebral cortex. *Mol Cell Proteomics.* 2008 Dec;7(12):2293-310.
6. Kaindl AM, Sifringer M, **Koppelstaetter A**, Genz K, Loeber R, Boerner C, Stuwe J, Klose J, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol.* 2008 Nov;64(5):523-34.
7. Mao L, Hartl D, Nolden T, **Koppelstätter A**, Klose J, Himmelbauer H, Zabel C. Pronounced alterations of cellular metabolism and structure due to hyper- or hypo-osmosis. *J Proteome Res.* 2008 Sep;7(9):3968-83.

Kongressbeiträge

1. Vortrag: Einsatz von Levetiracetam bei Neugeborenen an deutschen Universitätskliniken – eine Umfrage. A. Koppelstätter, C. Bühner, A.M. Kaindl (Berlin). 107. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin e.V. (DGKJ), Bielefeld, Deutschland.

Danksagung

Mein Dank gilt ganz besonders meiner Doktormutter Frau PD Dr. Angela Kaindl für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Ihr zügiges Korrekturlesen des Manuskripts hat wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Danke für die fortwährende Motivation!

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Joachim Klose für die herzliche Aufnahme am Institut für Humangenetik und seine Ratschläge bei Spezialfragen und Frau Dipl.-Ing. Grit Nebrich sowie Frau Silke Becker, für die Einarbeitung in die Massenspektrometrie und nanoHPLC. Der Arbeitsgruppe J. Klose danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung und die angenehme und oft lustige Zusammenarbeit. Insbesondere Frau Bettina Esch, Frau Dr. Madeleine Dietrich, Frau Dr. Daniela Hartl, Frau Marion Herrmann, Frau Yvonne Kläre, Herrn Dipl.-Ing. Oliver Klein, Frau Janine Stuwe, Herrn Dr. Claus Zabel und zu guter Letzt Frau Dr. Lei Mao für ihre Unterstützung und die eine oder andere Taiji-Pause. Herr Latala hat bei Wartung und Reparatur der HPLC-Anlage sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. Christoph Bühner bin ich für das Überlassen der Levetiracetam Studie und die konstruktive Kritik beim Schreiben des Manuskripts zu Dank verpflichtet.

Ich danke meinen lieben Eltern für ihre Unterstützung und Förderung während meiner gesamten Ausbildung, sowie Tim, der ganz besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.