

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genexpression von Erythropoietin durch
Präkonditionierung des Zentralnervensystems**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Hufnagel

aus Greifswald

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Meisel
2. Prof. Dr. H. H. Marti
3. Prof. Dr. rer. nat. R. Schäfer

Datum der Promotion: 27.03.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Schlaganfall.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Einteilung.....	1
1.1.3 Pathomechanismen.....	2
1.1.3.1 Die Penumbra.....	2
1.1.3.2 Die Schadenskaskade der zerebralen Ischämie.....	2
1.2 Präkonditionierung.....	5
1.3 Erythropoietin und der Erythropoietin-Rezeptor.....	7
1.3.1 Physiologische Aspekte Erythropoietins.....	7
1.3.2 Physiologische Aspekte des Erythropoietin-Rezeptors.....	9
1.3.3 Durch Erythropoietin vermittelte protektive Effekte im ZNS.....	9
1.4 Der Hypoxie induzierbare Faktor (HIF 1).....	10
1.5 Desferrioxamin (DFX).....	11
1.6 Herleitung einer Aufgabenstellung.....	12
2. Material	14
2.1 Tiere	14
2.2 Gasgemisch.....	14
2.3 Geräte.....	14
2.4 Zellkultur- und Bakterienkulturmedien und Puffer.....	14
2.5 Kits.....	15
2.6 Enzyme.....	16
2.7 DNA-Größenstandard.....	16
2.8 Oligonukleotide.....	16
2.9 Chemikalien.....	17
2.10 Software.....	18

3. Methoden	19
3.1 RNA-Isolierung.....	19
3.1.1 RNA-Isolierung von präkonditionierten Tieren.....	19
3.1.1.1 Aktenzeichen und behördliche Genehmigung der Tierversuche.....	20
3.1.2 RNA-Isolierung aus hypoxisch präkonditionierten Astrozyten.....	20
3.1.3 Technik der RNA-Isolierung.....	21
3.1.4 RNA-Reinigung.....	22
3.1.5 Quantifizierung der RNA-Menge.....	22
3.2 mRNA-Purifikation.....	23
3.3 cDNA-Synthese.....	24
3.3.1 Prinzipien und Technik der cDNA-Synthese.....	24
3.3.2 Quantifizierung der gewonnenen DNA-Menge.....	25
3.4 Die semiquantitative kompetitive RT-PCR.....	25
3.4.1 Die kompetitive RT-PCR von Epo RNA.....	26
3.4.1.1 Generierung des Erythropoietin-Deletionsfragment als Standard.....	26
3.4.1.2 Bedingungen für die kompetitive Erythropoietin RT-PCR.....	28
3.4.2 Die kompetitive RT-PCR von β -Actin RNA.....	29
3.4.2.1 Generierung des β -Actin-Deletionsfragment als Standard.....	29
3.4.2.2 Bedingungen für die β -Actin-RT-PCR.....	30
3.5 Quantifizierung der PCR-Produkte.....	30
3.6 Quantitative <i>Real Time</i> RT-PCR.....	32
3.6.1 Prinzipien der <i>Real Time</i> PCR.....	32
3.6.1.1 Quantitative <i>Real Time</i> PCR mittels der <i>SYBR-Green</i> -Methode.....	33
3.6.1.2 Quantitative <i>Real Time</i> PCR durch Bindung spezifischer Hybridisationssonden.....	34
3.6.2 Bedingungen für die <i>Real Time</i> RT-PCR.....	35
3.6.3 Quantifizierung und Identifizierung der <i>Real Time</i> PCR-Produkte.....	36
3.7 Sequenzierung der PCR-Produkte der semiquantitativen RT-PCR.....	37
3.7.1 Extraktion des DNA-Fragments aus dem Gel.....	37
3.7.2 Klonierung des DNA-Fragments.....	38

3.7.3	Bakterienkultur und Plasmidpräparation	38
3.7.3.1	Bakterienkultur	38
3.7.3.2	Plasmid-DNA-Präparation aus E.coli	39
3.7.4	Sequenzierung	39
3.8	Angewendete statistische Verfahren	40
4.	Ergebnisse	42
4.1	Die semiquantitative kompetitive RT-PCR	42
4.1.1	Die Etablierung der semiquantitativen kompetitiven Erythropoietin-RT-PCR	42
4.1.2	Die Etablierung der semiquantitativen kompetitiven β -Actin-RT-PCR	44
4.1.3	Die Auswertung der semiquantitativen Erythropoietin-RT-PCR	45
4.1.4	Die Auswertung der semiquantitativen β -Actin-RT-PCR	47
4.1.5	Die Ergebnisse der semiquantitativen Erythropoietin-RT-PCR	50
4.2	Die quantitative <i>Real Time</i> PCR	51
4.2.1	Die Etablierung der quantitativen <i>Real Time</i> PCR	52
4.2.2	Die Ergebnisse der quantitativen <i>Real Time</i> PCR	53
5.	Diskussion	54
5.1	Die semiquantitative kompetitive RT-PCR	54
5.1.1	Die semiquantitative RT-PCR	54
5.1.2	Die Quantifizierung des Targetgens	55
5.1.3	Die Normalisierung durch das β -Actin-Gen	56
5.1.4	Die quantitative Real-Time PCR	56
5.2	Die Erythropoietininduktion durch Ischämie, Hypoxie, hypoxische Präkonditionierung und Chemikalien	57

5.3 Die Wirkung von Erythropoietin	63
5.3.1 Protektive durch Erythropoietin vermittelte Effekte	63
5.3.2 Intrazelluläre durch Erythropoietin vermittelte Signalkaskaden	64
5.4 Die klinische Relevanz Erythropoietins in Hinblick auf neuroprotektive Therapeutische Ansätze bei zerebraler Ischämie	65
6. Zusammenfassung.....	68
7. Literaturverzeichnis.....	70

Verzeichnis der Abkürzungen und Anglismen

A	Adenin
<i>Abundance</i>	Menge
AMPA	(±)- α -Amino-3-Hydroxyl-5-Methylisoxazol-4-Propionat
AMV-RT	Avian myeloblastosis Virus – Reverse Transkriptase
<i>annealing</i>	Anlagerung
<i>antisense</i>	antiparallel zur kodierenden Sequenz orientiert
ARNT	<i>Aryl Hydrocarbon Nuclear Tranlocator</i>
as	<i>antisense</i>
BFU-E	<i>Burst Forming Unit</i> -Erythroblast
BSS	<i>Basic salt solution</i> (=Ausgangssalzlösung)
C	Cytosin
<i>carrier</i>	Träger
CFU-E	<i>Colony Forming Unit</i> -Erythroblast
COX 2	Cyclooxygenase 2
DAS	<i>desoxygenated aglycemic solution</i> (=desoxygenierte aglykämische Lösung)
DISC	<i>death inducing signaling complex</i> (=Zelltod induzierender Komplex)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFX	Desferrioxamin
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendiamin-Glykol-bis-(β -aminoethylether)-Tetraessigsäure
<i>elongation</i>	Verlängerung
Epo	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FWD	<i>forward</i> (=vorwärts)
G	Guanin
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i> (= Hypoxie induzierter Faktor)

<i>Housekeeping Gene</i>	Haushaltungs Gen (bzw. nicht reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen)
HRE	<i>hypoxia response element</i> (=Hypoxie-Antwort-Element)
HSP 70	Hitzeschockprotein 70
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i> (=Hemmstoff des Apoptoseproteins)
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> (induzierbare Nitrit-Oxid-Synthase)
JAK2	Janus Tyrosin Kinase 2
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MCAO	<i>Middle cerebral artery occlusion</i> (=Verschluß der A. cerebri media)
mg/kg/KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
M-MLV-RT	<i>moloney murine leukemia virus reverse transkriptase</i>
mRNA	<i>messenger</i> (=Boten) RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-kappaB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NOS	Nitrit-Oxid-Synthase
NO	Nitrit Oxid (=Stickstoffmonoxid)
OGD	Oxygen-Glucose Deprivation (= Entzug)
<i>outcome</i>	Ergebnis nach Therapieabschluß
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCD	<i>Programmed Cell Death</i> (=Programmierter Zelltod)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>Peak</i>	Gipfel
PI3-K	Phosphatidylinositol3-Kinase
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -Polymerase-Ketten-Reaktion
<i>Random Hexamers</i>	Primer aus sechs zufälligen Nukleotiden
Ras (-Oncogen)	<i>rat sarcoma</i> (-Oncogen) (=Ratten Sarkom-Onkogen)
<i>Real-time</i> -PCR	Echtzeit-PCR
REV	<i>reverse</i> (=rückwärts)
RH	<i>random hexamers</i>

RNAasin	Ribonucleaseinhibitor
rodAct F	<i>rodent actin forward primer</i>
rodAct R	<i>rodent actin reverse primer</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i> (=serielle Analyse der Genexpression)
se	<i>sense</i>
<i>sense</i>	parallel zur kodierenden Sequenz orientiert
sEpo-R	<i>soluble</i> (=löslicher) Erythropoietinrezeptor
<i>single step</i>	in einem Schritt
18SrRNA	18S ribosomale Ribonukleinsäure
STAT 5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i> (=Signalwandler und Aktivator der Transkription 5)
T	Thymin
TEMED	Tetramethyldiamin
<i>Template</i>	Vorlage, Schablone
tEpo-R	<i>truncated</i> (=gestutzt) Erythropoietinrezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAF	Tumornekrosefaktor assoziierter Faktor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (=vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Schlaganfall

1.1.1 Epidemiologie

Der Schlaganfall ist eine epidemiologisch bedeutsame Erkrankung, die Inzidenz pro Jahr liegt in Deutschland bei ungefähr 180 pro 100 000 Einwohnern und entspricht damit der Inzidenz in anderen westlichen Industrienationen (Kolominsky-Rabas und Heuschmann 2002). Der Schlaganfall ist nach wie vor die dritthäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen (zur Übersicht Meisel et al. 2003). Die Inzidenz des Schlaganfalls nimmt mit steigendem Alter zu (Hollander et al. 2003). Da sich die Alterspyramide in der westlichen Gesellschaft zunehmend zugunsten der älteren Bevölkerung verschiebt, wird dieses Krankheitsbild in Zukunft noch stärker in unser Blickfeld rücken.

1.1.2 Einteilung

Unter dem Begriff Schlaganfall wird kein einheitliches Krankheitsbild verstanden. Traditionell wurde die Einteilung nach dem zeitlichen Ablauf und der Lokalisation der Schädigung vorgenommen. Heute wird eine Einteilung aufgrund der zugrunde liegenden Pathogenese bevorzugt. Grundsätzlich kann zwischen globaler und fokaler Ischämie unterschieden werden. Die globale Ischämie ist in der Regel Folge eines temporären Herzstillstandes. Die durch eine Gefäßokklusion verursachte, fokale Ischämie stellt ungefähr 85% der klinischen Schlaganfälle dar, in 15% liegt eine primäre zerebrale Blutung als Ursache vor. Im Falle des ischämischen Hirninfarktes liegt größtenteils (80%) eine Makroangiopathie vor, diese kann thrombembolisch, autochton thrombotisch oder hämodynamisch entstehen. Mit einer Inzidenz von 30,2/100000 stellt die kardiale Embolie die häufigste aller Ursachen dar. In 20% der Fälle liegt eine Mikroangiopathie durch Mikroatherome oder Lipohyalinose vor (Adams et al. 1993, Caplan 2000, Poeck und Hacke 1998). Im nun folgenden Teil werde ich mich vornehmlich auf die fokale zerebrale Ischämie beziehen.

1.1.3 Pathomechanismen

1.1.3.1 Die Penumbra

Im ischämisch geschädigten Hirngewebe können zwei Areale abgegrenzt werden, die ischämisch geschädigte Kernzone und das subletal geschädigte Gewebe welches die Kernzone umgibt – die Penumbra (Astrup et al. 1981, Strong et al. 1983, Obrenovich 1995). In diesem Gebiet ist die Perfusion zwar stark reduziert, bei einer Durchblutung von 2-4 ml/g/min kann der Strukturstoffwechsel aber soweit aufrecht erhalten werden, dass noch kein irreversibler Schaden der Zellen entstanden ist (Hossmann 1994). In der Kernzone ist die Perfusion soweit gedrosselt, dass der Strukturstoffwechsel der Zellen nicht mehr gewährleistet werden kann, innerhalb von wenigen Stunden tritt die Nekrose ein. Die Penumbra ist von besonderem Interesse. Studien haben gezeigt, dass die Penumbra bis zu 50% der letztendlichen ischämischen Läsion ausmachen kann (Ginsberg 2003). Hier tritt in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren eine andere Art des Zelltods auf, die Apoptose, auch verzögerter Zelltod genannt. Die Apoptose (siehe unten) beginnt einige Stunden nach dem ischämischen Ereignis und hält über Tage an, sie unterscheidet sich von der Pannekrose in der ischämischen Kernzone. Die Penumbra ist somit ein interessantes Ziel für neuroprotektive Therapieansätze.

1.1.3.2 Die Schadenskaskade der zerebralen Ischämie

Durch die kritische Reduktion des zerebralen Blutflusses und damit der Substratzufuhr wird in dem ischämischen Gewebe eine Schadenskaskade angestoßen (Dirnagl et al. 1999 a).

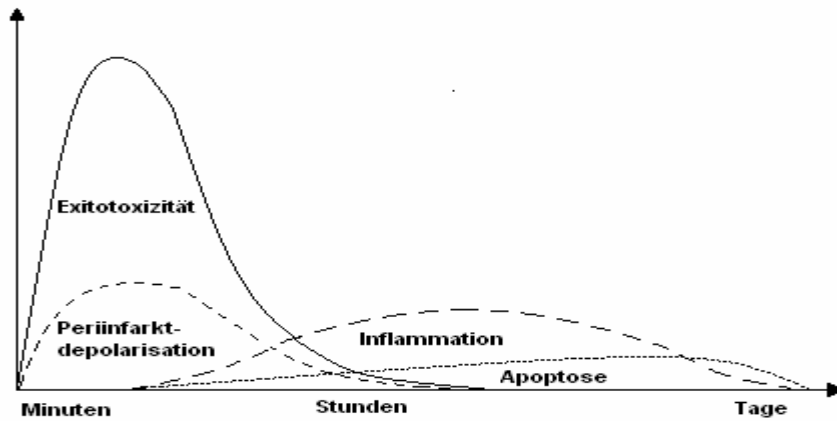


Abb. 1. Ischämische Schadenskaskade nach U.Dirnagl et al. (Trends Neuroscience, 1999 a)

Die Aufrechterhaltung des Membranpotentials ist ein energieabhängiger Prozeß, es kommt zum Erliegen energieabhängiger Ionenpumpen und konsekutiv zur Depolarisation von Neuronen und Gliazellen (Katsura et al. 1994). Wegen des Substratmangels ist auch die präsynaptische oder astrozytäre Wiederaufnahme von exzitatorischen Aminosäuren, v.a. Glutamat vermindert. Durch die Wirkung an den Glutamatrezeptoren kommt es zum Anstieg des intrazellulären Kalziumgehaltes. Da in der Initialphase also eine autogene Übererregung von Neuronen und Gliazellen durch Glutamat vorliegt, wird diese Phase „exitotoxische“ Phase genannt (zur Übersicht Dirnagl et al. 1999 b).

Als Folge der intrazellulären Kalziumakkumulation kommt es zur Induktion einer Vielzahl von Enzymsystemen. Durch die Aktivierung der Phospholipase A2 entstehen freie Sauerstoffradikale (Phillis und O'Regan 2004). Die aus den Abbauprodukten von Lipidmembranen entstehenden freien Fettsäuren werden durch die Xanthinoxidase und Cyclooxygenase ebenfalls zu Sauerstoffradikalen umgesetzt (Traystman et al. 1991). Eine weitere Quelle für diese hoch reagiblen Radikale sind Abbauprodukte der Adenosinphosphate, die in der eisenabhängigen Haber-Weiss-Reaktion umgesetzt werden (Schmidley 1990). Durch die Wirkung der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Nitrit-Oxid-Synthase wird Stickoxid gebildet, dieses wird mit freien Sauerstoffradikalen zum hoch reagiblen Peroxinitritradikal verstoffwechselt (Dalkara und Moskowitz 1994). Freie Radikale können theoretisch mit jedem Zellbestandteil reagieren. Bei der Lipidperoxidation entstehen über die o.g. Cyclooxygenase 2- und Xanthinoxidase-Pfade weitere Radikale. Durch die freien

Radikale werden die Zellen weiter geschädigt, so dass Glutamat freigesetzt wird. Es kommt zur Entstehung eines „Circulus vitiosus“. Freie Sauerstoffradikale sind zudem potente Signalmoleküle die Inflammation und Apoptose auslösen (zur Übersicht Dirnagl et al. 1999). Wie oben ausgeführt kommt es aufgrund des Mangels an Energiezufuhr zu ischämischer und exzitotoxischer Depolarisation von Neuronen und Glia in der ischämischen Kernzone. Hier nimmt die Konzentration von Glutamat und Kalium zu, durch Diffusion in die Penumbra wird auch hier die elektrochemische Depolarisation ausgelöst. In der Penumbra ist die Möglichkeit der Repolarisation zwar noch vorhanden, dies geht aber auf Kosten eines erhöhten Energieverbrauchs. Dadurch können vom Kern Depolarisationswellen generiert werden. Diese als Perinfarktdepolarisation bezeichneten Wellen treten mit einer Frequenz von 1-4 pro Stunde auf und führen zu einer weiteren Schadensamplifikation (Wolf et al. 1997).

Die kalziumabhängige Aktivierung von intrazellulären *Second-messenger* Systemen, der Anstieg freier Radikale und die Hypoxie selber lösen die Expression einer Reihe von inflammatorischen Genen über die Synthese von Transkriptionsfaktoren aus (zur Übersicht Dirnagl et al. 1999 a). Es kommt zu einer ausgeprägten Leukozyten-Endothel-Interaktion, zu der Transmigration von Leukozyten und Makrophagen in das Parenchym und führt zu der Aktivierung ortständiger Mikroglia. Durch die Aktivierung dieser Zellen und die nun folgende Zytokinproduktion erhält sich die inflammatorische Reaktion innerhalb der ersten Tage (Dirnagl et al. 1999 a).

Ischämisch geschädigte Hirnzellen können abhängig von der Intensität des Stimulus durch Nekrose oder Apoptose untergehen. Die Apoptose setzt einige Stunden nach dem ischämischen Schaden ein und hält über Tage an. Sie weist im Gegensatz zum häufig synonym gebrauchten programmierten Zelltod (PCD) obligat spezifische morphologische Kriterien auf (Membran-Blebbing, Chromatinkondensation, geschrumpftes Zytoplasma mit intakten Organellen, apoptotische Körperchen). Der PCD kann ohne diese Kriterien auftreten, die Apoptose wiederum kann als nicht programmierter Prozeß auftreten (Eastman 1993, Raff et al. 1993, Ueda et al. 1995). Die Apoptose kann auf verschiedenen Wegen, abhängig von der Dosis des jeweiligen Stimulus angestoßen werden. Einerseits kann die Apoptose auf einem intrinsischen Weg und hier vor allen Dingen mitochondrial angestoßen werden. Ein wichtiger Mediator sind reaktive Sauerstoffradikale (Buttke und Sandstrom 1994).

Durch die hypoxische Schädigung von Mitochondrien kommt es über eine als *Mitochondrial Transition Pore* bezeichnete Struktur (Gunter et al., 1994; Bernardi und Petronilli 1996) zu einem Ödem dieses Organells und es werden in Folge proapoptotische Moleküle freigesetzt (Sims und Anderson 2002). Der extrinsische Pfad wird z.B. durch Stimulation des Fas-Rezeptors angestoßen. Dieser formiert den DISC (*death inducing signaling complex*) welcher eine Caspase aktiviert. Caspasen können als Exekutoren des Zelltods proteolytisch Zellbestandteile spalten, außerdem werden dadurch u.a. pro- bzw. antiapoptotische Mitglieder der sogenannten bcl-2-Familie reguliert (Meisel et al. 2004, Yin und Schimke 1995).

1.2 Präkonditionierung

Präkonditionierung bezeichnet einen Mechanismus, bei dem die kurze Exposition eines Gewebes gegen eine Noxe zu einem toleranten Zustand gegen den schädigenden Stimulus führt. Zusätzlich kann eine Kreuztoleranz gebildet werden, hierbei kann eine Noxe Toleranz gegen einen Stress anderer Genese vermitteln (Chopp et al. 1989). Nahezu jeder schädigende Stimulus induziert eine endogene Neuroprotektion. Dieser Trigger kann u.a. eine fokale oder globale Ischämie sein, Hypoxie, Inflammation, Epilepsie, Spreading depression, freie Sauerstoffradikale sowie Hyper- und Hypothermie (Kitagawa et al. 1990, Stagliano et al. 1999, Prass et al. 2000, Zimmermann et al. 2001, Blondeau et al. 2002, Kobayashi et al. 1995, Wiegand et al. 1999, Chop et al. 1989, Nishio et al. 2000).

Wir können eine frühe und eine späte Form unterscheiden. Bei der frühen Präkonditionierung ist der Zustand der Toleranz schon nach kurzer Zeit erreicht, das heißt nach ca. 5-120 min. Hier sind Ionenkanal-, Rezeptor- und Proteinkinase-mechanismen beteiligt. Diese Form der Präkonditionierung wird auch als „klassisch“ bezeichnet, da sie zuerst beschrieben wurde. Die späte Toleranz ist nach ca. 24-72 Stunden erreicht, allerdings ist nach 7 Tagen kein weiterer protektiver Effekt mehr zu verzeichnen (Dirnagl et al. 2003, Steiger et al. 2007).

Die verzögerte oder späte Präkonditionierung kann in mehrere Phasen eingeteilt werden. In der Induktionsphase werden molekulare Sensoren wie Rezeptoren oder Ionenkanäle aktiviert. In der Transduktionsphase wird über Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren sowie autokrine oder parakrine Effektoren die Toleranzphase

vorbereitet. Die Effektoren wirken antiapoptotisch, antiinflammatorisch und antioxidativ. Die Toleranz ist also die Folge eines molekular induzierten Schutzes. Diese Hypothese wird unterstützt durch den Nachweis, dass weder ein erhöhter zerebraler Blutfluss noch eine verstärkte Glycolyse in dem Toleranzstadium gefunden wurde (Matsushima und Hakim 1995, Alkayed et al. 2002, Wiegand et al. 1999). Außerdem ist die Toleranzentwicklung von der Proteinsynthese abhängig (Burda et al. 2003).

Die Präkonditionierung wird vor allem in experimentellen Tier- und Zellkulturmodellen beschrieben und untersucht. Es gibt jedoch gute Hinweise, dass ein solches Phänomen auch beim Menschen existiert.

Die TIA (transitorische ischämische Attacke) ist definiert als fokale neurologische Funktionsstörung die innerhalb von 24 Stunden voll reversibel ist. Obwohl die TIA ein Risikofaktor für einen Schlaganfall darstellt (Sandercock et al. 1989), wurde gezeigt, dass eine vorangegangene TIA im Infarktgebiet bei dem betroffenen Patienten nach einem Schlaganfall zu einem geringeren Infarktvolumen und einem wesentlich geringeren neurologischen Defizit führt (Moncayo et al. 2000, Wegener et al. 2004, Weih et al. 1999, Weih et al. 2000). Dieses Phänomen impliziert eine klinische Einsatzmöglichkeit der Präkonditionierung, da das Therapiefenster für die etablierte therapeutische Intervention durch Thrombolysen bei dem akuten Schlaganfall mit 3 Stunden zeitlich limitiert ist (NINDS rt-PA stroke study group 1995). Die wiederholte Ischämie ist klinisch allerdings nicht praktikabel, so dass man nach pharmakotherapeutischen Ansätzen suchen muß. Es existieren Modelle, die Medikamente einschließen, die bereits im klinischen Gebrauch etabliert sind. Hierzu zählen z.B. Isofluran (Kapinya et al. 2002), ATP-abhängige Kaliumkanalöffner (Shimizu et al. 2002) sowie Desferrioxamin und Erythropoietin (Prass et al. 2002, Bernaudin et al. 2004). Es gibt Hinweise, dass Erythropoietin sowohl in vitro als auch in vivo protektiv ist (Ruscher et al. 2002, Brines et al. 2000, Sakanaka et al. 1998). Klinische Studien der Phase I und II legen nahe, dass Erythropoietin nicht nur sicher sondern auch wirksam in der Therapie des akuten Schlaganfalls ist (Ehrenreich et al. 2002).

Pharmaka, die Ischämietoleranz induzieren können, sind zudem ein vielversprechender Ansatz in Situationen in denen die Ischämie antizipiert werden

kann, wie z.B. Herzchirurgie oder Eingriffen an den Carotiden. Desferrioxamin ist ein Beispiel für einen solchen Ansatz.

1.3 Erythropoietin und der Erythropoietin-Rezeptor

1.3.1 Physiologische Aspekte Erythropoietins

Vor mehr als 100 Jahren wiesen Carnot und DeFlandre einen Anstieg peripherer Erythrozyten in normalen Kaninchen nach, indem sie diesen das Plasma anämischer Tiere injizierten. Hier war erstmals Erythropoietin zwar nicht benannt, aber in seiner Funktionsweise beschrieben worden (Carnot & DeFlandre 1906). Dieser humorale Botenstoff wurde von Bonsdorff und Jalavisto als Erythropoietin bezeichnet (Bonsdorff & Jalavisto 1948).

Im Jahre 1977 gelang es erstmals, Erythropoietin aus humanem Urin zu isolieren (Miyake et al. 1977). Dies führte zur Klonierung des Erythropoietingenes und zur Produktion rekombinanten Erythropoietins, was dann den Einsatz zur Behandlung der Anämie und der chronisch renalen Insuffizienz erlaubte (Lin et al. 1985, Jacobs et al. 1985, Eschbach et al. 1987).

Erythropoietin ist ein Glycopeptid mit einer Molekularmasse von 30,4 kDa (Beru et al. 1986). Es besteht nach posttranslationaler Modifikation aus 165 Aminosäuren, es ist glykosyliert, mit einem Kohlenhydratanteil von ca. 40%. Es weist eine sauerstoffverknüpfte und drei stickstoffverknüpfte Oligosaccharidketten auf (Bondurant et al. 1986, Koury et al. 1998). Diese Seitenketten sind entscheidend für die korrekte Funktion und den Export des Hormons (Delorme et al. 1992, Dube et al. 1988, Higuchi et al. 1992). Erythropoietin wird nach Bindung von freien Galaktoseresten in der Leber aus dem Kreislauf entfernt (Dordal et al. 1985). Der Serumspiegel von Erythropoietin liegt zwischen 1 und 27 $\mu\text{m}/\text{ml}$ (Mason-Garcia et al. 1990).

Die fetale Produktion des Hormons erfolgt in der Leber (Zanjani et al. 1977), der Wechsel zur Produktion in der Niere geschieht ungefähr 120-140 Tage *post conceptionem* und ist ca. 40 Tage *post partum* abgeschlossen (Zanjani et al. 1981).

Die Protein- und m-RNA-Konzentrationen Erythropoietins sind eng korreliert, dies spricht für eine vornehmlich transkriptionale Regulation des Hormons. Speicherorte für Erythropoietin sind nicht bekannt (Koury et al. 1989). Als Synthesezellen der Niere wurden die peritubulären, interstitiellen Zellen des Kapillarbettes identifiziert. In der Leber sind Hepatozyten, welche die Zentralvenen umgeben, der Produktionsort für Erythropoietin (Koury et al. 1991, La Combe et al. 1988). In niedrigerer Konzentration wurde Erythropoietin auch im ZNS gefunden, als Bildungsort wurden hier v.a. die Astrozyten identifiziert (Masuda et al. 1994). Des Weiteren fanden sich niedrige Level des Hormons in der Lunge, den Testes, der Plazenta und der Milz (Fandrey et al. 1993, Tan et al. 1991, Conrad et al. 1996).

Erythropoietin stimuliert die Bildung von Erythrozyten, indem Stammzellen der Hämatopoese zur Proliferation und Differenzierung angeregt wird. Hierzu bindet Erythropoietin im Knochenmark an den Erythropoietinrezeptor der BFU-Vorläuferzellen (*Burst Forming Unit*-Erythroblasten), stimuliert deren Übergang in die CFU-Erythroblasten (*Colony Forming Unit*-Erythroblasten) und beschleunigt deren Ausreifung (Koury et al. 1988). Die stärkste Wirkung scheint auf die CFU-Erythroblasten vorzuliegen, hier findet sich die höchste Anzahl der Epo-Rezeptoren (Sawyer und Koury 1987). Erythropoietin verhindert zudem die Apoptose der Vorläuferzellen und ermöglicht so die Ausreifung zum reifen Erythrozyten (Wu et al. 1995). Darüberhinaus besteht eine Stimulation von Megakaryozyten und eine zunehmende Proliferation von B-Lymphozyten durch Erythropoietin (Ishibashi et al. 1987, Kimata et al. 1991).

Die Erythropoietinproduktion ist auch im ZNS u.a. durch Hypoxie, Nickel oder Cobalt stimulierbar (Digicaylioglu et al. 1995, Marti et al. 1996). In der 3' flankierenden Region des Erythropoietingens wurde ein sogenanntes *hypoxia response element* (HRE) identifiziert (Blanchard et al. 1992, Pugh et al. 1994, Semenza et al. 1991). Bereits vor mehr als 10 Jahren wurde mit dem „Hypoxie-induzierbaren Faktor 1“ (HIF-1) der entscheidende Transkriptionsfaktor identifiziert, der das Erythropoietingens unter hypoxischen Bedingung transkriptionell aktiviert. HIF-1 ist ein DNA-Bindungsprotein, welches an einen Teil des EPO-3'HRE bindet und so die Erythropoietinbildung stimuliert (Semenza und Wang 1992). Auf diesen Faktor soll im Kapitel 1.4 detaillierter eingegangen werden.

1.3.2 Physiologische Aspekte des Erythropoietin-Rezeptors

Wie bereits erwähnt bindet Erythropoietin an Rezeptoren auf den Vorläuferzellen der Erythrozyten. Diese finden sich im Knochenmark, bzw. in der Milz. In niedrigerer Konzentration wurde der Erythropoietinrezeptor allerdings auch im ZNS gefunden (Liu et al. 1994, Liu et al. 1997). Der Rezeptor lässt sich während der Embryonalperiode im Bereich des Neuralrohres nachweisen. Spezifische Erythropoietinbindungsstellen wurden im Hirn der Maus im Bereich der Capsula interna, des Corpus callosum, der Zona incerta (Thalamus), des Hippocampus und des mamillothalamischen Traktes identifiziert (Digicaylioglu et al. 1995). Es handelt sich also um besonders hypoxieempfindliche Areale. Im Bereich des Hippocampus wird der Epo-R von den besonders ischämieempfindlichen CA1- Neuronen exprimiert (Morishita et al. 1997). Auch im Bereich der Kapillarendothelien wurden Bindungsstellen für Erythropoietin gefunden (Yamaji et al. 1996).

Der Erythropoietin-Rezeptors gehört zur Zytokin-Rezeptor-Familie und ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 66 -78 kDa. Der klassische für die Hämatopoese entscheidende Rezeptor existiert als Dimer (Livuah et al. 1999) mit einer extrazellulären, einer transmembranösen und einer intrazellulären Komponente. Von Leist et al. wurde für die neuroprotektiven Funktionen Erythropoietins ein heteromerischer Rezeptorkomplex verantwortlich gemacht, welcher mindestens eine EpoR-Kette enthält (Leist et al. 2004). Die Bindung von Erythropoietin an seinen Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung, welche für die JAK2-Aktivierung notwendig ist (Kubatzky et al. 2001). Diese Tyrosinkinase liegt im transmembranösen Bereich des EpoR vor, ist allerdings nicht rezeptorspezifisch (Youssoufian et al. 1993). Es kommt zu einer Aktivierung und Phosphorylierung der acht intrazellulär vorliegenden Tyrosinreste (Miura et al.1991), diese dienen nun als Bindungsstellen für Signaltransduktionsproteine.

1.3.3 Durch Erythropoietin vermittelte protektive Effekte im ZNS

Erythropoietin reguliert eine Vielzahl von neuronalen Zellfunktionen wie den Calciumeinstrom, die Membrandepolarisation, die Synthese von Neurotransmittern und das zelluläre Überleben (Konishi et al. 1993, Tabira et al. 1995).

So wurde nachgewiesen das Erythropoietin Neurone vor Glutamat vermittelter Toxizität schützt (Morishita et al. 1997). Die protektive Funktion des Hormons wurde sowohl bei globaler als auch bei fokaler zerebraler Ischämie gezeigt (Sadamoto et al. 1998, Sakanaka et al. 1998).

In kortikalen und hippocampalen Neuronen wurden protektive Effekte von Erythropoietin gezeigt, allerdings wurde Erythropoietin *vor* der jeweiligen Schädigung eingesetzt (Morishita et al. 1997, Sinor und Greenberg 2000). Brines et al. konnten durch die systemische Administration Erythropoietins *nach* MCAO die Infarktgrößen reduzieren, hier eröffnet sich eine klinische Option (Brines et al. 2000).

1.4 Der Hypoxie induzierbare Faktor 1 (HIF 1)

HIF 1 ist ein DNA-Bindungsprotein, es wurde in der wegbereitenden Arbeit von Wang und Semenza 1992 erstmals beschrieben. Es bindet an einen Teil der 3' flankierenden Promotorregion des Erythropoietingens und führt zur Epo-mRNA-Transkription. Neben Erythropoietin werden weitere durch Hypoxie induzierbare Gene induziert, als da wären u.a. der VEGF, die Häm-Oxygenase 1, Endothelin 1, der Insulin-Like Growth Factor 2 und eine Vielzahl an glycolytischen Enzymen und Transportproteinen (Gregg und Semenza 2000). Die Konzentration des HIF-1 α -Proteins sowie die HIF-1-Bindungsaktivität korreliert umgekehrt proportional mit der Sauerstoffspannung des Gewebes. Dieser Regulationsmechanismus ist nicht auf das ZNS begrenzt, HIF-1 ließ sich sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen und Ratten in einer Vielzahl von Organen nachweisen (Huang et al. 1997, Semenza et al. 1997, Wenger et al. 1996, Wiener et al. 1996).

Die Induktion des HIF-1 durch Hypoxie und Hypoglycämie ist belegt (u.a. Moley und Mueckler 2000, Bergeron et al. 1999). Interessanterweise sind auch Eisenchelatoren wie Desferrioxamin in der Lage HIF-1 zu aktivieren (Wang und Semenza 1993).

HIF ist ein Heterodimer, bestehend aus einer 120 kDa HIF-1 α - und einer 90 kDa HIF-1 β -Untereinheit (auch bekannt als der *Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator*= ARNT) (Wang et al. 1995, Wang und Semenza 1995). Während die α -Untereinheit

sauerstofflabil ist, wird die β -Untereinheit kontinuierlich gebildet (Huang et al. 1998). Hypoxie kann die Sauerstoffdegradierung von HIF-1 α unterbinden, indem die Assoziation mit dem von Hippel-Lindau Protein, dieses markiert HIF-1 α für die Proteolyse, geblockt wird (Maxwell et al. 1999). Der aktivierte Faktor HIF-1 α bildet mit HIF-1 β einen stabilen Komplex und dringt in den Zellkern ein. Dieser Komplex bindet an die bereits beschriebene Hypoxie-abhängige Region des Erythropoietingens und fördert somit dessen Transkription (Bunn et al. 1998). Die biologische Aktivität von HIF-1 wird durch die Expression und Aktivität der HIF-1 α -Untereinheit determiniert (Jiang et al. 1996, Jiang et al. 1997, Semenza et al. 1996). Die Interaktion zwischen HIF-1 α und dem VHL-Protein hängt von der Hydroxylierung spezifischer Prolinreste in der sauerstoffabhängigen Domäne von HIF-1 α ab (Ivan et al. 2001, Jaakkola et al. 2001). Diese Hydroxylierung wird durch HIF-spezifische Prolylhydroxylasen vermittelt. Diese benötigen Sauerstoff, 2-Oxoglutarat und Eisen als essentielle Kofaktoren (Bruick und McKnight 2001). Unter Hypoxie kommt es zum Sauerstoffmangel, den Prolylhydroxylasen wird somit ein essentieller Kofaktor entzogen. Desferrioxamin bindet Eisen was mit dem gleichen Effekt verbunden ist. Dadurch kann die Aktivierung von HIF durch Hypoxie aber auch durch Eisenchelatoren wie Desferrioxamin erklärt werden.

Die Expression von HIF-1 ist essentiell und ubiquitär, so wurde gezeigt, dass homozygote knock-out Mäuse, denen die entsprechenden Genabschnitte für die Untereinheiten dieses Faktors fehlen, im mittleren Gestationsalter sterben (Maltepe et al. 1997, Ryan et al. 1998).

HIF-1 scheint eine Schlüsselposition in der Toleranzentwicklung in vivo (Miller et al. 2001, Bernaudin et al. 2002) und in vitro (Ruscher et al. 1998, Siren et al. 2001) einzunehmen. Arbeiten jüngerer Datums machen allerdings HIF-2 α , eine Isoform des HIF-1 α , für die Erythropoietinregulation unter Hypoxie verantwortlich (Warnecke et al. 2004, Chavez et al. 2006).

1.5 Desferrioxamin (DFX)

Desferrioxamin ist ein Eisenchelator der bereits seit vielen Jahren im klinischen Einsatz etabliert ist. Die klinischen Indikationen für DFX sind die Eisenüberladung,

Hämosiderose oder Hämochromatose. DFX bindet als Chelator Eisen mit hoher Affinität und führt zu einer gesteigerten Eisenausscheidung im Urin (Brittenham et al. 1994).

Über die Induktion von HIF-1 durch DFX (Wang und Semenza 1993) scheint ein bedeutendes Bindungsglied zur Erythropoietin vermittelten Neuroprotektion zu bestehen. Wie bereits beschrieben ist Desferrioxamin in der Lage die Transkription des Erythropoietingens unter Normoxie zu stimulieren (Goldberg et al. 1988, Eheleben et al. 1997, Huang et al. 1997, Ho und Bunn 1996). Hierzu ist keine intrathekale Gabe des Eisenchelators notwendig, es besteht die Möglichkeit der systemischen Administration (Palmer et al. 1994).

Man geht heute davon aus, dass der DFX vermittelte Schutz über die Aktivierung von HIF-1 geschieht (Bergeron et al. 2000). Wie bereits ausgeführt, ahmt DFX den Effekt der Hypoxie durch eine Hemmung von Prolylhydroxylasen nach. Diese Enzyme benötigen Eisen als essentiellen Kofaktor, durch den Einsatz von DFX wird die Enzymaktivität durch eine sinkende Eisenkonzentration inhibiert, so dass der Abbau von HIF-1 α verhindert und die Menge des Transkriptionsfaktors erhöht wird (Sharp und Bernaudin 2004, Hamrick et al. 2005).

1.6 Herleitung einer Aufgabenstellung

Die dargestellten Daten legen nahe, dass Erythropoietin und sein Rezeptor nicht nur in hämatopoetischen Geweben eine Rolle spielt. Wir postulieren, dass ein präkonditionierender Stimulus, wie Hypoxie oder Desferrioxamin, eine HIF-1-Induktion bewirkt. Diese wird über die Bindung an den Promotor des Erythropoietingens zu einem Anstieg der mRNA-Expression führen und konsekutiv zu einer erhöhten Erythropoietinbildung und Vermittlung von Neuroprotektion.

In der hier vorgelegten Arbeit sollte sowohl in der Zellkultur als auch in Tiermodellen der Präkonditionierung, die Expression von Erythropoietin auf der mRNA-Ebene untersucht werden. Diese Expressionsstudien waren eingebettet in Versuche die protektive Effekte durch DFX und ischämische, bzw. hypoxische Präkonditionierung untersuchten, sie sind nicht Gegenstand meiner Arbeit.

- 1.) Es musste zunächst eine sensitive PCR-basierte quantitative bzw. semiquantitative Methode zum Nachweis der Erythropoietin-mRNA-Expression etabliert werden.
- 2.) Anschließend sollte geklärt werden, ob präkonditionierende Stimuli eine erhöhte Erythropoietin-mRNA-Expression im Tiermodell bzw. der Zellkultur induzieren.

2 Material

2.1 Tiere

Wistar Ratten, 280-320g Körpergewicht	BGVV, Berlin, BRD
Mäuse, 18-22g Körpergewicht	BGVV, Berlin, BRD

2.2. Gasgemisch

400ml/min mit 92% N ₂ , 8% O ₂	AGA, USA
--	----------

2.3 Geräte

Anaerobierkammer Concept 400	Ruskinn Ltd., GB
Flussmeter	Cole Parmer, Vernon Hills, USA
Sauerstoffelektrode	Licox, Hampshire, USA
Kühlzentrifuge 30 RF mit swing out Rotor	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, BRD
Photometer Dynatech MR5000	Dynateck, Denckendorf, BRD
Hybaid Thermocycler	Hybaid AGS, Heidelberg, BRD
Light Cycler 24	Roche, Mannheim, BRD
ALF Express™ DNA Sequencer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD

2.4 Zellkultur- und Bakterienkulturmedien, Puffer

Zellkulturmedien

PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	pH 7,2, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl	Life Technologies, Karlsruhe, BRD
DAS (<i>Desoxygenated aglycemic solution</i>)	1 M CaCl ₂ , 1 M NaHCO ₃ , 30 mM Glycin, 1 M HEPES, H ₂ O	Life Technologies, Karlsruhe, BRD
BSS (<i>Basic salt solution</i>)	1 M Glucose, 1 M CaCl ₂ , 1 M NaHCO ₃ , 30 mM Glycin, 1 M HEPES, H ₂ O	Life Technologies, Karlsruhe, BRD

Bakterienkulturmedium

LB-medium (Lurian-Bertani Medium)	10 g/l Trypton 10 g/l Natriumchlorid 5g/l Hefeextrakt	Sigma, Deisenhofen, BRD Sigma, Deisenhofen, BRD Sigma, Deisenhofen, BRD
-----------------------------------	---	---

Puffer zur Suspension der gewonnenen RNA

LoTE Puffer	3mM Tris 0,2 mM EDTA H ₂ O	Sigma, Deisenhofen, BRD Sigma, Deisenhofen, BRD
-------------	---	--

c-DNA-Synthesepuffer

<i>First strand buffer</i> (Erststrangpuffer)	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
---	----------------------------

PCR-Puffer für die semiquantitative RT-PCR

10fold PCR Puffer	Perkin Elmer, Wellesley, USA
-------------------	------------------------------

Elektrophoresepuffer

10xTBE-Puffer	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 0,2 M EDTA-Na ₂ x2 H ₂ O	Sigma, Deisenhofen, BRD Sigma, Deisenhofen, BRD Sigma, Deisenhofen, BRD
5xTBE-Puffer	0,445 M Borsäure 0,445 M Tris 0,1 M EDTA-Na ₂ x2 H ₂ O	Sigma, Deisenhofen, BRD Sigma, Deisenhofen, BRD Sigma, Deisenhofen, BRD

2.5 Kits

m-RNA Purifikation

MessageMaker Kit	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
------------------	----------------------------

Clonierung der Deletionsmutante

Topo TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
---------------------	---------------------------

Extraktion und Clonierung des DNA-Fragmentes

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Qiagen Tip 20	Qiagen, Hilden, BRD

Fast Start Reaction Mix für die quantitative Real-Time RT-PCR

1fach - Light Cycler Fast Start Master Hybridisation probes	Fast start Taq DNA-Polymerase Reaktionspuffer dNTP-Mix 10mM MgCl ₂	Roche, Mannheim, BRD
1fach – Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green	Fast start Taq DNA-Polymerase Reaktionspuffer dNTP-Mix SYBR Green I Farbe 10mM MgCl ₂	Roche, Mannheim, BRD
MgCl ₂ Lösung	25 mM Magnesiumchlorid	Roche, Mannheim, BRD

Basenmix für die Sequenzierung

Basenmix	Ph 9,5, 40 mM TrisHCl, 6 mM MgCl ₂ , 0,04% Triton X-100, , 0,08 mM 2-mercaptoethanol, 1,67 U/μl ThermoSequenase DNA Polymerase mit 2,8x10 ⁴ U/μl Thermoplasma acidophilum inorganic pyrophosphatase, 0,4mM dATP, 0,4mM dCTP, 0,4mM dTTP, 0,4mM 7-deaza-dGTP und in Addition das jeweilige Didesoxynucleotid in einer Konzentration von 1,33 μM)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD
----------	---	---

2.6 Enzyme

RNA-Reinigung

DNase	Promega, Madison, USA
-------	-----------------------

c-DNA-Synthese

RNAsin	Promega, Madison, USA
M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase)	Promega, Madison, USA

Semiquantitative RT-PCR

AmpliTag® Gold Polymerase	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Taq Polymerase	Perkin Elmer, Wellesley, USA

Linearisierung des Plasmids

Sal I	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
Bam H I	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD

2.7 DNA-Größenstandard

1 kb DNA-Leiter	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
-----------------	----------------------------

2.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Herstellung der Deletionsmutante für Erythropoietin

Forward Primer	5'-TACGTAGCCTCACTTCACTGC-3'
Linkerprimer	5'-AGCTCTGGGAAGTTCTTCTGGAGTGTCCGTAGGACAGGCCGG-3'

Oligonukleotide für die semiquantitative RT-PC

Epo fwd	5'-TACGTAGCCTCACTTCACTGC-3'	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD
Epo rev	5'-CY5-AGCTCTGGGAAGTTCTTCTGG-3'	
Act fwd	5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTTC-3'	MWG Biotech AG, Ebersberg, BRD
Act rev	5'-CY5-CTTAGGAGTTGGGGGTGGCT-3'	

Oligonukleotide für die quantitative Real Time RT-PCR

Epo se	5'-CGTAGCCTCACTTCACTGCTTCGG-3'	Tibmolbiol, Berlin, BRD
Epo as	5'-GGAGCTCTGGGAAGTTCTTCTGGG-3'	
rodAct F	5'-ACCCACACTGTGCCCATCTAA-3'	
rodAct R	5'-GCCACAGGATTCCATACCCAA-3'	

Hybridisationssonden für die quantitative Erythropoietin Real Time RT-PCR

Epo FL	5'-CAGCTTCAGTTTCCCCGGAGGAAGTT-fluorescein-3'	Tibmolbiol, Berlin, BRD
Epo LCU	5'-LC-Red 640-TAGACCAGGAAGAGCTTGCAGAAAGTATC Cp-3'	

Randomhexamers

RH	Roche, Mannheim, BRD
----	----------------------

Sequenzierung

Cy 5 M13 Reverse Primer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD
-------------------------	---

2.9 Chemikalien

Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
Agar Agar	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
Agarose	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ammoniumacetat	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, BRD
Chloroform	Sigma, Deisenhofen, BRD
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen, BRD
DFX (Desferrioxamin)	Sigma, Deisenhofen, BRD
dNTP-Gemisch (Desoxynucleotidtriphosphat)	Roche, Mannheim, BRD
DTT (Dithiothreitol)	Promega, Madison, USA
Ethanol	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ether	Hoechst AG, Frankfurt/Main, BRD
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, BRD
Glycogen	Roche, Mannheim, BRD
Harnstofflösung	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen, BRD
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
TEMED (Tetramethyldiamin)	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
Trizol	Gibco BRL, Eggenstein, BRD
X-Gal	Sigma, Deisenhofen, BRD

2.10 Software

ALFwin™ Software	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD
Light Cycler Relative Quantification Software	Roche, Mannheim, BRD

3 Methoden

3.1 RNA-Isolierung

3.1.1 RNA-Isolierung von präkonditionierten Tieren

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Tiermodelle untersucht, einerseits wurden Ratten mittels DFX präkonditioniert, andererseits wurden Mäuse, wie im folgenden Kapitel ausgeführt, hypoxisch präkonditioniert. Zusätzlich wurden Astrozytenkulturen untersucht, die ebenfalls hypoxisch präkonditioniert wurden.

Insgesamt wertete ich für die *kompetitive RT-PCR* drei Tierserien mit jeweils sieben Tieren aus. Es wurden Wistar Ratten verwendet. Diese Tiere wurden mit Desferrioxamin vorbehandelt. Sie erhielten 300mg/kg Körpergewicht DFX intraperitoneal appliziert und zwar 2h/4h/12h/24h/72h und 144h vor der RNA-Isolation. Zusätzlich gehörte zu jeder Tierserie ein Kontrolltier, welches nur mit äquivalenten Mengen isotoner Kochsalzlösung vorbehandelt wurde.

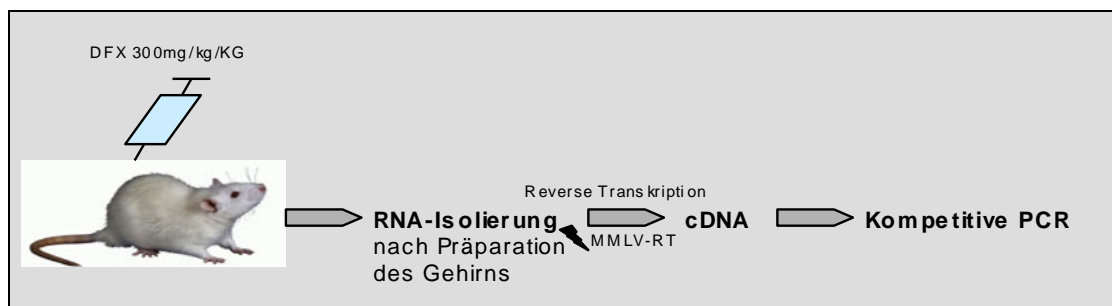


Abb. 2. Schematische Darstellung der RNA-Isolierung nach Präkonditionierung mit DFX, RNA-Isolierung und semiquantitativer, kompetitiver RT-PCR

Für die *quantitativen RT-PCR* Experimente wurden Mäuse verwendet. Diese Tiere wurden standardisiert hypoxisch präkonditioniert, indem sie für 2 Stunden in einen luftdicht abgeschlossenen Behälter verbracht wurden (maximal 6 Mäuse pro Prozedur), dieser wurde mit einem Gasgemisch von 400 ml/min bestehend aus 92% Stickstoff und 8% Sauerstoff geflutet. Die Hypoxiekammer wies ein Volumen von 3000 ml auf, die Temperatur wurde konstant bei 21°C gehalten. Für die Kontrolle

wurde die Kammer unter gleichen Bedingungen mit Raumluft der gleichen Flussrate geflutet. Die RNA-Isolierung erfolgte 1h/4h/12h/17h/48h/72h nach o.g. Präkonditionierung.

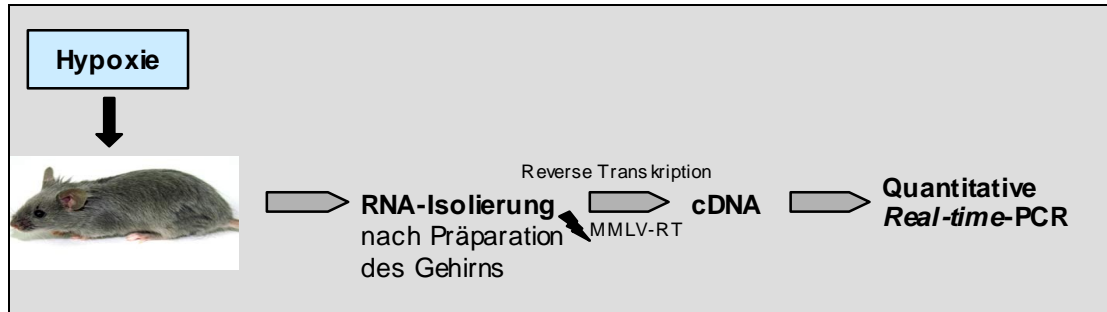


Abb. 3. Schematische Darstellung der RNA-Isolierung nach hypoxischer Präkonditionierung, RNA-Isolierung, reverser Transkription und quantitativer *Real-time-PCR*

Die Tiere wurden mit Ether narkotisiert und anschließend durch die intrakardiale Gabe von Kaliumchlorid getötet. Der Präparation des Gehirns ging die Dekapitation mit einer Mini Guillotine voran. Anschließend wurde das Material in Trizol und Glycogen aufgenommen und in dieser Lösung mechanisch mittels eines Glashomogenisators homogenisiert.

3.1.1.1 Aktenzeichen und behördliche Genehmigung der Tierversuche

Das Aktenzeichen für die Tierversuche lautet G 0285/00, die behördliche Genehmigung wurde am 27.03.2001 durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales erteilt.

3.1.2 RNA-Isolierung aus hypoxisch präkonditionierten Astrozyten

Die Experimente wurden außerdem mit Astrozytenkulturen durchgeführt. Hierzu erfolgte die Präparation zerebellärer Astrozyten von 6-9 Tage alten Wistarratten nach einer modifizierten Methode nach McCarthy und de Vellis (1980). Es erfolgte die Präkonditionierung mittels OGD-Induktion. Hierzu wurden die Kulturen mit PBS-Medium ausgewaschen und dieses durch DAS-Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellkulturen für 180 min in eine hypoxische Umgebung gebracht (1% Oxygenierung). Auch hier wurde die RNA-Aufbereitung in unterschiedlichen Abständen zur OGD-Vorbehandlung durchgeführt. Es erfolgte die RNA-Isolation

1h/2h/6h und 12h nach der Präkonditionierung. Es existierten Kontrollen die statt des DAS-Mediums mit BSS-Medium versetzt wurden und dann der Hypoxie ausgesetzt waren und zwei Kontrollen die zwar mit DAS- oder BSS-Medium behandelt wurden aber keiner Hypoxie ausgesetzt waren. Zur RNA-isolierung wurden 10^6 Zellen eingesetzt.

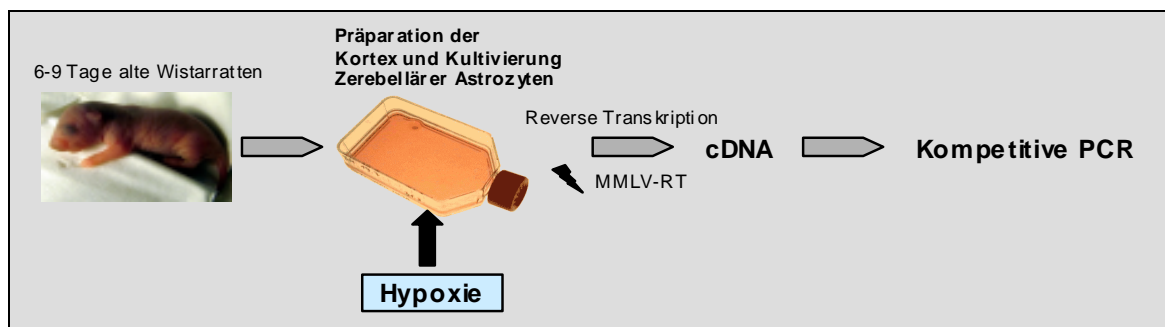


Abb. 4. Schematische Darstellung der Präparation und Kultivierung zerebellärer Astrozytenkulturen, RNA-Isolation nach hypoxischer Präkonditionierung und semiquantitativer, kompetitiver RT-PCR

3.1.3 Technik der RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde in einer jeweils modifizierten Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987) gewonnen. Hierzu wurde Trizolreagenz benutzt. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin Isothiocyanat. Während der Homogenisation und Lyse erhält das Trizol die Integrität der enthaltenen RNA. Guanidin ist ein bekannter Inhibitor von Ribonucleasen (Cox, 1968). Es wird außerdem Glycogen zugesetzt, dieses ist ein Zusatz bei Fällung von Nucleinsäuren, es kann als inertes Material die sonst als *Carrier* (Träger) verwendeten tRNAs ersetzen (Tracy 1981, Helms et al. 1985) Anschließend wird der nach Zentrifugation gewonnene Überstand mit Chloroform versetzt. Es zeigt sich wiederum nach Zentrifugation ein wässrige und eine organische Phase. Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase, die DNA und Proteine in der Inter- und Phenolphase enthalten. Der wässrige Überstand wird mit Isoamylalkohol versetzt. Hierdurch erfolgt die Präzipitation der enthaltenen RNA.

Das gewonnene Pellet wird mit Ethanol gewaschen und kann nach Lufttrocknung in ribonucleasefreies Wasser oder Lösungen aufgenommen werden. Diese werden mit DEPC behandeltem autoklaviertem Wasser hergestellt.

Protokoll der RNA-Präparation

- Aufnahme des Materials in 8ml Trizol, unter Zusatz von 12 µl Glycogen homogenisiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert
- jeweils 1 ml des Homogenisat zentrifugiert (15 min, 12000g, 4°C)
- Überstand mit 0,2 ml Chloroform gemixt, bei Raumtemperatur für 2-3min inkubiert, zentrifugiert (15 min, 12000g, 4°C)
- Überstand mit 0,5ml Isopropanol versetzt, Inkubation 10 min bei Raumtemperatur, zentrifugiert (15 min, 12000g, 4°C)
- durch Präzipitation gewonnenes, RNA-haltiges Pellet mehrmals mit 75%igem Ethanol waschen, anschließend in 50µl ribonucleasefreiem Wasser oder in LoTE-Puffer aufnehmen
- Lagerung bei -70°C

3.1.4 RNA-Reinigung

Um verunreinigende, genomische DNA zu entfernen, inkubierten wir die gewonnene Lösung mit dem RNase-freien Enzym DNase. Wir überprüften die Integrität der gewonnenen Gesamt-RNA mittels der Gelelektrophorese auf einem 1,0% mit Ethidiumbromid vorbehandeltem Agarosegel .

3.1.5 Quantifizierung der RNA-Menge

Die Quantität der gewonnenen Gesamt-RNA bestimmten wir mittels fotometrischer Messungen. Es wurden Messungen bei 260 nm durchgeführt. Hierzu ergab sich die Konzentration der RNA aus der Formel:

$$\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{OD } 260$$

Zusätzlich ergab die 260/280nm Ratio eine Aussage über die Kontamination mit Proteinen. Diese Ratio lag regelmäßig in optimalen Bereichen größer 1.

3.2 mRNA- Purifikation

Lediglich optional war die Möglichkeit zunächst mRNA zu isolieren, und anschließend die cDNA Herstellung entsprechend des u.g. Protokolls durchzuführen. Die Purifikation der mRNA wurde mit einem kommerziellen Kit (Messagemaker Kit, Gibco/BRL) durchgeführt. Der Anteil der mRNA an der Gesamtmenge beläuft sich auf 2-5%. Die Gesamt-RNA wurde zunächst mittels der photometrischen Konzentrationsbestimmung auf Mengen zwischen 0,2 und 2mg eingestellt, optimal waren Konzentrationen unter 0,55 µg/µl. Anschließend erfolgt die Denaturierung bei 65°C und die Zugabe von Natriumchlorid, hiedurch werden effektiv Ribonucleasen deaktiviert (Maniatis et al. 1989). Die so deproteinisierte und ribonucleasefreie RNA wird fraktioniert durch die Bindung an eine oligo(dT)-Cellulose-Suspension. Zellulose bindet mRNA am spezifischen Poly-A-Ende, die zugegebenen Oligo(dT) dienen als Primer (Aviv und Leder, 1972).

mRNA Purifikation mit dem Messagemaker Kit (Gibco/BRL)

- Gesamt-RNA auf eine Menge zwischen 0,2 und 2 mg, sowie die optimale Konzentration auf 0,55 µg/µl einstellen
- Zugabe von 0,1 Vol. 5 M Natriumchlorid (Endkonzentration 0,5M NaCl)
- Zugabe der entsprechenden Menge Oligo (dT) (<200 µg Gesamt-RNA: 200µl Oligo (dT)-Lösung, 0,5-1 mg Gesamt-RNA: 1 ml Oligo (dT-Lösung)
- 10 min auf 37°C erhitzen, filtern
- zweimalig mit Puffer waschen, vorsichtig die Zellulose suspendieren
- Zellulose in destilliertem, auf 65°C vorgeheiztem Wasser resuspendieren
- für 2-3 min zentrifugieren (4°C, >2600 g)
- optional: anschließende Konzentrierung der mRNA (im Überstand)
- Zugabe von 50 µg Glycogen als *Carrier*
- 0,1 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat zugeben
- -2 Vol. Ethanol absolut (-20°C) zugeben, über Nacht bei -20°C inkubieren
- 30min zentrifugieren (4°C, >2600 g), gewonnenes Pellet mit 75% Ethanol fällen
- Pellet in 50 µl ribonucleasefreiem Wasser oder in LoTE-Puffer aufnehmen

Anschließend erfolgt die photometrische Konzentrationsbestimmung bei 260 nm wie oben beschrieben.

3.3 cDNA-Synthese

3.3.1 Prinzipien und Technik der cDNA Synthese

Zur cDNA Herstellung wurde die gewonnene RNA in einem Reaktionsgemisch mit Random Hexamers, Nucleotidtriphosphaten und der *Moloney Murine Leukemia Virus* Reverse Transkriptase versetzt. Die Bedingungen für die cDNA Herstellung mittels dieses Enzyms wurde erstmals durch Gerard 1985 beschrieben. Die M-MLV-Reverse Transkriptase verfügt über eine eigene RNase H -Aktivität (Gerard 1981). Im ersten Schritt erfolgt bei 21°C das *Annealing* der Random Hexamers, danach bei 37°C die *Elongation* und anschließend bei 95°C die Denaturierung. Die so gewonnene cDNA wird mittels einer Fällung durch ein Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-gemisch extrahiert. Das Pellet kann nach mehreren Waschschrinen mit Ethanol in in 50 µl ribonucleasefreiem Wasser oder in LoTE-Puffer aufgenommen werden.

Protokoll der c-DNA Synthese (Erststrang)

1-5 µg RNA (verdaut und gereinigt)	15 µl
5 x Erststrang Puffer	5 µl
10 mM dNTP Mix (2,5 mM jeweils)	1,5 µl
50 µg/ml Random Hexamers	1,5 µl
10 mM DTT	0,5 µl
40 U/µl RNAsin, Ribonucleaseinhibitor (Promega)	0,5 µl
<u>DEPC behandeltes H₂O</u>	<u>25,5 µl</u>
Gesamtvolumen	47,5 µl

- Bestandteile für 2 min auf 65°C erhitzen, sofort auf 0°C kühlen
- Zugabe von 2,5 µl M-MLV-Reverse Transkriptase (200U/µl)
- Gemisch für 5 min auf 21°C, für 1h auf 37°C erhitzen
- abschließend Denaturierung bei 95°C für 5 min
- Fällung der cDNA mittels eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (Mischung 25:24:1)
- wässrige Phase mit Glycogen, 10 M Ammoniumacetat und 100%igem Alkohol versetzen, über Nacht bei -70°C präzipitiert
- zweimalige Waschung des gewonnenen Pellets mit 75%igem Ethanol,
- Lösung in LoTE-Puffer.
- Aufbewahrung der cDNA bei -20°C

3.3.2 Quantifizierung der gewonnenen cDNA-Menge

Die Quantität der gewonnenen Einzelstrang-cDNA bestimmten wir mittels fotometrischer Messungen. Es wurden Messungen bei 260 nm durchgeführt. Hierzu ergab sich die Konzentration der cDNA aus der Formel:

$$\text{cDNA } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Verdünnungsfaktor} \times 30 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{OD } 260$$

3.4 Die semiquantitative kompetitive RT-PCR

Die PCR wurde erstmals 1983 von Mullis beschrieben, er entwickelte ein Verfahren das DNA durch wiederholte Verdoppelung in mehreren Zyklen mittels der DNA-Polymerase vervielfältigt. Die PCR ist eine hoch sensitive und spezifische Methode um DNA -Fragmente nachzuweisen und zu quantifizieren (Saiki et al. 1985).

Die klassische Polymerasekettenreaktion besteht aus 3 Schritten, die sich in ihrem Ablauf zyklisch wiederholen. Ein Zyklus beginnt mit der *Denaturierung* des doppelsträngig vorliegenden DNA-Moleküls, welches die zu amplifizierende Sequenz enthält. Der zweite Schritt umfasst das *Annealing* der *Primer*, hierbei werden die Einzelstränge mit kurzen spezifischen Oligonukleotiden hybridisiert, die als Starter der DNA-Synthese dienen. In Gegenwart der Taq-DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs kommt es zur Polymerisationsreaktion, der eigentlichen Verlängerung der

hybridisierten *Primer* in 5` - 3` - Richtung mit Synthese eines neuen DNA-Stranges, dieser Schritt wird auch als *Elongation* bezeichnet.

Im Gegensatz zur klassischen PCR wird bei der RT-PCR, wie bereits dargestellt, zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus isolierter mRNA eine einzelsträngige komplementäre DNA synthetisiert (cDNA), diese wird als *Template* in der PCR eingesetzt.

Die Ergebnisse der RNA-Präparation und die Effizienz der reversen Transkription können zwischen 70-100% differieren (Orlando et al. 1998). Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, ist es sinnvoll einen internen Standard mitzuführen (Coutlé et al, 1995). In der vorliegenden Arbeit wird dieser Standard durch β -Actin repräsentiert, dieses ist ein etabliertes *Houskeeping-Gen*. Derartige Gene eignen sich als Referenzgene, da sie weitestgehend konstant und in identischen Mengen in allen Geweben und in jedem Zellstadium exprimiert werden.

Zusätzlich wird ein externer Standard mitgeführt, um die Quantifizierung der PCR-produkte zu ermöglichen (Ferre 1992, Clementi et al. 1993, Foley et al. 1993). Dieser Standard enthält bei gleicher Sequenz eine interne Deletion und ist somit vom Targetgen elektrophoretisch abzutrennen (Celi et al. 1993, Förster 1994). Der Deletionsstandard wird im gleichen Reaktionsgefäß wie das Targetgen koamplifiziert, er unterliegt also der gleichen PCR-Effizienz. Somit kann bei bekannter Ausgangskonzentration des Deletionsstandards eine relative Bestimmung der Ausgangsmenge des Targetgens erfolgen.

3.4.1 Die kompetitive RT-PCR von Epo RNA

3.4.1.1 Generierung des Erythropoietin-Deletionsfragment als Standard

Deletionsfragmente enthalten ein genspezifisches „Insert“ (subklonierte Sequenz). Durch Entfernung von mehreren Basen in der Insertsequenz unterscheiden sich diese gegenüber der genspezifischen Ursprungssequenz. Die Deletion wird so gewählt, dass der Deletionsstandard und das Targetgen die gleichen Primerbindungsstellen aufweisen. Durch die unterschiedliche Länge der DNA-

Fragmente können diese durch ihr unterschiedliches Laufverhalten im elektrischen Feld nach Auftragen auf ein Gel differenziert werden.

Das Deletionsfragment für Erythropoietin wurde mit der Technik von Förster et al. generiert (Förster et al. 1994). Hierzu wird eine Linkerprimer-PCR durchgeführt. Als *Template* dieser PCR dient das Produkt einer Standard-PCR, die mit dem *sense* Primer Epo fwd und dem *antisense* Primer Epo rev durchgeführt wird. Als Primer für die Linkerprimer-PCR wird wieder der *sense* Primer Epo fwd eingesetzt, als *antisense* Primer wird, wie in Abb. 5 schematisch dargestellt, ein Linkerprimer eingesetzt. Dieser umfasst eine Deletion von 21 bp. Der gewonnene Deletionsstandard ist also 21 bp kürzer als das gesuchte Erythropoietinfragment. Die Sequenz des Linkerprimers ist dabei so gewählt, dass sein 3'-Bereich komplementär zu einem Teil der Wildtypsequenz ist, während sein 5'-Bereich Komplementarität zu einem Teil des *antisense* Primers Epo rev aufweist. In einer 3. PCR mit den *sense* und *antisense* Primern Epo fwd und Epo rev wird so eine Deletionsstandard hergestellt, der die gleichen Primerbindungsstellen wie das Targetgen aufweist, um die kompetitive PCR zu ermöglichen. Die Differenz der Amplifikatlänge zwischen Deletionsfragment und Wildtyp wurde auf einem 1%igen Agarosegel verifiziert. Das Fragment wurde dann, wie im Kapitel 3.7 erläutert, in einen pCRII-Vektor kloniert. Die Ligation und Transformation erfolgte mit Hilfe des TA- Cloning Kits (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers. Das resultierende Plasmid wurde mittels der Enzyme BamHI und Sac II linearisiert (Freyer et al. 1999) und anschließend erfolgte die Plasmidpräparation mit dem Qiagen Tip 20 (Quiagen) ebenfalls nach einem Protokoll des Herstellers. Konzentration und Reinheit der DNA wurden photometrisch ermittelt. Durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm konnte die Konzentration der DNA mittels der folgenden Formel ermittelt werden.

$$\text{DNA } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{OD } 260$$

Die Identifikation des Deletionsfragments erfolgte durch die Sequenzierung mit Hilfe der *Cycle Sequencing* Methode (Amersham Life Science, England) nach Sanger. Diese wird im Kapitel 3.7 beschrieben. Anschließend wurde die ermittelte

Nukleotidsequenz mit der publizierten cDNA Sequenz verglichen und mittels des Programmes „BLAST“ (National Centers for Biotechnology) verifiziert.

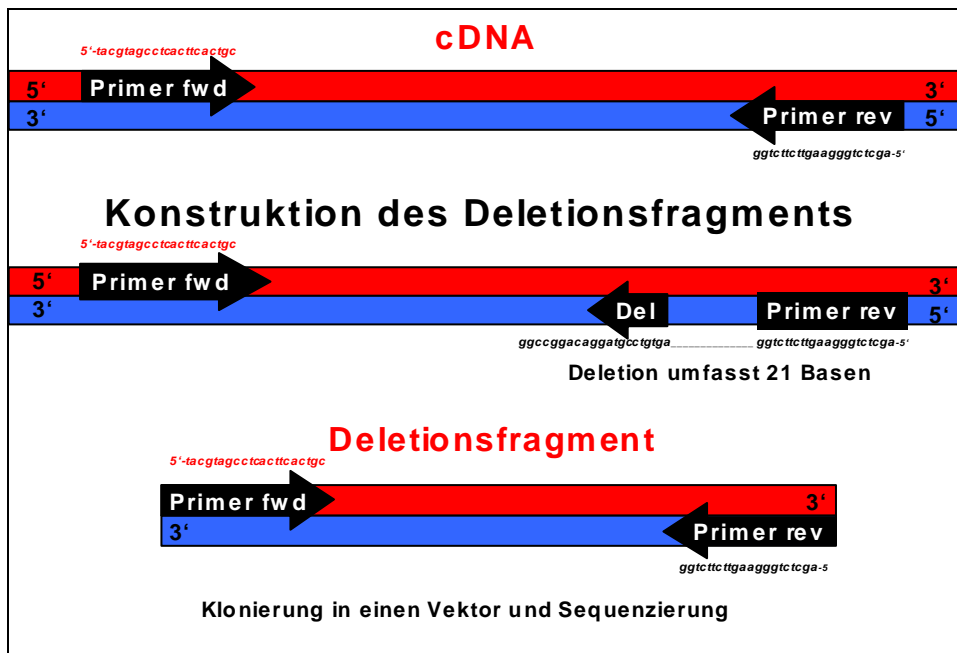


Abb. 5. Schematische Darstellung der Generierung eines Deletionsfragment als Standard.

3.4.1.2 Bedingungen für die kompetitive Erythropoietin RT-PCR

Die Detektion der PCR-Produkte mit dem DNA-Laser-Sequencer (ALF-Express, *Automatic Laser fluorescent DNA sequencer*) wurde durch die Markierung des *antisense Primers* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy 5 ermöglicht.

Die Nucleotidkonzentration der dNTP-Lösung lag bei 10 mM. Vor Gebrauch wurde dieser im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt, so dass letztendlich die Konzentration bei 2,5 mM lag. Die dNTP Mischung musste von jedem Nukleotid die gleiche Konzentration enthalten, da es sonst zu einer Missinkorporation durch die DNA Polymerase kommen würde.

Mastermix für die Erythropoeitin-Kompetitiv-PCR

10fold PCR Puffer	5	µl
1,5 mM MgCl ₂	3	µl
0,25 mM dNTP-Gemisch	5	µl
0,25 µM Epo fwd Primer	0,5	µl
0,25 µM Epo rev Primer 5-CY	0,5	µl
2,5 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase	0,5	µl
c-DNA	10	µl
Deletionsstandard (verdünnt 1:10)	10	µl
H ₂ O	15,5	µl
Gesamtvolumen	50	µl

Cycler-Bedingungen für die Erythropoietin-Kompetitiv-PCR

95°C	5 min	Aktivierungsschritt für die Taq-DNA Polymerase / Denaturation	40 Zyklen
65°C	1 min	Annealing	
72°C	1 min	Elongation	
95°C	1 min	Denaturation	
4°C	∞	Kühlung	

Länge des entstehenden PCR-produktes: 371 bp

3.4.2 Die kompetitive RT-PCR von β -Actin RNA

3.4.2.1 Generierung des β -Actin-Deletionsfragment als Standard

Das Deletionsfragment für β -Actin wurde wie bei Siegling et al. (1994) beschrieben hergestellt und war 601 bp lang. Die Methodik wurde bereits in Kapitel 3.4.1.1 am Beispiel des Deletionsfragmentes für Erythropoietin erläutert. Auch hier erfolgte die Identifikation des Deletionsfragments durch die Sequenzierung mit Hilfe der *Cycle Sequencing* Methode (Amersham Life Science, England) nach Sanger (Sanger und Coulson 1975) wie im Kapitel 3.7 erläutert, anschließend wurde die ermittelte Nukleotidsequenz mit der publizierten cDNA Sequenz verglichen und mittels des Programmes „BLAST“ (National Centers for Biotechnology) verifiziert.

3.4.2.2 Bedingungen für die β -Actin-RT-PCR

Auch in diesem Falle war der *antisense* Primer mittels Cy5 markiert (vergleiche Kap. 3.4.1.2).

Mastermix für die β Actin-Kompetitiv-PCR

10fold PCR Puffer	5 μ l
2,0 mM MgCl ₂	4 μ l
0,25 mM dNTP-Gemisch	5 μ l
0,25 μ M Act fwd Primer	0,5 μ l
0,25 μ M Act rev Primer 5-CY	0,5 μ l
2,5 U Taq DNA Polymerase	0,5 μ l
c-DNA	10 μ l
Deletionsstandard (verdünnt 1:10)	10 μ l
H ₂ O	14,5 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l

PCR-Bedingungen für die β -Actin-Kompetitiv-PCR

95°C	5 min	Denaturation	33 Zyklen
68°C	1 min	Annealing	
72°C	1 min	Elongation	
95°C	1 min	Denaturation	
4°C	∞	Kühlung	

Länge des entstehenden PCR-produktes: 753 bp

3.5 Quantifizierung der PCR-Produkte

Zur Quantifizierung der gewonnenen PCR-Produkte bestehen mehrere Möglichkeiten. Eine sehr gebräuchliche Methode besteht darin, die Gelelektrophorese zu nutzen. Hierzu wird ein 1%iges Agarosegel hergestellt und die DNA-Banden mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Im Vergleich mit einer 1 kb DNA-Leiter kann die Größe des gewonnenen Fragments bestimmt werden.

1%iges Agarosegel

1 g Agarose
5 μ l Ethidiumbromid
100 ml 10xTBE-Puffer
0,89 M Borsäure
0,89 M Tris
0,2 M EDTA- $\text{Na}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

Wesentlich eleganter und sensitiver ist die Möglichkeit fluoreszenzmarkierte Primer zu verwenden (Wang et al. 1989, Arnold et al. 1992). Es wurde zu diesem Zweck ein 5%iges nicht denaturierendes Polyacrylamidgel hergestellt.

Nicht denaturierendes 5%iges Polyacrylamidgel

6 ml 50%iges Acrylamid
25,5 ml H_2O
8 ml 5xTBE-Puffer
0,445 M Borsäure
0,445 M Tris
0,1 M EDTA- $\text{Na}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
300 μ l 10%iges Ammoniumpersulfat
15 μ l TEMED (1:1000 verdünnt)

Das PCR-Produkt wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die CY5 markierten Banden der gesuchten c-DNA und des bekannten Deletionsstandards wie bei Freyer et al. 1999 beschrieben, durch die Messung der Fluoreszenz mittels eines DNA-Laser-Sequencer (ALFexpressTM DNA Sequencer) detektiert. Die Banden der gesuchten cDNA und des Deletionsstandards wurden aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens im Gel differenziert und dann mittels der ALFwin software quantifiziert (ALF winTM, Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Auswertung der Daten erfolgte wie bei Bouaboula et al. 1992 dargestellt. Durch die Auswertung der PCR mittels des ALFexpress DNA sequencer erhält man wie oben beschrieben Werte des Amplifikats der gesuchten c-DNA (A_t) sowie des Amplifikats des Deletionsstandard (A_s) jeweils repräsentiert durch die Peak Area. Da die initiale Konzentration der Deletionsmutante (N_{0s}) bekannt ist, kann man entsprechend folgender Funktion die initiale Menge der gesuchten c-DNA bestimmen. Der natürliche Logarithmus (\log) (A_t/A_s) wird als Funktion des \log (N_{0s}) aufgetragen,

dann wurde diese lineare Funktion auf $\text{Log} (A_t/A_s) = 0$ interpoliert. An diesem Punkt muß das Verhältnis $A_t/A_s = 1/1$ betragen, denn der natürliche Logarithmus von $\log 1=0$. Das führt zu der gesuchten initialen Konzentration von Erythropoietin oder β Actin Konzentration in der Probe.

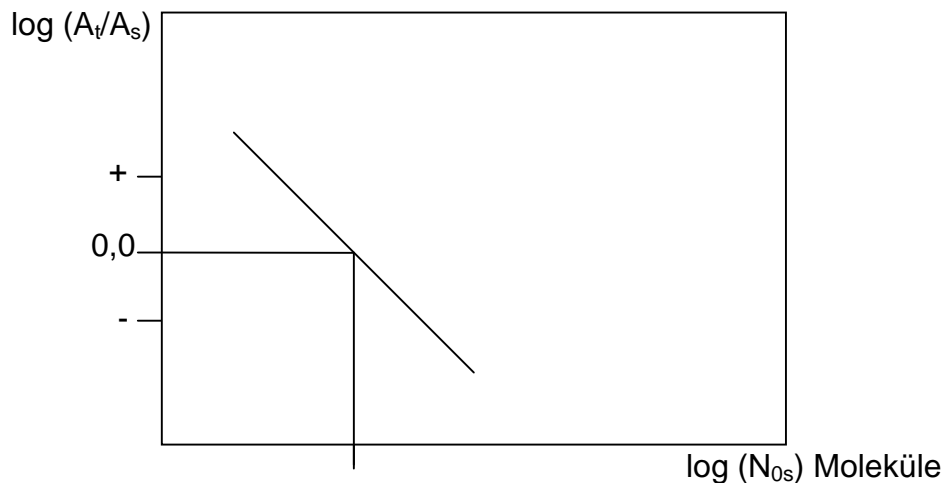


Abb. 6. Das Verhältnis des amplifizierten Targetgens zu dem amplifizierten Kompetitor ist aufgetragen als logarithmische Funktion zu dem Logarithmus der bekannten Ausgangskonzentration des Kompetitors und interpoliert auf 0 um in o.g. Weise die Menge des ursprünglich eingesetzten Targetgens, welches an dieser Stelle der Konzentration des Kompetitors entspricht zu ermitteln.

A_t - Amplifikat der gesuchten c-DNA

A_s - Amplifikat des Deletionsstandard

N_{0s} - initiale Konzentration des Deletionsstandard

3.6 Quantitative *Real Time* RT-PCR

3.6.1 Prinzipien der *Real Time* PCR

Im folgenden Abschnitt soll eine alternative Methode zur Quantifizierung der mRNA des Erythropoietingens dargestellt werden, diese Methode basiert auf der *Light Cycler Technology*. Durch die *Real Time* PCR mittels des *Light Cycler* ist es möglich Amplifikation und Detektion in einem Schritt durchzuführen. Auch hier wurde die Expression jeder Probe normiert auf der Basis des β -Actin mRNA Gehalts. Einerseits besteht diese Möglichkeit durch den Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green) und andererseits durch die Bindung von spezifischen Hybridizationssonden.

3.6.1.1 Quantitative *Real Time* PCR mittels der SYBR-Green-Methode

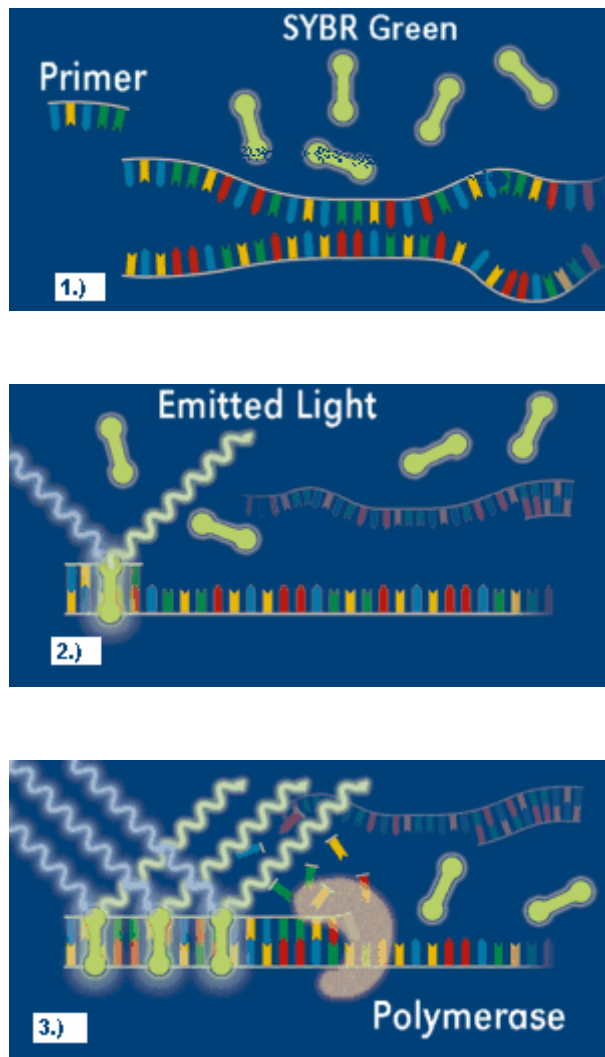


Abb. 7. Prinzipien der SYBR Green-DNA Interaktion

(Roche Applied Science LightCycler® Systems for Real-Time PCR)

- 1.) SYBR Green liegt zu Beginn der Amplifikation ungebunden vor.
- 2.) SYBR Green lagert sich in die „Minor Groove“ von doppelsträngiger DNA an.
- 3.) Durch diese Bindung wird die Fluoreszenz verstärkt und ab einer bestimmten Anzahl von doppelsträngigen Kopien meßbar.

SYBR Green lagert sich spezifisch in die sogenannte „Minor Groove“ von doppelsträngiger DNA an. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Als Reaktionsgefäße werden Glaskapillaren verwendet, die einerseits einen effektiven Wärmetransfer ermöglichen und gleichzeitig lichtdurchlässig sind. Am Ende der Elongationsphase jedes Zyklus wird die emittierte Fluoreszenz der Probe

nach Anregung durch blaues Licht bei 530 nm gemessen. Zur Quantifizierung der Proben wurde der Anstieg der Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenzahl aufgetragen und hieraus der so genannte *crossing point* bestimmt. Der *crossing point* ist die Zyklenzahl, an dem die Fluoreszenzintensität aus dem Hintergrund tritt. Dieses Verfahren wurde für die Detektion des *housekeeping* Gens β -Actin angewendet.

3.6.1.2 Quantitative *Real Time* PCR durch Bindung spezifischer Hybridisationssonden

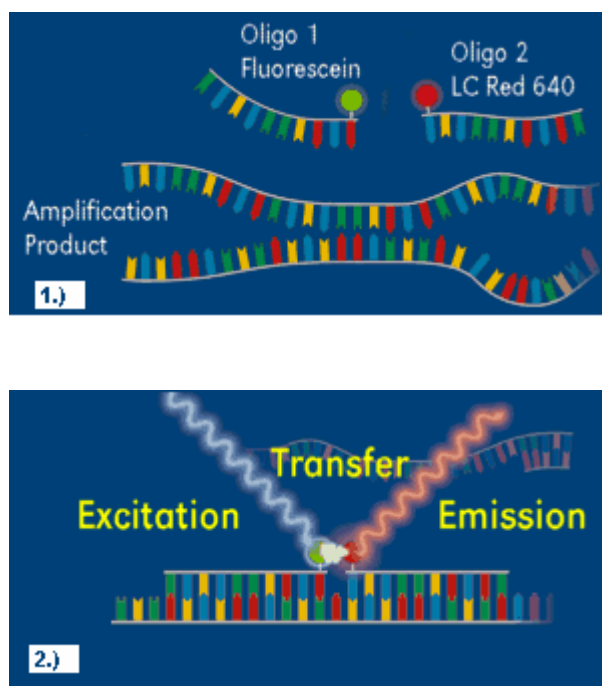


Abb. 8. Detektion der Hybridisationssonden durch FRET

(Roche Applied Science LightCycler® Systems for Real-Time PCR)

- 1.) Zu Beginn der Amplifikation liegen spezifische Hybridisationssonden ungebunden vor.
- 2.) Bei spezifischer Bindung der Hybridisationssonden kommt es zu einem Energieübertrag (FRET). In Abhängigkeit von der Anzahl der Amplifikate wird dieser als Signal messbar.

Hybridization Probes bestehen aus zwei verschiedenen Oligonukleotiden, die zu Sequenzen unseres gesuchten Fragments homolog sind. Diese Sequenz findet sich zwischen den Primern für die Erythropoietin-PCR. Eine Sonde ist am 5'-Ende mit einem Fluorochrom markiert, LC-Red 640. Die zweite Sonde ist am 3'-Ende mit einem Fluorescein markiert. Auch diese Oligonucleotide binden in der Annealingphase der PCR. Durch die spezifische Hybridisation kommen die Sonden

in unmittelbare räumliche Nähe, und es kommt zu einem Energietransfer (*Fluorescence resonance energy transfer = FRET*), der als emittierte Fluoreszenz durch den *Light cyclers* gemessen werden kann. Auch hier wird die Fluoreszenz nach jedem Zyklus bestimmt und in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration des gesuchten Fragments nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen sichtbar.

3.6.2 Bedingungen für die *Real Time* RT-PCR

Mastermix für die Erythropoietin *Real Time* RT-PCR

3,0 mM MgCl ₂	1,6 µl
1µM jeweils Epo Primergemisch	2 µl
0,2 µM Epo Hybridization Probe LC-Red 640	2 µl
0,2 µM Epo Hybridization Probe FL	2 µl
1fold - <i>Light Cyclers</i> – <i>Fast start Master Hybridization Probes</i>	2 µl
c-DNA	2 µl
H ₂ O	8,4 µl
Gesamtvolumen	20 µl

PCR-Bedingungen für die Erythropoietin *Real Time* RT-PCR

95°C	10 min	Aktivierungsschritt für die Taq-DNA Polymerase / Denaturation	
64°C	10 sec	Annealing	45 Zyklen
72°C	15 sec	Elongation	
95°C	15 sec	Denaturation	
4°C	∞	Kühlung	

Mastermix für die Actin Real-Time RT-PCR

4,0 mM MgCl ₂	2,4 µl
β-Actin Primergemisch , 1µM jeweils	2 µl
1fold - <i>Light Cyclers</i> – <i>Fast start DNA Master SYBR Green</i>	2 µl
c-DNA	2 µl
H ₂ O	11,6 µl
Gesamtvolumen	20 µl

PCR-Bedingungen für die β -Actin *Real Time* RT-PCR

95°C	10 min	Aktivierungsschritt für die Taq-DNA Polymerase / Denaturation	
68°C	10 sec	Annealing	30 Zyklen
72°C	15 sec	Elongation	
95°C	15 sec	Denaturation	
4°C	∞	Kühlung	

3.6.3 Quantifizierung und Identifizierung der *Real Time* PCR-Produkte

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit der *Light-Cycler Relative Quantification Software* (Roche Molecular Biochemicals). Das Prinzip der Quantifizierung soll im folgenden Abschnitt erläutert werden.

In der frühen Phase der PCR überwiegen die Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produkts, in der exponentiellen Wachstumsphase heben sich die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts statistisch signifikant von denen des Hintergrunds ab. Diese Schwelle wird von der Software determiniert, und der *crossing point* ist definiert als Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Durch diesen *crossing point* lassen sich vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge des Targetgens machen. Die relative Quantifizierung erfolgt durch die Normalisierung mittels eines *Housekeeping-Gens*. Hierbei wird die Expression des Zielgens mit Hilfe eines nicht regulierten, ubiquitär und homogen exprimierten Gens normalisiert, dadurch können unterschiedliche Expressionsergebnisse, Fehler der reversen Transkription oder unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen ausgeglichen werden.

Im Rahmen der *Real Time* PCR ist durch den *Light Cycler* eine Schmelzkurvenanalyse möglich. Jedes DNA-Fragment besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur (T_m), definiert als die Temperatur zu der 50% der DNA als Einzelstrang und 50% als Doppelstrang vorliegt. Die Schmelztemperatur wird durch die Länge des Fragments und ihren GC-Anteil bestimmt. Da die Bindung des

Fluorophors (SYBR-Green-I) and das Amplifikationsprodukt unspezifisch ist, ist eine Unterscheidung zwischen spezifischem Produkt und Artefakt oder Primerdimeren nicht möglich. Diese Differenzierung erfolgt im Anschluss an den PCR-Lauf durch die Schmelzkurvenanalyse. Bei der Schmelzkurvenanalyse kommt es durch den schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Denaturierung der DNA-Doppelstränge. Wenn die Temperaturen in der Kapillare die charakteristische Schmelztemperatur erreichen, resultiert ein deutlicher Abfall der Fluoreszenz weil sich SYBR Green aus der Doppelstranghelix löst. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Da die kleinen Primerdimere bei geringeren Temperaturen schmelzen als die größeren PCR-Produkte, kann zwischen den spezifischen Produkten und den Artefakten, bzw. Primerdimeren unterschieden werden. Nach jedem PCR-Lauf wurde die Produktreinheit des gesuchten PCR-Fragments durch die Schmelzkurvenanalyse untersucht. Hierzu wurde die DNA nach dem letzten Zyklus bei 95°C denaturiert, anschließend bei 70°C wieder polymerisiert und die Temperatur dann schrittweise erneut auf 95°C angehoben. Währenddessen wird die abnehmende Fluoreszenz schrittweise alle 0,2°C gemessen, die Schmelzkurve des β -Actin-PCR-Produktes zeigt einen starken Abfall der Fluoreszenzintensität ab 88°C. Die Real-Time-PCR mit den spezifischen Hybridisationssonden macht die Schmelzkurvenanalyse weniger sinnvoll, da diese Sonden im Gegensatz zu dem Fluorophor SYBR-Green spezifisch an das Amplifikationsprodukt binden.

3.7 Sequenzierung der PCR-Produkte der semiquantitativen RT-PCR

Um die Identität der gewonnenen PCR-Produkte eindeutig nachzuweisen, wurde das in der RT-PCR gewonnene PCR-Produkt mittels einer enzymatischen Methode nach Sanger und Coulson sequenziert (Sanger und Coulson, 1975).

3.7.1 Extraktion des DNA-Fragments aus dem Gel

Zu diesem Zweck wird das PCR-Produkt wie oben beschrieben auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese mittels eines standardisierten Kits (QIAquick Gel Extraction Kit) aus dem Gel extrahiert.

3.7.2 Klonierung des DNA-Fragments

Die zu sequenzierende DNA wird wiederum mittels eines kommerziellen Kits (Topo TA Cloning) in einen M13 Vektor kloniert und dieser durch Elektroporation in E.coli als Wirt verbracht. Dieses Plasmid trägt ein Resistenzgen welches über die β -Lactamaseaktivität Ampicillinresistenz vermittelt, so ist in der Kultur die Auslese der plasmidtragenden Zellen ermöglicht.

3.7.3 Bakterienkultur und Plasmidpräparation

3.7.3.1 Bakterienkultur

Die Bakterien wurden auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Agarplatten wurden vorher mit X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indonyl-D-Galactopyranosid) bestrichen. Eine weitere Eigenschaft des Plasmids ermöglicht so die Selektion der Bakterien die inserthaltige Vektoren aufweisen. Das Plasmid besitzt neben der Ampicillinresistenz ein weiteres Markergen, das lac Z-Gen. Dieses kodiert für die β -Galactosidase. X-Gal wird durch dieses Enzym zu 5-Brom-4-Chlorindoxyl, welches an der Luft zu dem blauen Farbstoff 5,5-Dibrom-4,4-dichlorindigo oxidiert. Da sich die Klonierungsstellen innerhalb des LacZ-Gens befinden ist eine Unterscheidung von inserthaltigen Plasmiden und Plasmiden ohne Insert möglich. Bakterien die ein Plasmid mit Insert tragen, besitzen keine Möglichkeit mehr zur Expression der funktionsfähigen β -Galactosidase und wachsen als weiße Kolonien.

- Zugabe von 50 mg Ampicillin je Milliliter LB-Medium
- je zwei weiße Kolonien in 2 ml LB-Medium aufnehmen
- Kultivierung über Nacht (nicht länger als 15h) bei 37°C

3.7.3.2 Plasmid-DNA-Präparation aus E.coli

Anschließend erfolgte die Präparation der Plasmide aus den *E.coli* Bakterien mittels eines kommerziellen Kits nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen Tip 20)

3.7.4 Sequenzierung

Mit der so gewonnenen DNA kann die Sequenzierung durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wird für jede Base (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) folgender Ansatz vorbereitet:

Mastermix für 10 Sequenzierungen in der verbindlichen Reihenfolge – A,C,G,T

0,15 µM Cy5 M13 Reverse Primer	13 µl
Basengemisch	26 µl

- 5 µl DNA-Probe (nicht weniger als 125 ng/µl) 2 min bei 95°C denaturiert
- 3 µl Mastermix für Sequenzierung in vorgegebener Reihenfolge hinzugefügt

Amplifikation nach folgendem Protokoll

95°C	10 min	Denaturierung	
72°C	1 min	Annealing und Elongation	20 Zyklen
95°C	30 sec	Denaturierung über 20 Zyklen	
72°C	5 min	abschließende Elongation	
4°C	∞	Kühlung	

Im Basengemisch sind normale Nukleotide (d-ATP, d-CTP, d-GTP und d-TTP) und in einer geringeren Konzentration Didesoxynukleotide enthalten. Durch diese chemische Modifizierung kommt es bei dem Einbau dieser Base in das

Amplifikationsprodukt zu einem Kettenabbruch, da am 3'-Ende die essentielle Hydroxylgruppe zur Verlängerung der Kette fehlt. Die gewonnenen DNA-Fragmente variieren in der Länge, abhängig von der Inkorporation des Didesoxynukleotids. Da der Kettenabbruch zufällig geschieht, repräsentiert der Molekülmix jede Position einer Base im gesuchten Fragment. Das Amplifikationsprodukt wird anschließend auf ein denaturierendes 6%iges Acrylamidgel aufgetragen und die Fragmente werden auf dem *ALFexpress DNA sequencer* elektrophoretisch getrennt.

Denaturierendes 6%iges Polyacrylamidgel

12 ml 30%iges Acrylamid
30 ml 46,7%ige 8 M Harnstofflösung
5 ml H₂O
8 ml 5xTBE-Puffer
 0,445 M Borsäure
 0,445 M Tris
 0,1 M EDTA-Na₂x2 H₂O
300 µl 10%iges Ammoniumpersulfat
15 µl TEMED (1:1000 verdünnt)

Die Bahnen für die jeweiligen Nukleotide sind definiert, so dass eine getrennte Auswertung für die Basen möglich ist. Durch die CY5 Markierung des Primers können die DNA-Fragmente wie oben beschrieben durch den *ALFexpress DNA sequencer* detektiert werden, man erhält durch die Auswertung mittels der *ALFwin software* die Basensequenz des gesuchten Fragments. Anschließend wird die ermittelte Nukleotidsequenz mit der publizierten cDNA Sequenz verglichen und mittels des Programmes „BLAST“ (National Centers for Biotechnology) verifiziert. Internetadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> .

3.8 Angewendete statistische Verfahren

Die Auswertung der kompetitiven RT-PCR erfolgte nach der o.g. Formel, die dargestellten Daten stellen die Zusammenfassung von bis zu 5 unabhängigen kompetitiven RT-PCR Ansätzen jeder Tierserie dar, die Auswertung der drei vorhandenen Tierserien wurde zusammengefasst. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung. Die Analyse der Signifikanz wurde mittels der Varianzanalyse durchgeführt, da es sich um mehr als zwei Stichproben

verschiedener Individuen handelt. Für die Zellkulturdaten wurde die Auswertung der semiquantitativen RT-PCR von drei verschiedenen Serien unabhängiger Astrozytenkulturen nach hypoxischer Präkonditionierung verwendet. Die Ergebnisse sind ebenfalls dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung. Für die Auswertung der *Real Time* PCR wurde die relative Induktion von Erythropoietin mRNA zur Kontrolle aufgetragen, die Werte repräsentieren die Zusammenfassung von bis zu 8 unabhängigen PCR-Ansätzen unterschiedlicher Tiere. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Die semiquantitative kompetitive RT-PCR

Das Erythropoietin zeichnet sich in neuronalen Geweben durch eine sehr geringe Menge (*Abundance*) aus (Gopfert et al. 1997). Die semiquantitative kompetitive RT-PCR ist eine sensitive Methode, um den Nachweis kleiner RNA-Mengen zu erbringen und zusätzlich eine relative Quantifizierung vorzunehmen. Eine noch exaktere Methode, die weniger Einflussfaktoren unterliegt, wurde mit der sogenannten *Real time* PCR realisiert. Durch dieses Verfahren ist es möglich, die Amplifikation und Detektion in einem Schritt durchzuführen. Diese Methode war bei Beginn meiner Arbeit noch kein Standard, so dass ich zunächst die semiquantitative RT-PCR etablierte.

4.1.1 Die Etablierung der semiquantitativen kompetitiven Erythropoietin RT-PCR

Sowohl die Konzentration der Enzyme, der Primer und Nukleotide, die Anzahl der Zyklen, die Temperaturen in der Annealing-, Elongations- und Denaturationsphase sowie die Konzentration des Magnesiumchlorids können die Sensitivität und Spezifität der PCR beeinflussen (Erlich et al., 1991) Es war deshalb notwendig, die RT-PCR in den o.g. Faktoren zu optimieren.

Es wurden folgende Faktoren optimiert. Die Magnesiumkonzentration wurde im Versuchsaufbau zwischen 1-3 mM variiert. Die optimale Konzentration lag bei 1,5 mM. Die Konzentration der Primer wurde zwischen 0,25 und 0,5 μ M variiert, als optimaler Ansatz stellte sich eine Konzentration von 0,25 μ M für jeden Primer dar. Die Sequenzen für die Primer wurden so herausgesucht, dass sie ein Intron überspannen. Durch diesen Größenunterschied ist eine Unterscheidung zu eventuell kontaminierender genomischer DNA möglich. Das entstehende PCR-Produkt ist 371 bp lang.

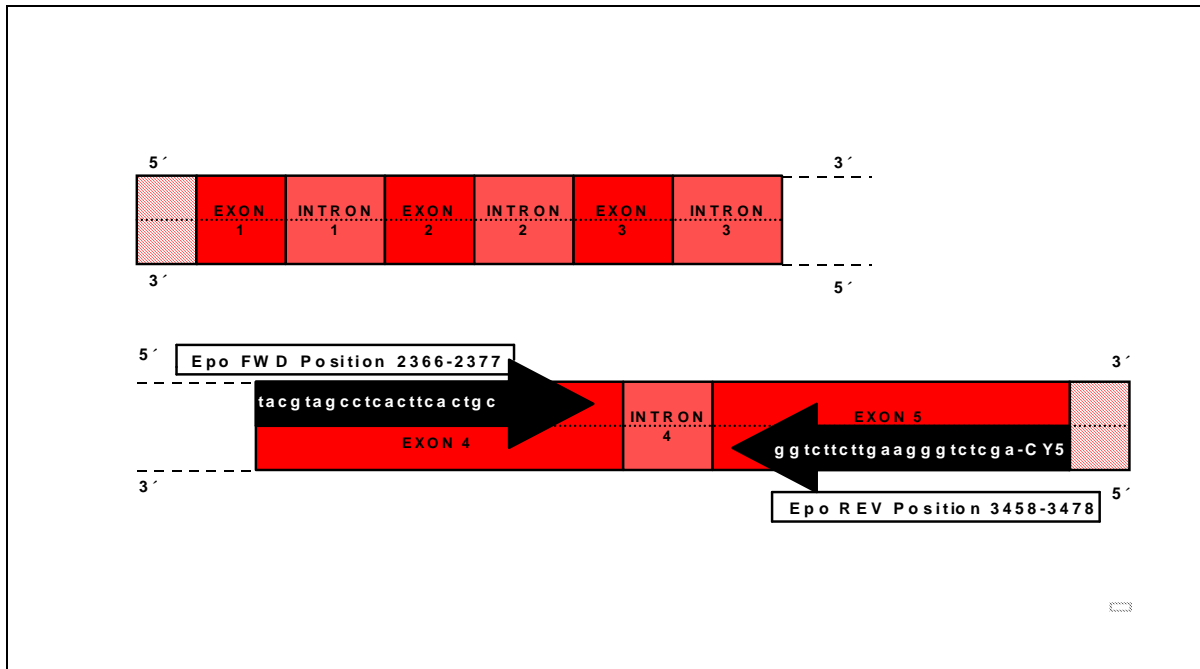


Abb. 8 Position der Primer für die kompetitive Erythropoietin RT-PCR am Erythropoietin-Gen der Maus.

Die ursprünglich verwendete Taq-Polymerase wurde durch die AmpliTaq® Gold DNA Polymerase ersetzt. Dieses Enzym ist eine chemisch modifizierte Form der *Thermus aquaticus* (Taq) DNA Polymerase. Die AmpliTaq® Gold DNA Polymerase liegt in einer inaktiven Form vor und wird durch einen initialen Heizschritt aktiviert. Die chemische Modifikation des Enzyms wird durch diese thermische Aktivierung irreversibel aufgehoben und es wird ein aktives Enzym regeneriert. Während die nicht modifizierte Polymerase während des Erhitzens des Thermocyclers bei nicht optimalen Annealingtemperaturen unspezifische Primerdimere bildet, wird dieser Vorgang durch das modifizierte Enzym unterbunden. Man erreicht also mit der thermisch aktivierten DNA Polymerase eine höhere Spezifität und Sensitivität (Birch et al. 1996).

Die Temperaturen der einzelnen Reaktionsschritte wurden ebenfalls optimiert. Hierzu bestand die Möglichkeit einen Gradienten von 8°C auf dem Thermocycler zu programmieren. Die Annealingtemperatur wurde in 12 Schritten zwischen 62,0°C und 70,1°C variiert. Die Annealingtemperatur wurde auf ein Optimum bei 65°C eingestellt.

4.1.2 Die Etablierung der semiquantitativen kompetitiven β -Actin-RT-PCR

Auch die PCR des internen Standardgens wurde optimiert. Diese PCR ist aufgrund der höheren *Abundance* des Targetgens und der damit verbundenen geringeren Zyklusanzahl wesentlich robuster. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Erythropoietin-PCR wurde lediglich eine einfache Taq Polymerase (Perkin Elmer) verwendet. Initial wurde die PCR ebenfalls mit einem *hot-start* begonnen, um unerwünschte Hybridisationsprodukte zu vermeiden.

Es wurden ebenfalls die Magnesiumkonzentration, die Konzentration der eingesetzten Primer und die Annealingtemperatur optimiert. Die verwendeten Primer umspannen wie in der folgenden Abbildung gezeigt zwei Introns, um eine Unterscheidung zu genomischer DNA zu ermöglichen. Das entstehende PCR-Produkt ist 753 bp lang. Die Annealingtemperatur wurde ebenfalls optimiert, es zeigte sich eine optimale Bindungstemperatur bei 68°C.

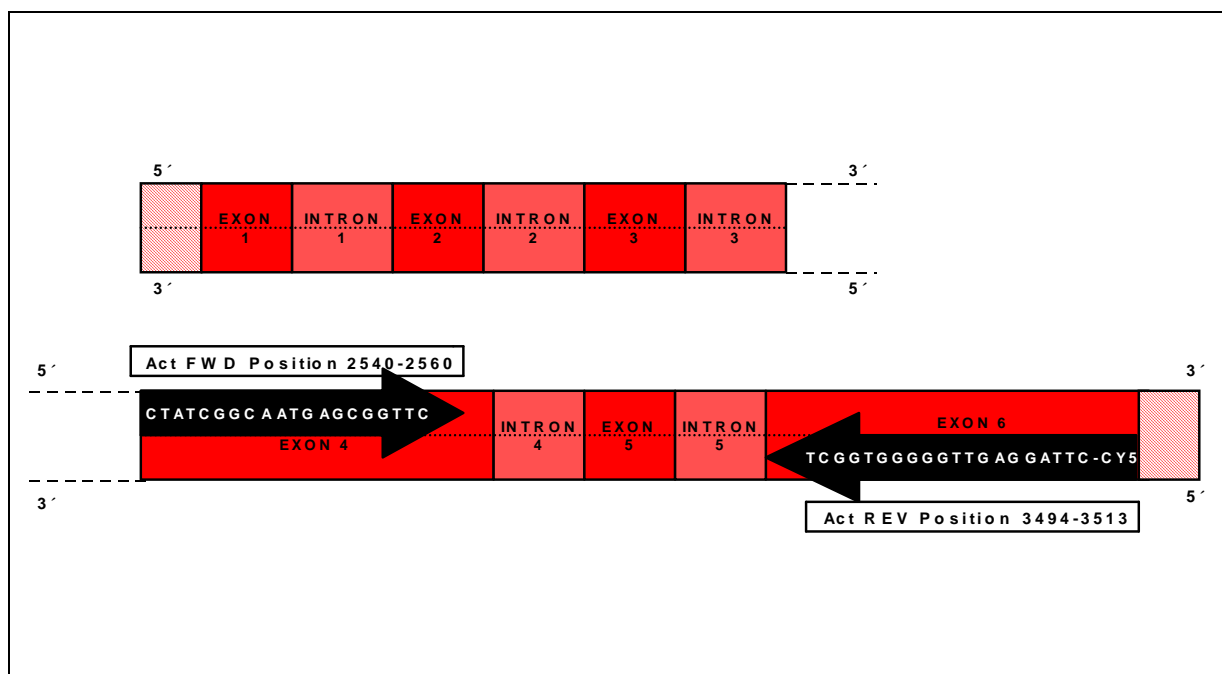


Abb. 9 Position der Primer für die kompetitive β -Actin RT-PCR am β -Actin-Gen der Ratte

4.1.3 Die Auswertung der semiquantitativen Erythropoietin-RT-PCR

Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die CY5 markierten Banden der gesuchten cDNA und des bekannten Deletionsstandard durch die Messung der Fluoreszenz mittels des ALFexpress DNA Sequencer detektiert (Freyer et al. 1999). Das Ergebnis der Gelelektrophorese mittels des ALFexpress Laser DNA Sequencer wird in Abb. 10 exemplarisch gezeigt.

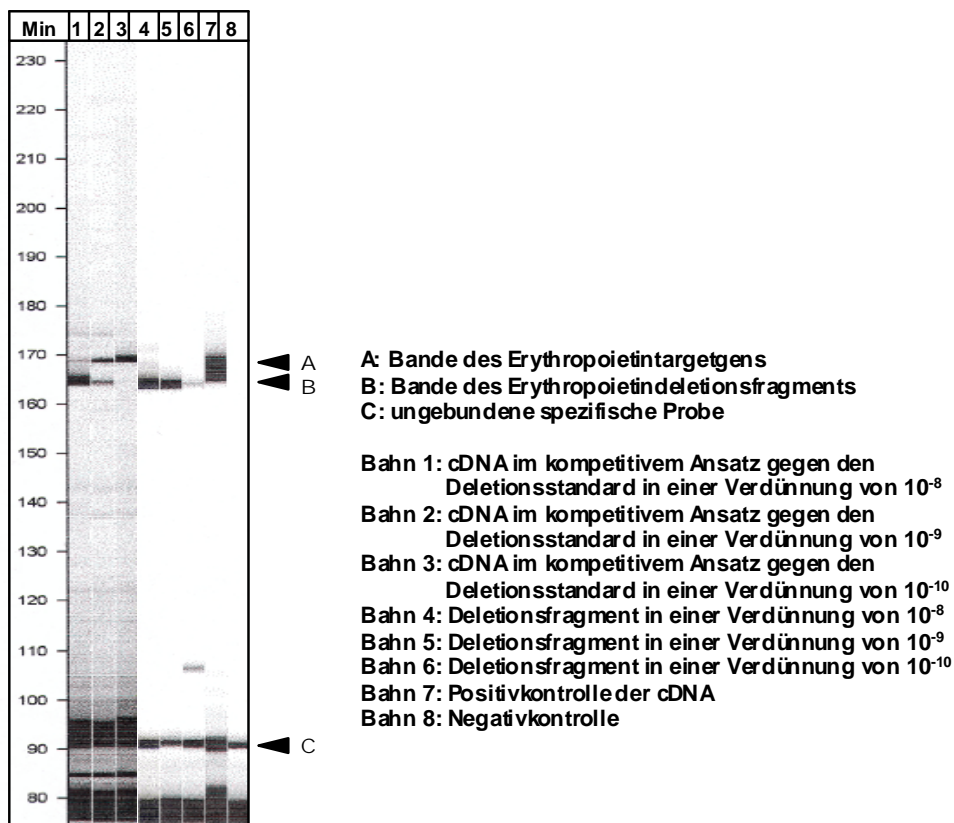


Abb. 10. Exemplarische Darstellung einer Auswertung der kompetitiven Erythropoietin-RT-PCR mittels Gelelektrophorese mit dem *ALFexpress DNA-Sequencer*. Dargestellt ist eine cDNA-Messung für eine Probe die 24h vor der Präparation der cDNA mit DFX behandelt wurde.

Neben der klassischen Darstellung des Gelbildes analog zu der Ehtidiumbromidgelelektrophorese wurde das Ergebnis mittels des *ALFexpress DNA Sequencer* als Kurve dargestellt. Die Werte des Amplifikats der gesuchten cDNA (A_t) sowie des Amplifikats des Deletionsstandard (A_s) werden jeweils repräsentiert durch die Fläche unter der Kurve des spezifischen Amplifikationssignals der AUC (*area under the curve*).

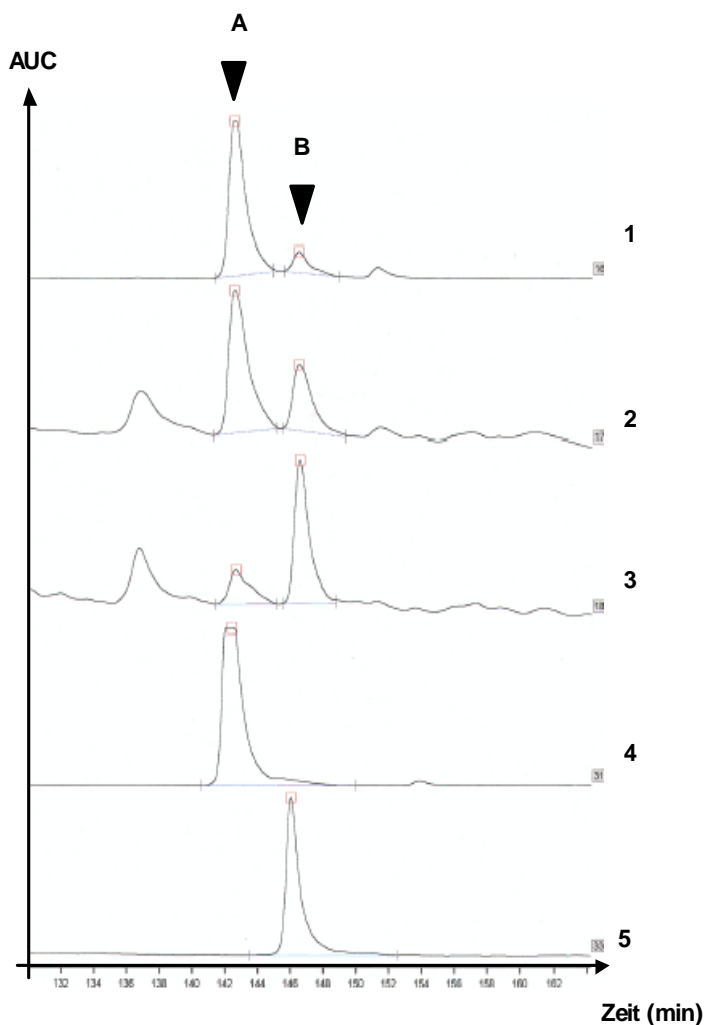


Abb. 11. Exemplarische Darstellung einer Auswertung der kompetitiven Erythropoietin-RT-PCR mit dem *ALFexpress DNA-Sequencer*. Dargestellt ist eine cDNA-Messung für eine Probe die 24h vor der Präparation der cDNA mit DFX behandelt wurde.

A: Gipfel des Erythropoietindeletionsstandard

B: Gipfel des Erythropoietintargetgens

Bahn 1: cDNA im kompetitiven Ansatz gegen den Deletionsstandard in einer Verdünnung von 10^{-8}

Bahn 2: cDNA im kompetitiven Ansatz gegen den Deletionsstandard in einer Verdünnung von 10^{-9}

Bahn 3: cDNA im kompetitiven Ansatz gegen den Deletionsstandard in einer Verdünnung von 10^{-10}

Bahn 4: Positivkontrolle des Deletionsstandard

Bahn 5: Positivkontrolle der cDNA

Die Berechnung der gesuchten Ausgangskonzentration des Erythropoietingens im Ansatz, wurde durch die Auswertung der Fläche unter der Kurve des spezifischen

Amplifikationssignals, entsprechend der im Methodenteil erläuterten Formel realisiert. Wie in Abb. 10 und 11 dargestellt, überwiegt im Kompetitionsansatz der Deletionsstandard in einer Verdünnung von 10^{-8} in seiner Konzentration das Zielgen. Mit zunehmender Verdünnung des Deletionsstandards überwiegt aber die Konzentration der Erythropoietin-cDNA. Zwischen den Ausgangskonzentrationen des Deletionsstandards befindet sich also auch die gesuchte Ausgangskonzentration des Targetgens.

4.1.4 Die Auswertung der semiquantitativen β -Actin-RT-PCR

Die PCR wurde ebenfalls mit dem *ALFexpress DNA sequencer* ausgewertet. Es erfolgte wie o.g. die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts und die Detektion der mit CY5 markierten Banden, so dass sowohl die Darstellung des klassischen Gelbildes als auch die Auswertung der AUC zur Berechnung der Ausgangskonzentration im Kurvenbild gegeben war. An dieser Stelle wird exemplarisch ein Beispiel für die Auswertung mittels des *ALFexpress DNA sequencer* gezeigt.

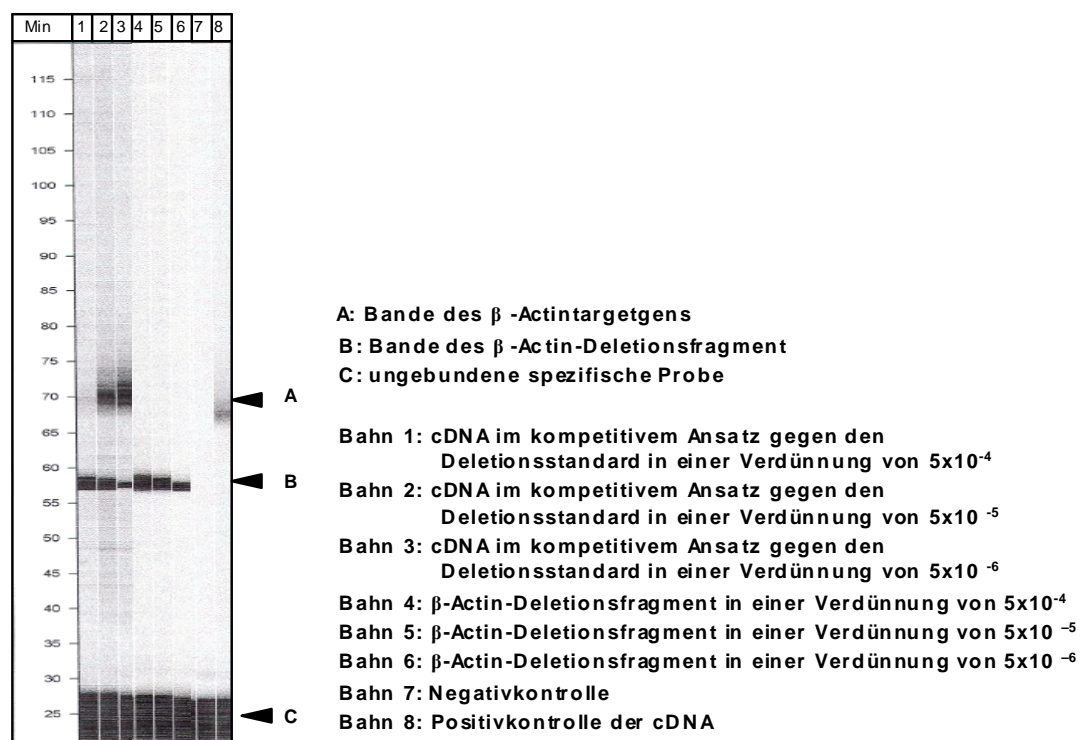


Abb. 12. Exemplarische Darstellung einer Auswertung der kompetitiven β -Actin-RT-PCR mittels Gelelektrophorese mit dem *ALFexpress DNA-Sequencer*. Dargestellt ist eine cDNA-

Messung für eine Probe, die unmittelbar vor der Präparation der cDNA mit DFX behandelt wurde

Die jeweilige AUC repräsentiert in der Kurvendarstellung das Amplifikat der gesuchten c-DNA (A_t), bzw. des Deletionsfragments (A_s). Auch hier ist initial die Konzentration des Targetgens geringer als die des verdünnten Deletionsstandards. Um feinere Abstufungen zu erreichen, wurden die Verdünnungsstufen modifiziert. Es zeigt sich auch hier, dass die Konzentration des Targetgens im Reaktionsansatz im Bereich der genannten Verdünnungsstufen des Deletionsstandard liegt. Die Berechnung der Ausgangskonzentration des Targetgens erfolgte, wie im Methodenteil erläutert, unter Auswertung der AUC der jeweiligen Gipfel.

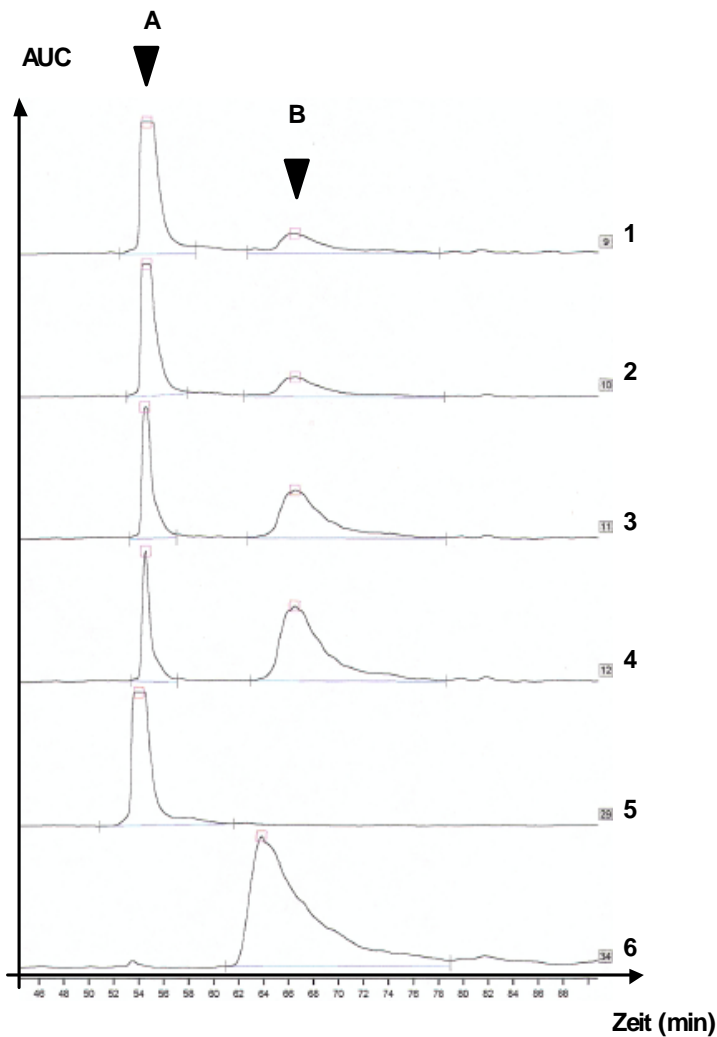


Abb. 13. Exemplarische Darstellung einer Auswertung der kompetitiven β -Actin-RT-PCR mit dem *ALFexpress DNA-Sequenzier*. Dargestellt ist eine cDNA-Messung für eine Probe, die 4h vor der Präparation der cDNA mit DFX behandelt wurde.

A: Gipfel des β -Actin-Deletionsstandard

B: Gipfel des β -Actintargetgens

Bahn 1: cDNA im kompetitiven Ansatz gegen die β -Actin-Deletionsmutante in einer Verdünnung von 10^{-3}

Bahn 2: cDNA im kompetitiven Ansatz gegen die β -Actin-Deletionsmutante in einer Verdünnung von 5×10^{-4}

Bahn 3: cDNA im kompetitiven Ansatz gegen die β -Actin-Deletionsmutante in einer Verdünnung von 10^{-4}

Bahn 4: cDNA im kompetitiven Ansatz gegen die β -Actin-Deletionsmutante in einer Verdünnung von 5×10^{-5}

Bahn 5: Positivkontrolle des β -Actin-Deletionsstandard

Bahn 6: Positivkontrolle der cDNA

4.1.5 Die Ergebnisse der semiquantitativen kompetitiven Erythropoietin-RT-PCR

Untersucht wurde die Expressionskinetik der Erythropoietin mRNA, nach systemischer Stimulation der Ratten mit Desferrioxamin. Insgesamt wurden drei Tierserien mit jeweils sieben Tieren ausgewertet. Die Tiere wurden mit 300mg/kg Körpergewicht Desferrioxamin intraperitoneal vorbehandelt. Wie in Abbildung 14 dargestellt, fand sich eine bis zu fünffache Induktion gegenüber der Kontrolle. Die maximale Induktion des Erythropoietingens fand sich in den Tieren vier Stunden nach der Desferrioxaminvorbehandlung. Interessanterweise fand sich ein zweiter Gipfel der Induktion nach 24 Stunden. Ein noch größeres Intervall zu der Desferrioxaminvorbehandlung ließ abnehmende Level der Erythropoietin-mRNA erkennen.

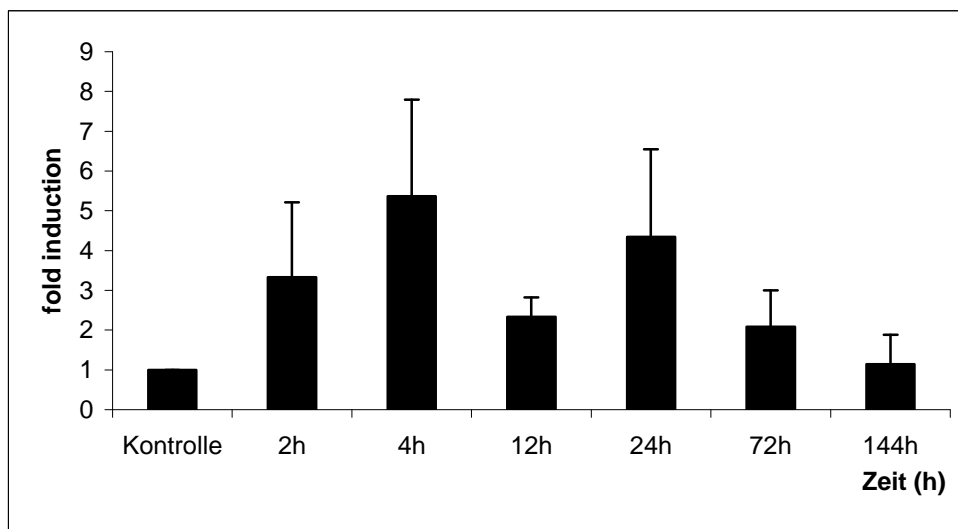


Abb. 14. Induktion der Erythropoietin mRNA Transkription durch die intraperitoneale Vorbehandlung mit DFX (300mg/kg/KG) in der Ratte, die y-Achse repräsentiert die absolute Induktion im Vergleich zur Kontrolle (Vorbehandlung mit äquivalenten Mengen physiologischer Kochsalzlösung), die x-Achse repräsentiert die Dauer in Stunden nach DFX-vorbehandlung. Alle Werte dargestellt mit SD.

Die Induktion der Erythropoietin mRNA wurde ebenfalls in Astrozytenkulturen untersucht. Die Aufbereitung der RNA wurde in verschiedenen Zeitabständen nach Präkonditionierung mittels eines Sauerstoff- und Glukoseentzugs (OGD-Induktion) durchgeführt. Die Astrozyten wurden zur Kontrolle außerdem mit einem

Normalmedium (BSS-Medium) statt eines desoxygenierten und aglykämischen Mediums (DAS-Medium) versetzt, zusätzlich existieren zwei Kontrollen die zwar einen Mediumwechsel erfahren haben, aber keiner Hypoxie ausgesetzt waren. Wie in Abbildung 15 dargestellt, fand sich bereits 1h nach der hypoxischen Präkonditionierung eine bis zu siebenfache Induktion gegenüber der Kontrolle. Eine deutliche Induktion ließ sich allerdings nur durch Hypoxie in Kombination mit Glucoseentzug erreichen. Ein noch größeres Intervall zu der OGD-Vorbehandlung ließ abnehmende Mengen der Erythropoietin-mRNA erkennen.

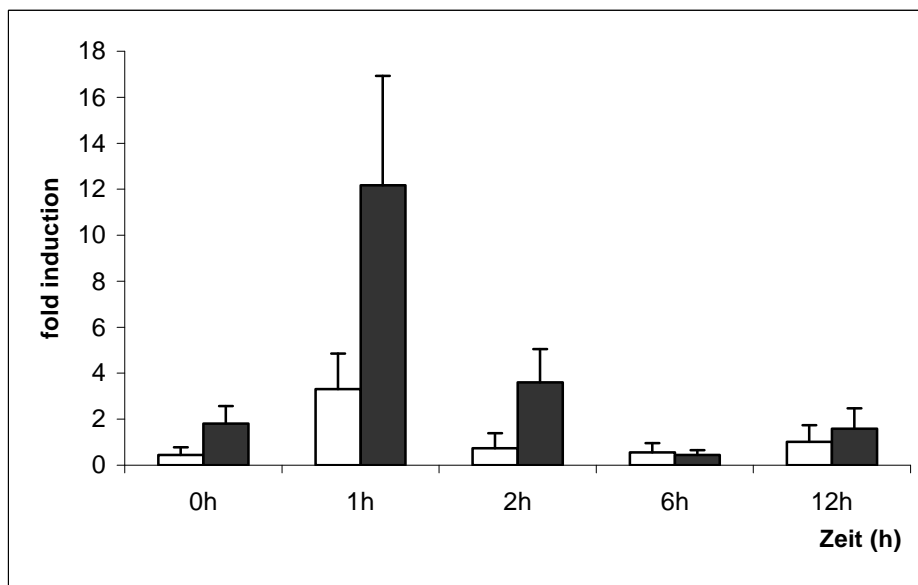


Abb. 15. Induktion der Erythropoietin mRNA Transkription durch Hypoxie und Glucoseentzug in Astrozytenkulturen, die y-Achse repräsentiert die absolute Induktion im Vergleich zu den Kontrollen die keiner Hypoxie ausgesetzt waren (0h), bzw. die mit einem Normalmedium (BSS-Medium, weiße Balken) statt eines desoxygenierten, aglykämischen Mediums (DAS-Medium, schwarze Balken) versetzt wurden, die x-Achse repräsentiert die Dauer in Stunden nach Hypoxie. Alle Werte dargestellt mit SD.

4.2 Die quantitative Real-Time-PCR

Die semiquantitative Kompetitiv-PCR ist eine sensitive Methode, um den Nachweis kleiner RNA-Mengen zu erbringen und zusätzlich eine relative Quantifizierung vorzunehmen. Eine noch exaktere Methode, die weniger Einflussfaktoren unterliegt, wurde mit der sogenannten *Real time* PCR realisiert. Durch dieses Verfahren ist es möglich, die Amplifikation und Detektion in einem Schritt durchzuführen. Auch hier wurde die Expression jeder Probe auf der Basis des β -Actin mRNA Gehalts normiert.

Mit Hilfe der *Real time* PCR wurde die Expression der Erythropoietin mRNA hypoxisch präkonditionierter Mäuse untersucht.

4.2.1 Die Etablierung der quantitativen *Real Time* PCR

Auch in diesem Fall wurden die Erythropoietin *Real Time* RT-PCR zunächst etabliert. Die Magnesiumchloridkonzentration wurde zwischen 3 und 5 mM variiert. Die optimale Konzentration lag bei 3mM. Die Annealingtemperatur wurde auf 68°C eingestellt.

Wie im Methodenteil beschrieben, besteht einerseits die Möglichkeit das gesuchte Amplifikat durch den Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green) und andererseits durch die Bindung von spezifischen Hybridisationssonden nachzuweisen. Für den wesentlich empfindlicheren Nachweis des Erythropoietingens wurde die spezifischere Methode mittels der Hybridisationssonden eingesetzt, der Nachweis des Housekeeping-Gens β -Actin erfolgte durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green.

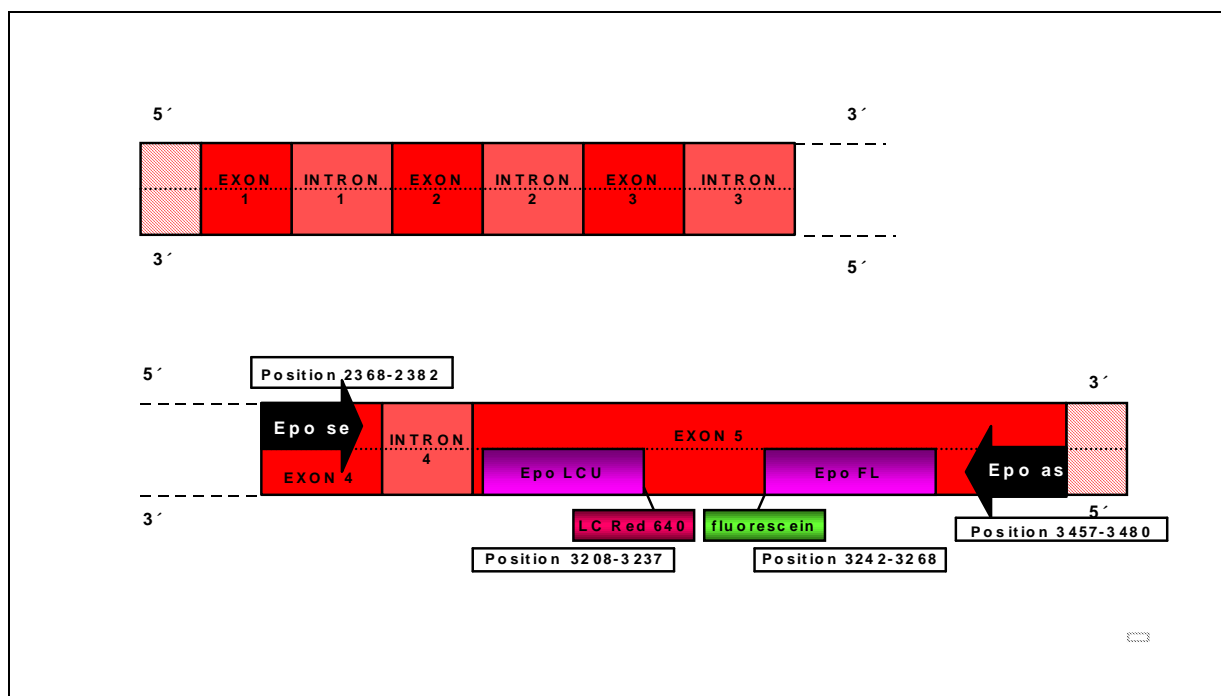


Abb. 16. Position der Primer (Epo se, Epo as) und der Hybridisationssonden (Epo LCU, Epo FL) für die quantitative *Real Time* PCR im Erythropoietin der Maus

4.2.2 Die Ergebnisse der quantitativen *Real Time PCR*

Neben der Etablierung einer neuen sensitiveren und robusten Methode, die den Nachweis der Erythropoietintranskription erlaubt, konzentrierte sich dieses Experiment auf die Induktionsstärke und v.a. auf den Zeitpunkt der endogenen Erythropoietininduktion im Hirn der Maus. Es fand sich eine sechsfache Induktion des Erythropoietingens 60 Minuten nach der hypoxischen Präkonditionierung. Bereits vier Stunden nach der Hypoxie war die Induktion rückläufig und nähert sich der Baseline an.

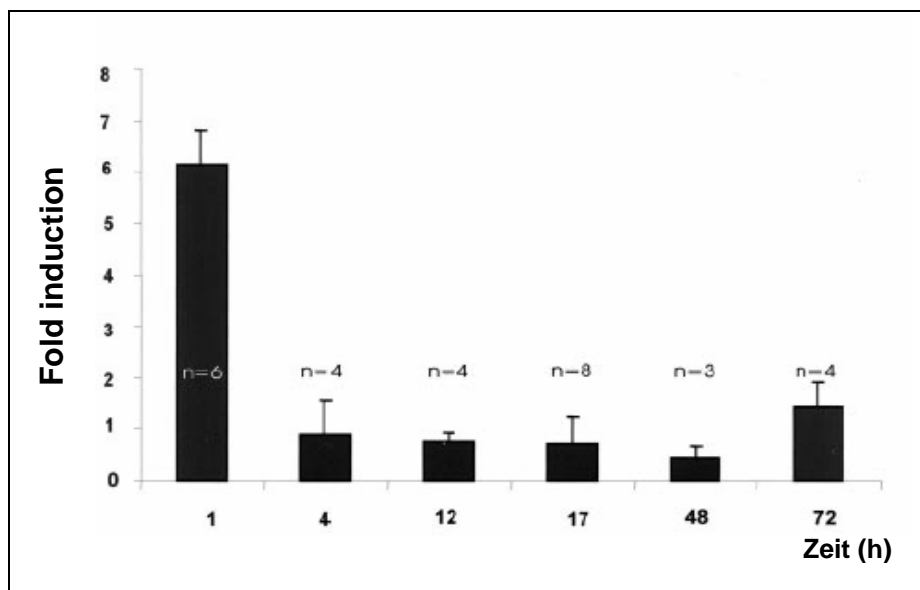


Abb. 17. Induktion der Erythropoietin mRNA Transkription durch eine fünfstündige hypoxische Präkonditionierung, die y-Achse repräsentiert die absolute Induktion im Vergleich zur Kontrolle (gleiches Procedere mit Raumluft), die x-Achse repräsentiert die Dauer in Stunden nach der fünfstündigen hypoxischen Präkonditionierung. Alle Werte dargestellt mit SD. n=Tiere pro Versuchsgruppe.

5 Diskussion

5.1 Methodik

5.1.1 Die semiquantitative RT-PCR

Der Nachweis der Genexpression von Erythropoietin und vor allem die Quantifizierung der Transkription stellt bei diesem Gen, welches im Hirn in sehr geringer Menge (*Abundance*) exprimiert wird, eine besondere Herausforderung dar (Gopfert et al. 1997). Es galt eine Methode zu etablieren, die in der Lage ist, auch diese geringe Expression quantitativ, sensitiv, spezifisch und reproduzierbar nachzuweisen. Es existieren verschiedene Möglichkeiten um RNA-Transkripte zu quantifizieren, u.a. der „Northern Blot“ und die in situ Hybridisierung (Parker und Barnes 1999), der *RNAse protection assay* (Saccomanno et al. 1992) und die RT-PCR (Weis et al. 1992). Die RT-PCR hat sich vor allem zum Nachweis von RNA in geringen Gewebsmengen und zum Nachweis von Gentranskripten mit sehr niedriger *Abundance* bewährt (Chen et al. 1999, Schwabe et al. 2000). Der erste Schritt ist die RNA-Isolierung von Gesamt-RNA oder mRNA. Es zeigt sich, dass die Reinheit und Integrität der Extrakte von entscheidender Bedeutung für die Folgeschritte sind (Swift et al. 2000). Es ist notwendig, dass die gewonnene RNA frei von kontaminierender DNA und PCR-Inhibitoren ist. Unter anderem sind Phenole, Salze oder Ethanol bekannte Inhibitoren der Amplifikation (Wilson 1997). Die Reverse Transkription der gewonnenen RNA erfolgt durch retrovirale Enzyme, etabliert sind hierzu die Reverse Transkriptase des AMV (*Avian myeloblastosis Virus*) und des MMLV (*Moloney murine leukemia virus*). Auch wenn die AMV-RT eine größere Menge an spezifischen Produkten der RT-PCR liefern soll als die MMLV-RT (Brooks et al. 1995), weist die MMLV-RT eine signifikant geringere RNase H Aktivität auf und erlaubt somit die Synthese längerer cDNA-Moleküle (Gerard et al. 1997, DeStefano et al. 1991). Der Schritt der reversen Transkription ist mit Random Hexamers, Poly-T-Oligonukleotiden oder spezifischen Primern möglich. Es erwies sich in meinen Experimenten als vorteilhaft, die Random Hexamers einzusetzen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Einsatz von spezifischen Oligonukleotiden zwar die Amplifikation unspezifischer Sequenzen minimiert, aber die Ausbeute der reversen

Transkription durch Random Hexamers wesentlich höher ist (Zhang und Byrne 1999, Schwabe et al. 2000).

5.1.2 Die Quantifizierung des Targetgens

Die RT-PCR weist wie jede Polymerase-Ketten Reaktion eine typische Kinetik auf. Idealerweise erfolgt die Vermehrung der Amplifikate einer Exponentialfunktion, in der Praxis beeinflussen Temperaturdifferenzen, die Qualität und Bindungsstabilität der Primer, mögliche Formationen wie *Hairpinloops* zwischen Primer und c-DNA und die Funktion des Enzyms die Reaktion. Nach einer Anlaufphase tritt die Amplifikation in die exponentielle Wachstumsphase oder log-lineare Phase ein, hier sollte optimalerweise die Quantifikation stattfinden, nach 30 bis 40 Zyklen wird die Plateauphase erreicht. Diese erklärt sich u.a. durch die Limitierung der Enzymmenge bzw. die reduzierte Enzymaktivität (Miesfeld 1999). Für die RT-PCR Experimente gelang der Nachweis des Erythropoietingens erst nach einer Anzahl von 35 bis 40 Zyklen, so dass die PCR in den Grenzbereich zu der Plateauphase kam. Dies erschwerte die Etablierung und Reproduzierbarkeit der Experimente, da sich mit der Anzahl der Zyklen negative Einflussfaktoren potenzieren. Ein auswertbares Signal für die Erythropoietin-RT-PCR war erst nach dieser Zyklenanzahl erhältlich, dies ist am ehesten auf die bereits beschriebene geringe *Abundance* dieses Gens in neuronalen Geweben zurückzuführen.

Bernaudin et al. (2000) führten ebenfalls den Nachweis des Erythropoietingens durch die RT-PCR. Sie fanden eine Induktion des Gens durch Desferrioxamin und Kobaltchlorid in Astrozyten und Neuronen sowie als Reaktion auf eine hypoxische Präkonditionierung der Tiere in Rattenhirnen. Allerdings wurde die RT-PCR mit 60 Zyklen durchgeführt, die Quantifizierung wurde also nicht in der exponentiellen Wachstumsphase der PCR sondern bereits in der Plateauphase durchgeführt. Nach Herstellung der cDNA wurde von Bernaudin und Mitarbeitern eine Erythropoietin-PCR durchgeführt. Die Mengen des gebildeten Erythropoietin wurden relativ zur β -Actin-Expression normalisiert, um Differenzen, die durch die RNA-Präparation und die Synthese der cDNA bedingt sind, zu berücksichtigen. Um eine quantitative Aussage zu treffen sollte zusätzlich ein externer Standard in der PCR mitgeführt werden (Ferre 1992, Clementi et al. 1993, Foley et al. 1993). Die PCR-Effizienz des externen Standards und des Zielgens muß sich entsprechen, um eine quantitative

Aussage zu treffen. Da bereits minimalen Varianzen in den Reaktionsbedingungen (Temperatur, Dauer der Schritte, Konzentrationen der Reaktionspartner) keinen Rückschluss mehr auf die ursprünglich eingebrachte cDNA-Menge zulassen, führte ich die PCR als kompetitive PCR unter Mitführung eines Deletionsstandards in bekannter Konzentration durch. Dies war im Rahmen der Arbeit von Bernaudin et al. (2000) nicht gewährleistet. Auch die direkte Erfassung des gebildeten PCR-Produkts durch eine Echtzeit-PCR (*Real Time PCR*) kam in diesem Falle nicht zum Einsatz.

5.1.3 Die Normalisierung durch das β -Actin-Gen

Ein *Housekeeping Gene* wie β -Actin wird eingesetzt, um eine Probe zu normalisieren, das heißt Unterschiede die durch die RNA-Präparation oder die cDNA-Synthese bedingt sind, auszugleichen. Es sollte also möglichst ubiquitär vorliegen und unabhängig von äußeren Einflüssen konstant exprimiert werden. Ich habe β -Actin eingesetzt, obwohl es Hinweise gibt, dass dieses Gen selbst modulierenden Einflüssen unterliegt. So haben Zhong und Simons (1999) verschiedene Gene unter diesem Aspekt untersucht. Sie fanden unter Hypoxie veränderte Level des β -Actin-Gens. Auch Trendelenburg et al. (2002) wiesen im Rahmen der SAGE-Analyse eine geringe Induktion des Gens nach (nicht publizierte Daten). Im Rahmen dieser seriellen Genanalyse wurden globale Veränderungen in der Genexpression nach fokaler zerebraler Ischämie auf der mRNA-Ebene untersucht. Es wurde unter Ischämie eine Zunahme der gezählten β -Actin-Transkripte um 29% verzeichnet. Diese Induktion würde in meiner Arbeit zwar zu einem systematischen Fehler führen, der allerdings die beschriebene Erythropoietininduktion unter Hypoxie nur gering verringern würde.

5.1.4 Die quantitative *Real Time PCR*

Die Quantifizierung des Amplifikats ist nur dann mit höchster Genauigkeit und Präzision möglich, wenn die PCR in die exponentielle Wachstumsphase der Amplifikation eintritt. Der Punkt an dem sich die Reaktion der log-linearen Phase befindet ist extrem variabel. Während in einigen Proben aufgrund der geringen Ausgangskonzentration der c-DNA die Nachweisbarkeitsgrenze noch nicht erreicht ist, ist nach gleicher Zyklenanzahl in anderen Ansätzen eventuell schon die

Plateauphase erreicht. Dieser Faktor erschwert die Reproduzierbarkeit der RT-PCR, so wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Standardabweichungen der semiquantitativen Kompetitiv-PCR von 10-20% gefunden (Apostolakos et al. 1993, Zimmermann et al. 1994, Besnard et al. 1994, de Kant et al. 1994, Xia et al. 1995). Eine exaktere Methode konnte durch die *Real time* PCR etabliert werden. Diese Methode wurde 1992 von Higuchi et al. erstmalig beschrieben. Durch dieses Verfahren ist es möglich, die Amplifikation und Detektion in einem Schritt durchzuführen. Die Entwicklung der fluoreszenzbasierten kinetischen RT-PCR vereinfacht den Prozeß der reproduzierbaren Quantifizierung von mRNA. Durch die Bestimmung der Menge des Amplifikats nach jedem Zyklus ist es möglich die exponentielle Phase der Reaktion zu bestimmen und die Proben direkt miteinander zu vergleichen. Auch hier muß die Standardisierung durch ein *Housekeeping-Gen*, in unserem Fall wiederum β -Actin, erfolgen, aber die Mitführung eines Deletionsstandard erübrigt sich durch die Direktquantifizierung des Amplifikats. Es entfällt die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente, die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist geringer. Die *Real Time* PCR ist derzeit die sensitivste Methode um RNA zu detektieren und zu quantifizieren. Es wurde sogar nachgewiesen, dass diese Methode in der Lage ist, die RNA-Quantifizierung aus einer einzigen Zelle zu ermöglichen (Liss 2002, Bustin 2000).

Aufgrund der genannten Einflussfaktoren denen die semiquantitative RT-PCR unterliegt, war es also möglich mit der Real-Time-PCR die Quantifizierung des Targetgens wesentlich zu vereinfachen. Zusätzlich ist die Datenanalyse durch die Generation der Standardkurve und die Kalkulation der Nummer der DNA-Kopien, die automatisch und ohne die Einflussnahme des Untersuchers erfolgt, in einem höheren Maße reproduzierbar und technisch erheblich einfacher. Dem hohen zeitlichen und materiellen Aufwand der kompetitiven RT-PCR steht allerdings unbestritten ein hoher Investitionsaufwand bei der *Real time* PCR gegenüber.

5.2 Die Erythropoietininduktion durch Ischämie, Hypoxie, hypoxische Präkonditionierung und Chemikalien

Marti et al. (1996) wiesen eine Erythropoietininduktion in Hirnen von Nagern und Primaten nach, nachdem diese Tiere hypoxisch präkonditioniert wurden. Zusätzlich

untersuchten sie astrozytäre Zellkulturen präpariert aus Mausembryonen. Nach Hypoxie wiesen sie eine 100-fache Induktion von Erythropoietin in diesen Zellen nach. Durch die Untersuchung verschiedener glialer Zellen, konnten sie die Astrozyten als Hauptquelle endogen produzierten Erythropoietins aufzeigen. Diese Ergebnisse decken sich teilweise mit meinen Untersuchungen, allerdings ist die Induktionshöhe des Erythropoietingens deutlich von den hier gezeigten Ergebnissen verschieden. Die Methodik, der sich diese Arbeitsgruppe bediente, ist vergleichbar. Zwar wurden die Zellen nicht wie in unserem Falle von Ratten sondern Mäusen gewonnen, der Nachweis der Erythropoietin-mRNA erfolgte aber ebenfalls mit einer semiquantitativen RT-PCR, die Normalisierung auf der Basis des Kontrapsin und Komplement C3-Gehaltes der Zellen und die Auswertung mittels Gelelektrophorese und Videopixelanalyse der Banden. Entscheidend für die Unterschiede ist jedoch wahrscheinlich die „Strenge“ der Hypoxie. Wir verbrachten die Zellkulturen für 180min in eine hypoxische Umgebung (1 % Oxygenierung), die Arbeitsgruppe um Marti inkubierten die Zellen für 6-94 h bei 1 % O₂, es wurde trotz dieser strengen Hypoxie kein Marker zur Erhebung der Letalität, wie z.B. LDH überprüft.

Zum Nachweis der Erythropoietininduktion in zerebralen Zellen wurde wie auch in der vorliegenden Arbeit von der Arbeitsgruppe um Bernaudin die RT-PCR genutzt. Bernaudin et al. (2000) fanden in astrozytären Zellkulturen nach Hypoxie eine 7-10fache Induktion des Erythropoietingens, die mRNA-Level stiegen nach 2 h an und erreichten nach 6 h ein Maximum. Ich fand ebenfalls eine bis zu siebenfache Induktion des Gens, deren Maximum allerdings nach 1h erreicht war, während ein größeres Intervall zur OGD-Vorbehandlung wieder abnehmende Mengen der Erythropoietin-mRNA erkennen ließ. Neben o.g. methodischen Unterschieden lassen sich diese Differenzen auch durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen erklären (Hypoxieexposition bis zu 6 h). Während Bernaudin et al. (2000) nach DFX-Präkonditionierung allerdings nur eine leichte Erythropoietininduktion nach 24 h fanden, unterscheiden sich die Ergebnisse in diesem Falle deutlich (Vergleich Abb. 14), so kam es bereits nach 4 h zu einer 5fachen Induktion des Erythropoietingens mit einem zweiten *Peak* nach 24 h. Diese Unterschiede könnten auf das Tiermodell zurückzuführen sein, während ich Wistarratten untersucht habe, wurde die DFX-Stimulation von Bernaudin et al. (2000) an Mäusen vorgenommen. Die unterschiedliche Menge an verabreichtem DFX (200mg/kg/KG versus 300mg/kg/KG in den hier gezeigten Experimenten) könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Zu der

Erythropoietininduktion nach hypoxischer Präkonditionierung von Mäusen wird von Bernaudin et al. (2000) keine quantitative Aussage getroffen. Hier sind die Arbeiten noch weniger vergleichbar, einerseits erfolgte unsere Auswertung durch die quantitative *Real time* PCR, andererseits waren die experimentellen Bedingungen deutlich anders (Hypoxiedauer, Zeitpunkt der RNA-Isolierung). Allerdings fand sowohl unsere Arbeitsgruppe als auch die Arbeitsgruppe um Bernaudin eine Abhängigkeit von *de novo* Proteinsynthese, indem die Erythropoietininduktion bzw. die durch Erythropoietin vermittelten Effekte durch Cycloheximid geblockt wurden. Auch Spandou et al. (2004) untersuchten die Erythropoietininduktion in zerebralen Zellen mit der semiquantitativen RT-PCR. Die PCR wurde als *single-step*-RT-PCR in einem Schritt durchgeführt, die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte auf Basis des 18SrRNA-(18S ribosomale Ribonukleinsäure) Gehaltes der Proben. Die Untersuchung fand an 7 Tage alten Ratten statt, die nach permanentem, einseitigem Verschuß der A. carotis einer einstündigen Hypoxie ausgesetzt wurden. Die Rattenhirne wurden dann sofort, 24 h oder 4 Tage nach der Hypoxie-Ischämie untersucht. Diese Arbeitsgruppe fand eine nicht signifikante Erythropoietin-mRNA-Induktion, zudem konnte keine Induktion des Proteins mittels Westernblot nachgewiesen werden. Sie beschrieben dagegen eine massive Induktion (35fach) der EpoR-mRNA nach 24 h, der Proteinnachweis ergab eine 5fache Induktion des Rezeptors. Mit einer weiteren Methode, konnte immunhistochemisch nach 4 Tagen dann eine Erythropoietininduktion verbunden mit einer Astrozytose nachgewiesen werden. Dies legt wiederum die Astrozyten als Hauptquelle endogen produzierten Erythropoietins nahe. Der fehlende Nachweis von Erythropoietin-mRNA unmittelbar und 24 h nach der Hypoxie steht im Gegensatz zu unseren Resultaten. Wir fanden durch die quantitative Real-Time-PCR bereits 1h nach Hypoxie eine sechsfache Induktion der Erythropoietin-mRNA. Unsere Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe eines Immunoassays ebenfalls eine robuste Induktion des Proteins durch Hypoxie aufzeigen (110 U/L), welche nach 48 h noch weiter anstieg (236 U/L), während in der Kontrolle kein Erythropoietinprotein nachgewiesen werden konnte (<1 U/L) (Prass et al. 2003). Der fehlende Nachweis einer raschen Erythropoietininduktion durch Spandou et al. (2004) hat möglicherweise verschiedene Gründe. Die RT-PCR wurde von dieser Arbeitsgruppe als *Single-Step*-RT-PCR durchgeführt. Diese Methode spart Zeit und ist einfacher durchzuführen, sie hat allerdings den Nachteil, dass im Rahmen der reversen Transkription nur genspezifische Primer verwendet werden

können. Ich habe den Schritt der reversen Transkription versuchsweise ebenfalls mit spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt, wie bereits ausgeführt, erwies sich die Ausbeute der reversen Transkription als nicht ausreichend, um eine sichere Aussage über eine Induktion des Erythropoietingens zu führen (Daten nicht gezeigt).

Chavez et al. (2006) untersuchten, wenn auch unter einer anderen Fragestellung, ebenfalls die Erythropoietinexpression in der Zellkultur. Sie bedienten sich hierzu der quantitativen *Real Time* PCR und die Auswertung der Geninduktion erfolgte unter Nutzung des *FRET* (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer). Die Normalisierung der Proben erfolgte ebenfalls auf der Basis des β -Actin-Gehaltes der Zellen. Diese Arbeitsgruppe fand in Astrozyten eine hypoxische und durch DFX vermittelte bis zu sechsfache Erythropoietininduktion gegenüber der Kontrolle. Diese Ergebnisse sind meinen *in vitro* Daten, wenn diese auch durch die kompetitive RT-PCR untersucht wurden, durchaus vergleichbar. Interessanterweise fand diese Arbeitsgruppe auch eine Erythropoietinexpression in Neuronen, diese lag allerdings sowohl in der Kontrolle als auch unter Hypoxie, bzw. nach DFX-Stimulation deutlich unter den Werten der astrozytären Kulturen, so dass von den Astrozyten als Hauptquelle endogen produzierten Erythropoietins ausgegangen werden muß. Mittels Westernblot und ELISA wurde von Chavez et al. (2006) auch auf der Proteinebene der Erythropoietin Gehalt von Zelllysaten bzw. dem Medium der Zellen untersucht. Auch hier fand sich in Astrozyten eine verstärkte Erythropoietinproteinbildung, während diese bei Neuronen allenfalls leicht erhöht war. Die Erythropoietinexpression nach ischämischer Präkonditionierung wurde auch von Malhotra et al. (2006) untersucht. Sie setzten Ratten einem zehnmütigen Verschluss der A. cerebri media aus, 3 Tage später führten sie eine 2-stündige *MCAO* und 22-stündige Reperfusion aus, dann wurden die Hirnschnitte ausgewertet. Die Auswertung der Erythropoietinexpression fand allerdings durch immunhistochemische Methoden auf der Proteinebene statt, eine quantitative Aussage wurde nicht getroffen, so ist ein Vergleich in diesem Falle nur bedingt möglich. Interessanterweise wiesen sie eine Expression von Erythropoietin und seinem Rezeptor mittels Doppelfärbungen ausschließlich in Neuronen und nicht in Astrozyten nach. Diese Arbeitsgruppe führt das auf die Unterschiede in der ischämischen Präkonditionierung (fokal versus global) zurück und verweist auf Arbeiten die eine Erythropoietinexpression in Neuronen nachgewiesen haben (Bergeron et al. 2000, Bernaudin et al. 2000), tatsächlich wurde aber immer eine

Erythropoietinexpression in beiden Zelltypen nachgewiesen. Dieser Aussage widersprechen auch weitere Arbeiten. So findet sich u.a. eine Reduktion des Zelltods kultivierter kortikaler Neuronen, die einer OGD ausgesetzt wurden, wenn eine Erythropoietinvorbehandlung stattgefunden hat. Allerdings beschränkt sich dieser Schutz auf Neuronen, was die These unterstützt, dass Erythropoietin zwar von Astrozyten gebildet wird aber parakrin auf Neurone wirksam wird (Sinor und Greenberg 2000).

Auch die Arbeitsgruppe um Malhotra (2006) überprüfte eine Abhängigkeit der ischämischen Präkonditionierung von Erythropoietin durch die intraventrikuläre Gabe des sEpoR. Sie fanden ebenfalls einen verringerten neuroprotektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung. Erythropoietin ist ein starker Mediator von Neuroprotektion und ischämischer Präkonditionierung, durch die Zugabe des löslichen sEpo-R wird der Effekt der ischämischen Toleranz aber signifikant verringert (Prass et al. 2003). Der sEpo-R ist ein löslicher Erythropoietinrezeptor, der zwar nicht beim Menschen, wohl aber bei der Maus in der Lage ist, Erythropoietin zu binden (Harris und Winkelmann 1996). Dieser sEpo-R ermöglicht es im experimentellen Ansatz, die über den Epo-R vermittelten Effekte mittels Zugabe dieser löslichen Form gegen andere klar abzugrenzen. Interessanterweise konnte die Zugabe dieses löslichen Rezeptors zwar die ischämische Toleranz signifikant minimieren, aber eben nicht vollständig aufheben. Neben der Möglichkeit, dass der lösliche Rezeptor nicht das ganze endogen produzierte Erythropoietin gebunden hat, ist es wahrscheinlicher, dass weitere protektive Signalkaskaden in der Entwicklung ischämischer Toleranz involviert sind. Als potentielle Kandidaten wären hier Stickoxide, VEGF, HSP 70 und TNF α zu nennen (Kirino 2002).

Mu et al. (2005) wiesen nach, dass auch die Nachbehandlung mit DFX nach fokaler zerebraler Ischämie neuroprotektiv wirkt. Sie setzten 10 Tage alte Ratten mittels *MCAO* einer fokalen Ischämie aus und verabreichten den Tieren dann 200 mg/kg/KG Desferrioxamin, anschließend untersuchten sie die Hirnschnitte immunhistochemisch und führten mittels Western blot den Nachweis von Erythropoietin und HIF1 α in Homogenisaten der Hirne durch. Auch dieses Modell ist nur bedingt mit meinen Ergebnissen vergleichbar (Proteinnachweis versus RNA-Nachweis, RT-PCR versus Westernblot, bzw. Immunhistochemie, neonatale Ratten versus adulter Wistar Ratten, DFX-Nachbehandlung nach *MCAO* versus reiner Präkonditionierung mittels DFX), aber es ergab sich in dieser Arbeit eine interessante Parallele. Sie fanden eine

zweigipfelige Induktion des Erythropoietinproteins mit einem ersten Gipfel nach 8 h und einer zweiten Induktionswelle nach 48 h die ihr Maximum nach einer Woche durchläuft. Auch ich fand eine zweigipfelige Induktion der Erythropoietin-mRNA nach DFX-Präkonditionierung von Ratten (vgl. Abb. 10). Die Ergebnisse der von mir durchgeführten RT-PCR entsprechen in ihrer Zeitkinetik nicht diesen Ergebnissen. Ich fand eine erste Induktionswelle nach 4 h, während der zweite Gipfel sein Maximum bereits nach 24 h erreichte. Ein Erklärungsansatz könnte die zeitliche Verzögerung zwischen Transkription und Translation sein, außerdem bestehen wie o.g. deutliche Unterschiede im Versuchsaufbau. Die Ergebnisse der quantitativen *Real Time* PCR nach hypoxischer Präkonditionierung zeigen eine 6fache Erythropoietininduktion bereits nach 1h, während nach 72 h wieder ein leichter Anstieg der Erythropoietinexpression zu verzeichnen ist. Ob es hier zu einem zweiten Maximum der Erythropoietinduktion kommen würde, ist jedoch spekulativ. Immunhistochemisch konnten Mu et al. (2005) mittels Doppelmarkierungen die erste Induktion von Erythropoietin den Neuronen zuordnen, während die zweite Induktionswelle den Astrozyten zugeordnet wurde. Unter Umständen könnte also eine erste autokrine Neuroprotektion durch endogen produziertes Erythropoietin der Neuronen stattfinden, die dann von einer parakrinen Neuroprotektion durch die Erythropoietinbildung der Astrozyten abgelöst wird. Dem stehen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe entgegen, in denen ein Mediumtransfer von präkonditionierten Neuronen zu nativen Neuronen keinen durch Erythropoietin vermittelten Schutz vor einer weiteren OGD bot (Ruscher et al. 2002). Allerdings handelte es sich in diesem Modell um eine Präkonditionierung durch OGD, während bei Mu et al. (2005) die Neuroprotektion durch Desferrioxamin vermittelt wurde. Eventuell besteht der Nutzen des Desferrioxamins gerade in einer prolongierten Expression von Erythropoietin durch die Astrozyten, die die autokrine Protektion der Neuronen ablöst. Im humanen Hirn fand sich ebenfalls, wenn auch in kleiner Fallzahl untersucht, eine ähnliche Zeitkinetik der Erythropoietinexpression. So zeigte sich im frischen Periinfarktgewebe bzw. kurz nach globaler Hypoxie immunhistochemisch eine deutlich erhöhte Immunoreaktivität für Erythropoietin v.a. in den Soma und Axonen der Neurone, während sich in älteren Infarkten, bzw. in längerem Zeitabstand zur Hypoxie die Erythropoietinexpression v.a. in reaktiven Astrozyten fand (Siren et al. 2001). So könnten die Astrozyten als Träger einer endogenen Neuroprotektion im Falle eines Reinfarkts als Ressource für Erythropoietin zur Verfügung stehen.

5.3 Die Wirkung von Erythropoietin

5.3.1 Protektive durch Erythropoietin vermittelte Effekte

Morishita et al. (1997) zeigten die Protektion durch Erythropoietin in hippocampalen und kortikalen Neuronen. Zusammenfassend lässt sich zu dieser Studie sagen, dass eine relativ zeitige Vorbehandlung mit Erythropoietin notwendig war (ca. 8 Stunden vor Glutamatexposition), der Zeitraum, über den die Neuronen mit Epo behandelt wurden, war dagegen sehr kurz (ca. 5 Minuten). Die Neuronen benötigten also Zeit, um die Protektionsmechanismen zu realisieren. Es erfolgte außerdem der Nachweis der RNA- und Proteinsyntheseabhängigkeit des Effektes.

Sinor und Greenberg (2000) haben den Effekt von Erythropoietin unter OGD (Oxygen-Glucose Deprivation) in kultivierten, kortikalen Rattenneuronen untersucht. Sie fanden eine Reduktion des Zelltods durch Erythropoietin, auch nach Behandlung mit dem Toxin AMPA fand sich ein protektiver Effekt. Allerdings musste auch hier Erythropoietin bereits vor der Schädigung eingesetzt werden, der Schutz war wiederum an RNA- und Proteinbildung gebunden (Sinor und Greenberg 2000).

Die ursprüngliche Vorstellung, dass Erythropoietin nicht in der Lage ist, die Bluthirnschranke zu überwinden, wurde von Brines et al. (2000) widerlegt. So reduziert auch die systemische Administration von rekombinantem Erythropoietin die Infarktgrößen durch *MCAO* um ca. 50-75% und mittels immunhistochemischer Methoden konnte die Aufnahme von Erythropoietin in das kapillarumgebende Parenchym sichtbar gemacht werden. Interessanterweise ließ sich hier ein protektiver Effekt der Erythropoietingabe bis zu 6 Stunden **nach** ischämischen Ereignis nachweisen, dieses Fenster eröffnet klinische Optionen bei dem Infarktgeschehen (Brines et al. 2000). Sie führten außerdem den Nachweis, dass rekombinantes Erythropoietin auch in der Lage ist, die ungeschädigte Bluthirnschranke zu überwinden. So zeigten sie, dass intraperitoneal appliziertes Erythropoietin auch 24h **vor** dem schädigenden Ereignis einen neuroprotektiven Effekt aufweist. Calapai et al. (2000) wiesen ebenfalls einen protektiven Effekt der Erythropoietingabe, die in diesem Falle intraperitoneal bzw. intrathekal erfolgte, nach. Es war hier eine Behandlung mit Erythropoietin nach der bilateralen Okklusion der Aa. carotis in beiden Fällen wirksam, eine Vorbehandlung mit Erythropoietin war

dagegen nur bei intrathekaler Gabe effektiv. Dies ist laut Calapei et al. (200) am ehesten dadurch zu erklären, dass rekombinantes Erythropoietin in der Lage ist, die durch Ischämie geschädigte Bluthirnschranke zu durchdringen, nicht aber die intakte. Diese These wurde durch verschiedene Autoren in Frage gestellt (Brines et al. 2000, Banks et al. 2004, Xenocostas et al. 2005). Calapai et al. zeigten einen protektiven Effekt der Erythropoietingabe auf Neuronen, es kam zu einer deutlichen Reduktion der Stickstoffmonoxidbildung. Wie bereits im Kapitel 1.1.3.2 ausgeführt, kommt es über diese Verbindung im Zusammenhang mit freien Sauerstoffradikalen zur Bildung des hoch reaktiven Peroxinitrits (Dalkara und Moskowitz 1994).

5.3.2 Intrazelluläre durch Erythropoietin vermittelte Signalkaskaden

Die Erythropoietinstimulation führt an einem Typ 1 Zytokinrezeptor, welcher mit einer nicht rezeptorspezifischen Tyrosinkinase der JAK2-Kinase assoziiert vorliegt, zur Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen und dem Rezeptor selbst. Als Resultat werden verschiedene intrazelluläre Pfade aktiviert: mitogen aktivierte Proteinkinasen wie Ras/MAPK, die PI3-Kinase und STAT-Transkriptionsfaktoren (Bao et al. 1999, Haller et al. 1996, Lacombe und Mayeux 1998, Ruscher et al. 2002, Zhao et al. 2006). Diese Pfade wurden im Wesentlichen zunächst bei der Hämatopoese beschrieben. Wie bereits im Kapitel 1.3.2 ausgeführt, scheint der klassische für die Hämatopoese entscheidende Rezeptor, als Dimer vorzuliegen (Livviah et al. 1999), während der für die neuroprotektiven Funktionen Erythropoietins verantwortliche Rezeptor einem heteromeren Rezeptorkomplex entspricht, welcher mindestens eine EpoR-Kette enthält (Leist et al. 2004).

Durch die Phosphorylierung der SHC-Bindungsstelle kommt es zu einem Anstieg der Ras gebundenen GTP, der RAF-1-Aktivierung und der Tyrosinphosphorylierung der MAPK, dies führt in Folge zur Gentranskription über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Todokoro et al. 1994). Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen sind eine Familie von Serin/Threonin Kinasen, welche in eine Vielzahl von biologischen Funktionen wie Differenzierung und Proliferation involviert sind.

Durch die Aktivierung der JAK2-Kinase kommt es außerdem zur Aktivierung der PI3K/Akt (Ruscher et al. 2002), über die Akt-Kinase (entspricht der Proteinkinase B) wird indirekt die Bcl-X_L-Funktion unterstützt. BAD (ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie) bindet normalerweise an Bcl-X_L und inaktiviert diesen Überlebensfaktor. Mittels der Akt-Kinase wird BAD phosphoryliert und inaktiviert

(Blume-Jensen et al. 1998). Die PI3K-Signalkaskade scheint für die erythropoietinvermittelte Neuroprotektion von entscheidender Bedeutung zu sein. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass der PI3K-Inhibitor LY294002 die durch Erythropoietin vermittelte Neuroprotektion und die Phosphorylierung von BAD deutlich reduziert (Ruscher et al. 2002).

Außerdem aktiviert die Proteinkinase B den antiapoptotischen Faktor NFkappaB, dieser ist als Transkriptionsfaktor für die Induktion einer Reihe von antiapoptotisch wirksamer Gene verantwortlich (Figuroa et al. 2002).

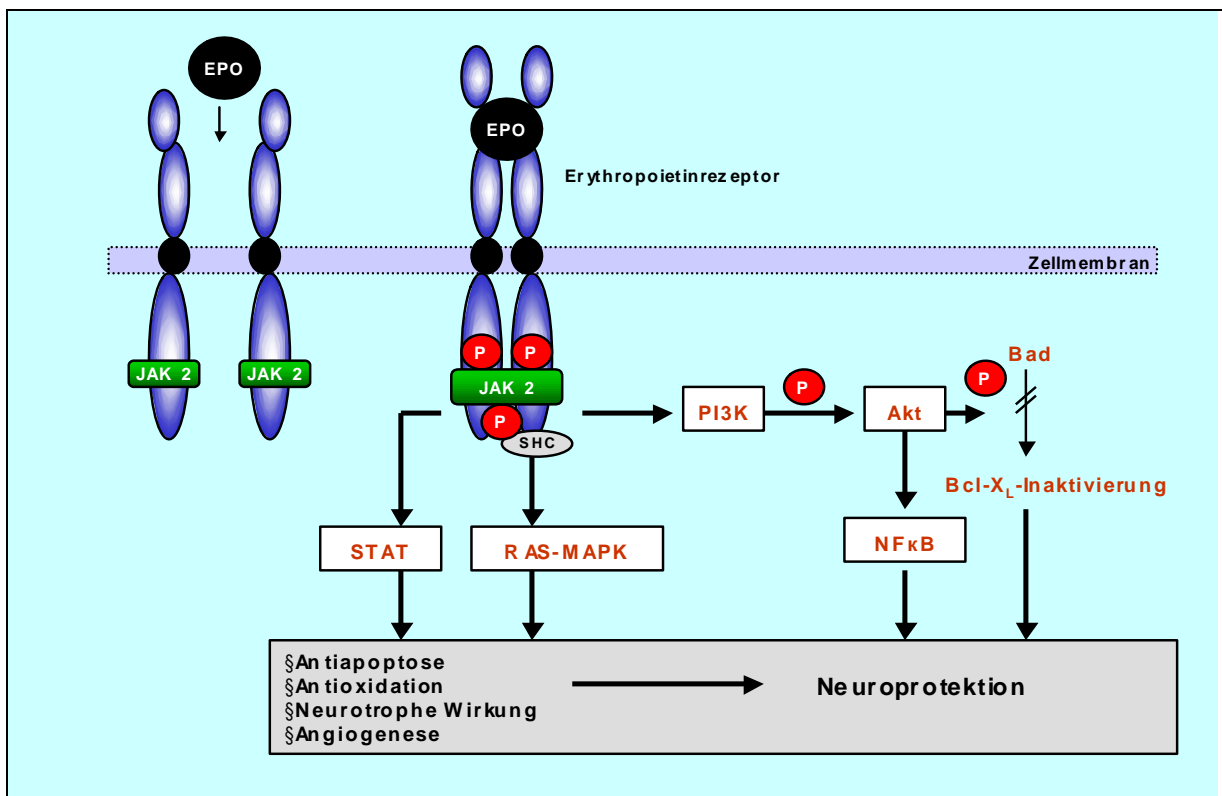


Abb. 13. Intrazelluläre Signalmechanismen des Erythropoietinrezeptors

5.4 Die klinische Relevanz Erythropoietins in Hinblick auf neuroprotektive therapeutische Ansätze bei cerebraler Ischämie

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass Erythropoietin sowohl in vitro als auch in vivo neuroprotektiv ist (s. Tabelle 1).

Krankheits-Modell	Modell	Ergebniss	Referenz
Schlaganfall	In vitro Zellkultur	deutlich geringere Apoptoserate bei Gabe rhEpo.	Liu et al. 2006
	Neuronen und Astrozyten In vivo Ratte	Schutz Dopaminergener Neurone vor Apoptose durch Gabe rhEpo	Demers et al. 2005
	In vivo Ratte	Deutlich geringere Apoptoserate und bessere motorische Fähigkeiten der Epo-Gruppe	Spandou et al. 2005
	In vitro Zellkultur	Epo induziert in kortikalen Neuronen zeit- und dosisabhängig Schutz gegen OGD	Ruscher et al. 2002
	In vivo Maus	rhEpo reduziert bei syst. Administration die Infarktgrößen nach fokaler Ischämie um 50-75%	Brines et al. 2000
	In vivo Ratte	Verkleinerung des Infarktolumens sowohl bei Epo (52%) als auch bei asialoEpo (55%)	Wang et al. 2004
Schizophrenie	In vitro Zellkultur Hippocampus Neuronen	Epo vermindert Hypoxie bzw. Haloperidol-induzierte Apoptose um 40% bzw. 30%	Ehrenreich et al. 2004
Blut-Hirn-Schranke	In vitro Zellkultur: humane mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns	Nach 6 Std. signifikante Reduktion von IL-6, IL-1 α , IL-1 β , bei Gabe von rhEPO+TNF α gegenüber TNF α	Avasarala et al. 2005
Multiple Sklerose	In vitro Zellkultur: Oligodentroyten der Ratte	Reduktion der Zytotoxizität von Interferon-gamma und Lipopolysacchariden bestimmt durch ein LDH-Assay	Genc et al. 2005
	In vivo Ratte	Verringerter IL-6 und TNF Spiegel, verzögerte Ausprägung und geringerer Schweregrad der klinischen Symptome durch Erythropoietingabe	Agnello et al. 2002
	In vivo Ratte	Ab Tag 5 deutlich geringere klinische Symptome durch rhEPO	Sättler et al. 2004
M. Parkinson	In vitro Zellkultur: embryonale Neuronen der Ratte 14. Tag In vivo Ratte	Verbessertes Überleben von transplantierten embryonalen, mesencephalen Neuronen durch Epo	Kanaan et al. 2006
ZNS Verletzung	In vivo Maus	Reduktion von Verhaltensauffälligkeiten und etwa gleiche Neuronenzahl bei Epo-Gruppe wie bei Kontrollgruppe ohne Läsion	Siren et al. 2006
	In vivo Maus	weniger motorische und kognitive Störungen, sowie reduzierte Apoptoserate um 71,4% gegenüber Kontrolle durch rhEpo	Yatsiv et al. 2005
	In vivo Maus	Epo Gruppe motorische Vorteile bei Schwimm Test	Boran et al. 2005
	In vivo Ratte	Lipidperoxidaseabfall (neurotoxische Produkte) in Epo Gruppe	Kaptanoglu et al. 2004
	In vitro Hippocampuschnitte der Ratte	Reduktion des Schadens um 30%-47% durch Epo	Adembri et al. 2004
	In vitro Zellkultur: Neuronen Hippocampus der Ratte	Um 53,5% geringere Apoptoserate um durch Epo	Viviani et al. 2005
	In vivo Ratte	Intakte Autoregulation des zerebralen Blutflusses durch Epo	Springborg et al. 2002
	In vivo Ratte	Schnellere Erholung und weniger Apoptose im ventralen (35%) und dorsalen (15%) Horn durch rhEpo	Sekiguchi et al. 2003
Retinaläsion	In vitro Zellkultur: menschl. Retinaganglienzellen	30% mehr Retinaganglienzellen und bis zu 8 mal längere Axone in Epo-Gruppe	Kretz et al. 2005
	In vivo Ratte	Verringerte Apoptoserate um 92% in Vergleich zur Kontrollgruppe durch rhEpo	Weishaupt et al. 2004
	In vivo Maus	Verringerte Apoptoserate durch rhEpo nur bei lichtinduzierter (nicht vererbter) Form der Retinadegeneration	Grimm et al. 2004

Tab. 1. Neuroprotektion durch Erythropoietin, gegliedert nach Krankheits- und Versuchsmodell, Ergebnis und Referenz

Die tierexperimentell gewonnenen Daten, die eine Protektion durch Erythropoietin nachweisen, lassen sich nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen.

Eine der letzten Enttäuschungen auf dem Feld der Neuroprotektion mit der Indikation Schlaganfall war der *SAINT II Trial (Stroke Acute Ischemic NXY-059 Treatment)*. Während im *SAINT I Trial*, ein signifikanter Vorteil für den Einsatz von CEROVIVE (NXY-059) für Patienten nach ischämischem Hirninfarkt zeigte, war dieser in einer zweiten Phase III-Studie nicht mehr nachweisbar (zusammengefasst in Sean und Fischer 2007). Ursachen für eine Diskrepanz zwischen dem Tiermodell und dem Einsatz beim Menschen sind vielfältig, z.B. die höhere Komplexität der Schadensprozesse beim Menschen, die Komorbiditäten (u.a. arterieller Hypertonus, Hyperglykämie) und die optimierten Therapiebedingungen im Tierexperiment (Grotta 1995). Aussichtsreich erscheinen die klinischen Studien der Phase I und II von Ehrenberg et al. (2002), hier fand sich eine Verbesserung des klinischen *Outcomes* nach fokaler cerebraler Ischämie durch intravenös verabreichtes rekombinantes Erythropoietin. Zusätzlich wurde mittels MRT nachgewiesen, dass bei den mit Erythropoietin behandelten Patienten die Läsionsgröße im betroffenen Hirnabschnitt signifikant kleiner war. Diese Ergebnisse werden derzeit in einer Phase III-Studie überprüft, welche Mitte 2008 voraussichtlich beendet sein wird (persönliche Mitteilung). Wie auch bei Brines et al. 2000 im Tiermodell beschrieben, ließen sich nach intravenöser Applikation des rekombinanten Erythropoietin erhöhte Spiegel der Substanz in der zerebrospinalen Flüssigkeit nachweisen. Dies bestätigt die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Erythropoietin (Ehrenberg et al. 2002, Brines et al. 2000).

Neben der klinischen Untersuchung der Neuroprotektion durch rekombinantes Erythropoietin ist es aussichtsreich auch Substanzen, die die endogene Erythropoietinbildung stimulieren, hinsichtlich ihrer neuroprotektiven Eigenschaften zu untersuchen. So wird die therapeutische Aktivierung von HIF als alternative Strategie zur Erythropoietintherapie angesehen (Bunn 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt, stimuliert peripher appliziertes DFX die Erythropoietinproduktion in vivo, eine solche Substanz könnte also auch Desferrioxamin darstellen (Prass et al. 2002).

6 Zusammenfassung

Die Präkonditionierung bezeichnet einen Mechanismus, bei dem die kurze Exposition eines Gewebes gegen eine Noxe zu einem toleranten Zustand gegen das schädigende Agens führt. Wir können eine frühe und eine späte Form unterscheiden, wobei die frühe Toleranz nach 5-120 min am ehesten durch Ionenkanal-, Rezeptor- und Proteinkinasemechanismen realisiert wird, während die späte Form nach 24-72h *de novo* Proteinsynthese benötigt. Es gibt Hinweise, dass dieses Phänomen auch beim Menschen existiert. Erythropoietin zeigte sich sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien der Phase I und II als aussichtsreicher Kandidat. Bereits seit vor mehr als 10 Jahren wurde (HIF-1) als zentraler Bestandteil der Hypoxie vermittelten Signalkaskade identifiziert. Unsere Arbeitsgruppe postuliert, dass ein präkonditionierender Stimulus, wie z.B. Hypoxie oder DFX über HIF-1 eine Erythropoietininduktion zu vermitteln. Ziel meiner Arbeit war es diese Expression sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell auf der mRNA-Ebene nachzuweisen. Der Nachweis des Erythropoietingens in neuronalen Geweben stellte eine besondere Herausforderung dar, da es sich durch eine sehr geringe *Abundance* auszeichnet. Ich habe zwei PCR-basierte Methoden zum Nachweis der Erythropoietin-mRNA-Expression etabliert, um anschließend zu untersuchen, ob präkonditionierende Stimuli eine erhöhte Expression der Erythropoietin-mRNA im Tiermodell bzw. der Zellkultur induzieren. Während ich zunächst eine semiquantitative RT-PCR etabliert habe, wurde eine ebenfalls exakte und sensitive 2. Methode mit der *Real Time* PCR realisiert. Diese Methode ist zwar technisch einfacher, Amplifikation und Detektion können in einem Schritt durchgeführt werden, allerdings war sie zu Beginn meiner Arbeit noch kein Standard.

Es wurden Ratten durch DFX, bzw. Mäuse hypoxisch präkonditioniert. Die Experimente wurden außerdem mit hypoxisch präkonditionierten Astrozytenkulturen durchgeführt. Nach Isolierung der RNA wurde diese mit Hilfe von reversen Transkriptasen in die komplementäre cDNA umgeschrieben und auf die Expression des Zielgens Erythropoietin untersucht. Die Quantifizierung dieses Gens erfolgte einerseits durch die semiquantitative kompetitive RT-PCR, andererseits wurde die Genregulation durch die quantitative *Real Time* RT-PCR, basierend auf der *Light Cycler Technology*, untersucht. Die Normierung beider Verfahren erfolgte mit Hilfe eines konstitutiv exprimierten Gens, eines sogenannten *Housekeeping Gens* (β -

Actin). Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass sowohl Hypoxie als auch Desferrioxamin das Zielgen Erythropoietin in unterschiedlichem Maße induziert. Während sich eine bis zu fünffache Induktion des Gens durch DFX-Applikation nachweisen ließ, fand sich eine bis zu siebenfache Induktion nach hypoxischer Präkonditionierung.

Nach Bindung von Erythropoietin an einem Typ 1 Zytokinrezeptor kommt es über die Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen und dem Rezeptor selbst zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Pfade, es werden in Folge zahlreiche neuroprotektive Effekte wie die Antiapoptose, die Antioxidation, neurotrophe Effekte und die Angiogenese vermittelt. Tierexperimentell gewonnene Daten, die eine Protektion durch Erythropoietin nachweisen, lassen sich nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen. Auch wenn klinische Studien der Phase I und II diesbezüglich aussichtsreich erscheinen, erfordert es weitere Untersuchungen, um die klinische Wirksamkeit von Erythropoietin zu belegen. Auch die neuroprotektive Wirkung von Substanzen, die die endogene Erythropoietinbildung stimulieren, wie z.B. DFX, ist nur im Ansatz untersucht. Es bedarf weiterer Studien, um das auch klinisch aussichtsreiche Phänomen der Präkonditionierung besser verstehen und im klinischen Alltag therapeutisch ausnutzen zu können.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Adams HP Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993;24:35-41
- 2 Alkayed NJ, Goyagi T, Joh HD, et al. Neuroprotection and P450 2C11 upregulation after experimental transient ischemic attack. *Stroke* 2002 33:1677-84
- 3 Apostolakos MJ, Schuermann WHT, Frampton MW, Utell MJ, Willey, Jc Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1993;213:277-84
- 4 Arnold BL, Itakura K, Rossi JJ. PCR-based quantitation of low levels of HIV-1 DNA by using an external standard. *Genet Anal Tech Appl* 1992;9:113-6
- 5 Astrup JJ, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. *Stroke* 1981;12:723-5
- 6 Aviv H. and Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Nat Sci* 1972; 69:1408-12
- 7 Banks WA, Jumbe NL, Farrell CL, Niehoff ML, Heatherington AC. Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. *Eur J Pharmacol* 2004;505:93-101
- 8 Bao H, Jacobs-Helber SM, Lawson AE, Penta K, Wickrema A, Sawyer ST. Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by Erythropoietin (Epo) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood* 1999 93:3757-73
- 9 Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischemiaemia in rat brain. *Eur J Neurosci* 1999;11:4159-70
- 10 Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR. Role of hypoxie-inducible factor-1 in hypoxie-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol* 2000;48:285-296
- 11 Bernardi P, Petronilli V. The permeability transition pore as amitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* 1996;28:131-7
- 12 Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000;30:271-8
- 13 Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumann-Bard P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia

in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J. Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:393-403

14 Beru M, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E. Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 1986;6:2571-5

15 Besnard NC, Andre PM. Automated quantitative determination of hepatitis C virus viremia by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:1887-9

16 Birch, DE, Kolmodin , Wong J, et al. The use of a thermally activated DNA polymerase PCR gives improved specificity, sensitivity and product yield out without additives or extra process steps. *Nature* 1996;38:445-6

17 Blanchard KL, Acquaviva AM, Galson DL, Bunn HF. Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol* 1992; 12:5373-85

18 Blondeau M, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* 2002;109:231-41

19 Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI-3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 1998;8:779-82

20 Bondurant MC, Koury MJ. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol* 1986;6:2731-3

21 Bonsdorff E, Jalavisto E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* 1948;16:150-70

22 Bouaboula M, Legoux, P, Pessegue V, et al. Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J Biol Chem* 1992;267:21830

23 Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10526-31

24 Brittenham GM, Griffith PM, Nienhuis AW, et al. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *N Engl J Med* 1994;331:567-73

25 Brooks EM, Sheflin LG, Spaulding SW. Secondary structure in the 3'UTR of EGF and the choice of reverse transcriptases affect the detection of message diversity by RT-PCR. *Biotechniques* 1995;19:806-15

26 Bruick RK, McKnight SL A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294:1337-40

- 27 Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 2007;109:868-73
- 28 Bunn HG, Gu J, Huang LE, Park JW, Zhu H. Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J Exp Biol* 1998;201:1197-201
- 29 Burda J, Hrehorovska M, Bonilla LG, et al. Role of protein synthesis in the ischemic tolerance acquisition induced by transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem Res* 2003;28:1213-9
- 30 Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93
- 31 Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7-10
- 32 Calapai G, Marciano MC, Corica F, et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharm* 2000;401:349-56
- 33 Caplan LR. In: *Caplan's Stroke: A Clinical Approach*. Butterworth-Heinemann, Boston.
- 34 Carnot C, De Flandre C. Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang. *CR Acad. Sci Paris* 1906 ;143 :432-5
- 35 Celi FS, Zenilman ME, Shuldiner AR. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 1993;21:1047
- 36 Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxie inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci* 2006;26:9471-81
- 37 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156
- 38 Chopp M, Chen H, Ho KL, et al. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology* 1989;39:1396-8
- 39 Conrad KP, Benyo DF, Westerhausen-Larsen A, Miles RM. Expression of erythropoietin by the human placenta. *FASEB J* 1996;10:760-6
- 40 Coutlée F, He Y, Saint-Antoine P. Coamplification of HIV type I and β -Globin gene DNA sequences in a nonisotopic polymerase chain reaction assay to control for amplification efficiency. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:363-71
- 41 Cox RA. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Orland 1968;12: 120-9
- 42 Dalkara T, Mowkowitz MA. The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 1994;4:49-57

- 43 Dawson DA. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc. Brain Metab* 1994;6:299-324
- 44 Delorme E, Lorenzini T, Griffin J, et al. Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry* 1992;31:9871-2
- 45 deKant E, Rochlitz CF, Herrmann R. Gene expression analysis by a competitive and differential PCR with antisense competitors. *BioTechniques* 1994;17:934-42
- 46 DeStefano JJ, Buiser RG, Mallaber LM, et al. Polymerization and RNase H Activities of the Reverse Transcriptases from Avian Myeloblastosis, Human Immunodeficiency, and Moloney Murine Leukemia Viruses Are Functionally Uncoupled. *J Biol Chem* 1990;12:7423-31
- 47 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* 1995;92:3717-20
- 48 Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001; 412:641-7
- 49 Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999 a;22:391-7
- 50 Dirnagl U, Meisel A. Zerebrale Ischämie. In: Ganten, D. (Hrsg.) *Handbuch der molekularen Medizin*, Band 5. Berlin, Deutschland: Springer Verlag, 1999 b:510-33
- 51 Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003;26:248-54
- 52 Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 1989;116:7819-22
- 53 Dube S, Fisher JW, Powell JS. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function. *J Biol chem* 1998;263:17516-21
- 54 Eastman A. Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;121:160-4
- 55 Eheleben W, Porwo T, Fandrey J, Kummer W, Acker H. Cobalt and desferrioxamine reveal crucial members of the oxygen sensing pathway in HepG2 cells. *Kidney Int* 1997;51:483-91
- 56 Ehrenreich H. Erythropoietin (EPO) – Ein neuer Ansatz zur Neuroprotektion: Von der Zelle zum Patienten. In: Nave, K-A. *Jahrbuch des Max-Planck-Institut*. 2001;235-241

- 57 Ehrenreich J, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495-505
- 58 Erlich JA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991;252:1643-51
- 59 Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *New Engl J Med* 1987;316:73-8
- 60 Fandrey J, Bunn HF. In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 1993;81:617-23
- 61 Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR : reality versus myth. *PCR. Methods Appl* 1992;2 :1-9
- 62 Figueroa YG, Chan AK, Ibrahim R, et al. NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp Hematol* 2002;30 :1419-27
- 63 Foley KP, Leonard MW, Engel JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet* 1993;9:380-5
- 64 Förster E. An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. *Bio Techniques* 1994;16:18-20
- 65 Freyer D, Manz R, Ziegenhorn A, et al. Cerebral endothelial cells release TNF- α after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol* 1999;163:4308-14
- 66 Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biotechnol* 1997;6:61-77
- 67 Gerard GF. Mechanism of action of Moloney murine leukemia virus RNA-directed DNA polymerase associated RNase. *J Biochem* 1981;20:256-265
- 68 Ginsberg MD. Adventures in the Pathophysiology of Brain Ischemia: Penumbra, Gene Expression, Neuroprotection. *Stroke* 2003;34:214-23
- 69 Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988;242:1412-5
- 70 Gopfert T, Eckardt KU, Geb B, Kurtz A. Oxygen dependent regulation of erythropoietin gene expression in rat hepatocytes. *Kidney Int* 1997;51:502-6
- 71 Gregg L, Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88:1474-80

- 72 Grotta J. Why do all drugs work in animals but none in stroke patients? 2 Neuroprotektive therapy. *J Intern Med* 1995;237:89-94
- 73 Gunter T, Gunter K, Sheu S, Gavin C. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol Soc* 1994;267:313-39
- 74 Haller H, Christel C, Dannenberg L, Thiele P, Lindschau C, Luft FC. Signal transduction of erythropoietin in endothelial cells. *Kidney Int* 1996;50:481-8
- 75 Hamrick SE, McQuillen PS, Jiang X, Mu D, Madan A, Ferriero DM. A role for hypoxia-inducible factor-1alpha in desferoxamine neuroprotection. *Neurosci Lett* 2005;379:96-100
- 76 Harris KW, Winkelmann JC. Enzyme-linked immunosorbent assay detects a potential soluble form of the erythropoietin receptor in human plasma. *Am J Hematol* 1996;52:8-13
- 77 Helms S, Graham MY, Dutchik JE, Olson MV. A new method for purifying lambda DNA from phage lysates. *DNA* 1985;4:39-49
- 78 Higuchi M, Oh-eda M, Kuboniwa J, Tomonoh K, Shimonoka Y, Ochi N. Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1992;267:7703-9
- 79 Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992;10:413-7
- 80 Ho VT, Bunn HF. Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223:175-80
- 81 Hollander M, Koudstaal PJ, Boots ML, Grobee DE, Hofman A, Breteler MM. Incidence, risk and case fatality of stroke in the elderly. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatrie* 2003;74:317-21
- 82 Hossmann, K-A. Viability threshold and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994;36:557-65
- 83 Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Aca. Sci USA* 1998;95:7987-92
- 84 Huang LE, Ho V, Arany Z, et al. Erythropoietin gene regulation depends on heme-dependent oxygen sensing and assembly of interacting transcription factors. *Kidney Int* 1997;51:548-52
- 85 Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain damage. *Trends Neurosci* 1997;20:132-9

- 86 Ishibashi R, Koziol JA, Burstein SA. Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes in vitro. *J Clin Invest* 1987;79:286-9
- 87 Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by praline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464-8
- 88 Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂ –regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-72
- 89 Jakobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313:806-10
- 90 Jiang B-H, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996;271:17771-8
- 91 Jiang B-H, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α : modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 1997;272:19253-60
- 92 Kapinya KJ, Prass K, Dirnagl U. Isoflurane induced prolonged protection against cerebral ischemia in mice: a redox sensitive mechanism? *Neuroreport* 2002;13:1431-5
- 93 Katsura K, Kristian T, Siesjo BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 1994;22:991-6
- 94 Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Masuda S, Sasaki R, Mikawa H. Human recombinant erythropoietin directly stimulates B cell immunoglobulin production and proliferation in serum-free medium. *Clin Exp Immunol* 1991;85:151-6
- 95 Kirino T. Ischemic Tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:1283-96
- 96 Knabe W, Knerlich F, Washausen S, et al. Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. *Anat Embryol (Berl)* 2004;207:503-12
- 97 Kobayashi S, Harris VA, Welsh FA. Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:721-7
- 98 Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU. Incidence, etiology an long-term prognosis of stroke. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2002;70:657-62
- 99 Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res* 1993;643:334-7

100 Koury ST, Bondurant MC, Cario J, Garber SE. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: Correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* 1989;74:645-51

101 Koury ST, Bondurant MC, Klury MJ, Senenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 1991;77:2497-503

102 Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 1988;71:524-47

103 Kubatzky KK, Ruan W, Gurezka R, et al. Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol* 2001;11:110-5

104 Lacombe C, DaSilva J-L, Bruneval P, et al. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 1988;81:620-3

105 Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* 1998;83:724-32

106 Leist M, Ghezzi P, Grasso G, et al. Derivatives of Erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004;305:239-42

107 Lin FK, Suggs S, Lin CH. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:7580-4

108 Liss B. Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucl Acid Res* 2002;30:89

109 Liu ZY, Chin K, Noguchi CT. Tissue specific expression of human erythropoietin receptor in transgenic mice. *Dev Biol* 1994;166:159-69

110 Liu C, Shen K, Liu ZY, Noguchi CT. Regulated Human Erythropoietin Receptor Expression in Mouse Brain. *J Biol Chem* 1997;272:396-400

111 Livuahu O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DC, Jokiffe CK, Wilson, TA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 1999;283:987-1000

112 Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

113 Malhotra S, Savitz, SI, Ocava L, Rosenbaum DM. Ischemic preconditioning is mediated by erythropoietin through PI-3 kinase signaling in an animal model of transient ischemic attack. *Stroke* 2006;37:19-27

- 114 Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997;386:403-7
- 115 Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eu. J Neurosci* 1996;8:666-76
- 116 Mason-Gracia M, Beckman BS, Brookins JW, et al. Development of a new radioimmunoassay for erythropoietin using recombinant erythropoietin. *Kidney Int* 1990;38:969-75
- 117 Masuda S, Chikuma M, Sasaki R. Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res* 1997;746:63-70
- 118 Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994;269:19488-19493
- 119 Matsushima K, Hakim AM. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke* 1995;26:1047-52
- 120 Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factor for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5
- 121 McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980;85:890-902
- 122 Meisel, A, Prass K, Wolf T, Dirnagl U. Neurological Disorders Epidemiology, Clinical Overview and Model Systems: In: Bähr, M, ed. *Stroke. Neuroprotektion. Models, Mechanisms and Therapies*. Weinheim, Deutschland: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004: 1-22
- 123 Miesfeld RL, Wiley, J & Sons. *Applied Molecular Genetics*. Wiley & Sons; Inc. Publications, 1999: 143-51
- 124 Miller BA, Perez RS, Shah AR, Gonzales ER, Park TS, Gidday JM. Cerebral protection by hypoxic preconditioning in a murine in focal ischemia-reperfusion. *Neuroreport* 2001;12:1663-9
- 125 Miura O, D'Andrea A, Kabat D, Ihle JN. Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol Cell Biol* 1991;11:4895-902
- 126 Miyake T, Kung CKH, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977;252:5559-64
- 127 Moley KH, Mueckler MM. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* 2000;5:99-105

- 128 Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 2000;54:2089-94
- 129 Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997;76:105-116
- 130 Mu D, Chang YS, Vexler ZS, Ferriero DM. Hypoxia-inducible factor 1 α and erythropoietin upregulation with deferoxamine salvage after neonatal stroke. *Exp Neurol* 2005;195:407-15
- 131 Nakamura Y, Nakauchi H. A truncated erythropoietin receptor and cell death: a reanalysis. *Science* 1994;264:588-9
- 132 The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke study Group Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995;333:1581-7
- 133 Nishio S, Yunoki M, Chen ZF, Anzivino MJ, Lee KS. Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning. *J Neurosurg* 2000;93:845-51
- 134 Obrenovitch T. The ischaemic penumbra: twenty years on. *Cerebrovasc. Brain Metab* 1995;7:297-323
- 135 Parker RM, Barnes NM. mRNA: detection by in situ and northern hybridization. *Meth Mol Biol* 1999;106:247-83
- 136 Phillis JW, O'Regan MH. A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. *Brain Research Rev* 2004;44:13-47
- 137 Poeck K, Werner, H. Zerebrale Durchblutungsstörungen: Ischämische Infarkte. In: *Neurologie*. 10. Auflage, Berlin, Deutschland: Springer Verlag, 1998: 183-235
- 138 Prass K, Wiegand F, Schumann P, et al. Hyperbaric oxygenation induced tolerance against focal cerebral ischemia in mice is strain dependent. *Brain Res* 2000;871:146-50
- 139 Prass K, Ruscher K, Karsch M, et al. Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:520-5
- 140 Prass K, Scharff A, Ruscher K, et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* 2003;34:1981-6

- 141 Pugh CW, Ebert BL, Ebrahim O, Ratcliffe PJ. Characterisation of functional domains within the mouse erythropoietin 3'enhancer conveying oxygen regulated responses in different cell lines. *Biochem Biophys Acta* 1994;1217:297-306
- 142 Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993;262:695-700
- 143 Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* 2002;22:10291-301
- 144 Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, et al. Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 1998;254:117-20
- 145 Ruscher K, Reuter M, Kupper D, Trendelenburg G, Dirnagl U, Meisel A. A fluorescence based non-radioactive electrophoretic mobility shift assay. *J Biotechnol* 2000;78:163-70
- 146 Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998;17:3005-15
- 147 Saccomanno CF, Bordonaro M, Chen JS, Nordstrom JL. A faster ribonuclease protection assay. *Biotech* 1992;13:846-50
- 148 Sadamoto Y, Igase K, Sakanka M, et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:26-32
- 149 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology* 1985;24:476-80
- 150 Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:4635-40
- 151 Sandercock PA, Warlow CP, Jones LN, Starkey IR. Predisposing factors for cerebral infarction: the Oxfordshire community stroke project. *Br med J* 1989;298:75-80
- 152 Sanger F, Coulson AR. A rapid Method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA Polymerase. *J Mol Biol* 1975;94:441-8
- 153 Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990;21:1086-90
- 154 Sean IS, Fisher M. Future of Neuroprotection for Acute Stroke: In the Aftermath of the SAINT Trials. *Ann neurol* 2007;61:396-402

- 155 Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxie-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5680-4
- 156 Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54
- 157 Semenza GL, Jiang B-H, Leung SW, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996;271:32529-37
- 158 Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:437-48
- 159 Shimizu K, Lacza Z, Rajapakse N, Horiguchi T, Snipes J, Busija DW. MitoK(ATP) opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:1005-11
- 160 Sieff CA, Nathan DG. Haematopoietic stem cells. In: Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warren DA, eds. *Oxford Textbook of Medicine*, 3. ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 1996: 3381-90
- 161 Siegling A, Lehmann M, Platzer C, Emmrich F, Volk H-D. A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J Immunolog Methods* 1994;177: 23-8
- 162 Sims MR, Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochem Int* 2002;40:511-26
- 163 Sinor AD, Greenberg DA. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett* 2000;290:213-215
- 164 Siren AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:4044-9
- 165 Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 2001;101:271-276
- 166 Spandou E, Papoutsopoulou S, Soubasi V, et al. Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res* 2004;1021:167-72
- 167 Stagliano NE, Pérez-Pinzón MA, Moskowitz MA, Huang PL. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cerebral Blood Flow Metab* 1999;19:757-61
- 168 Steiger HJ, Hanggi D. Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms an applications. *Acta Neurochir* 2007;149:1-10

169 Strong AJ, Venbles GS, Gibson G. The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: I. Topography of changes in blood flow; potassium ion activity; and EEG. *J Cereb Blood Flow* 1983; 3:86-96

170 Swift GH, Peyton MJ, MacDonald RJ. Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques* 2000;28:524-31

171 Tabira T, Konishi Y, Gallyas Jr F. Neurotrophic effect of hematopoietic cytokines on cholinergic and other neurons in vitro. *Int J Dev Neurosci* 1995;13:241-52

172 Tan CC, Eckardt KU, Ratcliffe PJ. Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int* 1991;40:69-76

173 Todokoro K, Sugiyama M, Nishida E, Nakaya K. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade through erythropoietin receptor. *Biochem Biophys Res* 1994;203:1912-9

174 Tracy S. Improved rapid methodology for the isolation of nucleic acids from agarose gels. *Prep Biochem* 1981;11:251-68

175 Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991;71:1185-95

176 Trendelenburg G, Prass K, Priller J, et al. Serial Analysis of Gene Expression Identifies Metallothionein-II as Major Neuroprotective Gene in Mouse Focal Cerebral Ischemia. *J Neurosci* 2002;22:5879-88

177 Ueda M, Walker PD, Hsu SM, Shah SV. Activation of a 15-kDa endonuclease in hypoxia/reoxygenation injury without morphologic features of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:7202-6

178 Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-3

179 Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5510-4

180 Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993;82:3610-5

181 Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1230-7

182 Wang H, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9717-21

183 Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 2004;18:1462-4

184 Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, et al. Transient Ischemic Attacks Before Ischemic Stroke: Preconditioning the Human Brain? A Multicenter Magnetic Resonance Imaging Study. *Stroke* 2004;35:616-21

185 Weih M, Amberger M, Villringer A, et al. Prior transient ischemic attacks and hemispheric stroke size: neuroradiologic findings in ischemic tolerance. *Eur J Neurosci* 2000;12:233

186 Weih M, Harms L, Dirnagl U, Kallenberg K, Einhüpl KM. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: Is it ischemic tolerance? *Stroke* 1999;30:1851-4

187 Weih M, Prass K, Ruscher K, et al. Ischemia tolerance; model for research, hope for clinical practice? 2001;72:255-60

188 Weis JH, Tan SS, Martin BK, Wittwer CT. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet* 1992;8:263-4

189 Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Guenet J-L, Gassmann M. Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor 1 α . *Biochem biophys Res Commun* 1996;223:54-59

190 Wiegand F, Liao W, Busch C, et al. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:1229-37

191 Wiener CM, Booth G, Semenza GL. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:485-8

192 Wilson IG. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl Environment Microbiol* 1997;63:3741-51

193 Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques* 1997;22:176-81

194 Wolf T, Lindauer U, Reuter U, et al. noninvasive Near infrared Spectroscopy Monitoring of Regional Cerebral Blood Oxygenation Changes During Peri-Infarct Depolarizations in Focal Cerebral Ischemia in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:950-4

195 Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish JF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 1995;377:242-6

196 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* 2005;61:189-95

197 Xia H-Z, Kepley CL, Sakai K, Chelliah Irani A-MA, Schwartz LB. Quantitation of Tryptase, Chymase, FcεR1γ mRNAs in human mast cells and basophils by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction, *J Immunol* 1995;154:5472-80

198 Yin DX, Schimke RT. BCL-2 expression delays drug-induced apoptosis but does not increase conogenic survival after drug treatment in HeLa cells. *Cancer Res* 1995;55:4922-8

199 Youssoufian J, Lonmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish HF. Structure, Function and Activation of the Erythropoietin Receptor. *Blood* 1993; 78:2557-63

200 Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR. Liver as the primary site of erythropoietin production in the fetus. *J Lab Clin Med* (1977) 89:640-4

201 Zanjani ED, Ascensao JL, McGave PB, Banisadre M, Ash RC. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest* 1981;67:1183-1188

202 Zhang J, Byrne CD. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem J* 1999;15:231-41

203 Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signalling pathway. *Blood* 2006;107:907-15

204 Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:523-6

205 Zimmermann C, Ginis I, Furuya K, et al. Lipopolysaccharide-induced ischemic tolerance is associated with increased levels of ceramid in brain and in plasma. *Brain Res* 2001;895:59-65

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ulrich Dirnagl für die Möglichkeit in der Experimentellen Neurologie der Charité die Doktorarbeit durchführen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Andreas Meisel für die Bereitstellung des Themas und die jahrelange fachliche Betreuung. Durch seine konstruktive Kritik, die fachliche Kompetenz und seine Anregungen ist diese Arbeit erst möglich geworden.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Claudia Muselmann (MTA) bedanken. Sie hat mich mit viel Geduld in die molekularbiologischen Arbeitstechniken eingewiesen und hat mir damit die Tür zu der experimentellen Arbeit geöffnet.

Bei Dr. Konstantin Prass, Dr. Karsten Ruscher und Dr. Krisztián Kapinya möchte ich mich für die hervorragende Zuarbeit bei den tierexperimentellen Arbeiten bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern bedanken, ohne sie wäre weder ein Studium noch eine Doktorarbeit überhaupt möglich gewesen. Auch meinem Mann danke ich hier recht herzlich, denn seine Geduld und die Ausdauer mit der sowohl er, als auch mein Vater, diese Arbeit korrigiert haben, weiß ich sehr zu schätzen.

Veröffentlichungen

Aus Teilen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

**Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain:
Evidence from an in vitro model.**

Karsten Ruscher, Dorette Freyer, **Maria Karsch**, Nikolai Isaev, Dirk Megow, Birgit Sawitzki, Josef Priller, Ulrich Dirnagl und Andreas Meisel

The Journal of Neuroscience 2002,22:10291-301

**Desferrioxamine Induces Delayed Tolerance Against Cerebral Ischemia *in Vivo*
and *In Vitro*.**

Konstantin Prass, Karsten Ruscher, **Maria Karsch**, Nikolay Isaev, Dirk Megow, Josef Priller, Anna Scharff, Ulrich Dirnagl und Andreas Meisel

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2002;22:520-25

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Maria Hufnagel, erkläre, dass ich die vorgelegt Dissertationsschrift mit dem Thema: `Genexpression von Erythropoietin durch Präkonditionierung des Zentralnervensystems´ 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.“

Maria Hufnagel

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.