

**Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck
(Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann)**

**vertreten in der Sektion für Informatik/Technik und Naturwissenschaften
durch das Institut für Biochemie (Direktor: Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld)**

Extrarenale Beeinflussung der renalen Synthese von Erythropoietin

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion für Informatik/Technik und Naturwissenschaften -**

**vorgelegt von
Ursula Gertrud von Wussow
aus Rio de Janeiro/Brasilien**

Lübeck 2010

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. J. Westermann

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. S. Anemüller

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. H. Pagel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2011

zum Druck genehmigt: Lübeck, den 19.01.2011

Für B.

Glaubt nicht dem Hörensagen und heiligen Überlieferungen, nicht Vermutungen oder eingewurzelten Anschauungen, auch nicht den Worten eines verehrten Meisters; sondern was ihr selbst gründlich geprüft und euch selbst und anderen zum Wohle dienend erkannt habt, das nehmt an.

Buddha

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 HISTORISCHE ASPEKTE	1
1.2 ERYTHROPOIETIN	2
1.3 DER ERYTHROPOIETINREZEPTOR (EPOR)	3
1.4 ERYTHROPOIESE	4
1.5 ORTE DER ERYTHROPOIETIN-SYNTHESE	6
1.6 REGULATION DER RENALEN ERYTHROPOIETIN-PRODUKTION	7
1.7 SAUERSTOFFSENSING IM NIERENKORTEX?	10
1.8 HYPOTHALAMUS UND HYPOPHYSE	13
1.8.1 HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSE UND HYPOXIE	14
1.9 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	15
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 <i>IN-VIVO</i> -VERSUCHE	17
2.1.1 VERSUCHSTIERE	17
2.1.2 VERSUCHSVORBEREITUNG	17
2.1.3 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	19
2.1.3.1 ERZEUGUNG EINER CEREBRALEN HYPOXIE DURCH ERHÖHUNG DES INTRAKRANIELLEN DRUCKES	19
2.1.3.2 PRÜFUNG DES SAUERSTOFFPARTIALDRUCKES IM GEHIRN	19
2.1.3.3 MESSUNG DES RENALEN BLUTFLUSSES UNTER EINFLUSS EINER CEREBRALEN HYPOXIE	20
2.1.3.4 ERZEUGUNG EINER ANÄMISCHEN HYPOXIE DURCH ABSENKUNG DES HÄMATOKRITS	20
2.1.4 VERSUCHSGRUPPEN	21
2.1.5 PROBENENTNAHME	21
2.1.6 ORGANENTNAHME	21

2.1.7	MIKRODIALYSE IM HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSENBEREICH	22
2.2	IN-VITRO-VERSUCHE	23
2.2.1	VERSUCHE IN DER ZELLKULTUR	23
2.2.1.1	ZELLINIEN	24
2.2.2	KULTIVIERUNG DER ZELLEN	24
2.2.3	BEHANDLUNG DER ZELLEN	24
2.2.3.1	STIMULATION DER ERYTHROPOIETIN-PRODUKTION DURCH HYPOXIE	24
2.2.3.2	NORMOXISCHE INDUKTION DER ERYTHROPOIETIN-PRODUKTION	25
2.3	PROTEOMANALYSEN	25
2.3.1	DAS PROTEOM	25
2.3.2	UNTERSUCHUNG DES PROTEOMS	26
2.3.3	PROTEINANALYTIK	26
2.3.3.1	PROTEINEXTRAKTION UND BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	26
2.3.3.2	2D-GELELEKTROPHORESE	27
2.3.3.3	AUSWERTUNG DER 2-D GELE MITTELS SOFTWARE	31
2.3.3.4	IDENTIFIKATION DER PROTEINSPOTS MITTELS MALDI-MS	33
2.4	ANALYTIK	34
2.4.1	BESTIMMUNG DER ERYTHROPOIETIN-KONZENTRATION	34
2.4.2	MRNA EXTRAKTION AUS GEWEBEN	35
2.4.3	QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASEKETTENREAKTION (QRT-PCR) NACH REVERSE TRANSKRIPTION	36
2.4.3.1	REVERSE TRANSKRIPTION (CDNA SYNTHESE)	36
2.4.3.2	QRT-PCR	36
2.4.3.3	PRIMER UND PROGRAMME:	37
2.4.4	WESTERN BLOT	37

3. ERGEBNISSE **40**

3.1	EINFLUSS DER INTRAKRANIELLEN DRUCKERHÖHUNG AUF VERSCHIEDENE KREISLAUF- UND SYSTEMISCHE PARAMETER	40
3.2	EINFLUSS DER ERHÖHUNG DES INTRAKRANIELLEN DRUCKES AUF DEN RENALEN BLUTFLUSS	45
3.3	MESSUNG DER ERYTHROPOIETIN-KONZENTRATION NACH ERHÖHUNG DES ICP BEI HYPOPHYSEKTOMIERTEN TIEREN	46
3.4	VERGLEICH EINER GESTEIGERTEN ERYTHROPOIETIN-PRODUKTION DURCH EINE LOKALE UND SYSTEMISCHE HYPOXIE	47
3.5	EINFLUSS EINER LOKALEN BZW. SYSTEMISCHEN HYPOXIE AUF DIE ERYTHROPOIETIN-GENEXPRESSION IN VERSCHIEDENEN HIRNAREALEN	48
3.6	INDUKTION EINER GESTEIGERTEN ERYTHROPOIETIN-SYNTHESE IN DER LEBER DURCH EINE CEREBRALE UND SYSTEMISCHE HYPOXIE	52
3.7	STIMULATION DER ERYTHROPOIETIN-PRODUKTION DURCH HYPOPHYSENDIALYSATE <i>IN-VITRO</i>	54
3.7.1	STIMULATION DER ERYTHROPOIETIN-PRODUKTION DURCH HYPOPHYSENDIALYSATE IN EINER HEPATOM-ZELLINIE	54
3.7.2	STIMULATION DER ERYTHROPOIETINPRODUKTION DURCH HYPOPHYSENDIALYSATE IN EINER NIERENFIBROBLASTEN-ZELLINIE	57
3.8	VERÄNDERUNGEN DES HYPOPHYSÄREN PROTEOMS NACH CEREBRALER UND SYSTEMISCHER HYPOXIE	59

4. DISKUSSION **72**

4.1	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER ERYTHROPOIETIN-SYNTHESE, REAKTION DES KÖRPERS AUF VERSCHIEDENE HYPOXIEFORMEN	72
4.2	BEDEUTUNG DER ERYTHROPOIETIN-SYNTHESE IM GEHIRN	76

4.3	HYPOXISCHER EINFLUSS AUF DIE ERYTHROPOIETIN-GENEXPRESSION UND PROTEINSYNTHESE IN DER ADULTEN LEBER	78
4.4	STIMULATION DER ERYTHROPOIETIN-GENEXPRESSION IN DER ZELLKULTUR DURCH MIKRODIALYSATE AUS DEM HYPOXISCHEN HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSENBEREICH	79
4.5	VERÄNDERUNG DES HYPOPHYSENPROTEOMS NACH LOKALER CEREBRALER HYPOXIE UND ANÄMIE	82
5.	<u>KONKLUSION</u>	<u>92</u>
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>96</u>
7.	<u>LITERATUR</u>	<u>97</u>
8.	<u>ANHANG</u>	<u>116</u>
8.1	VERWENDETE SUBSTANZEN UND TEST-KITS	116
8.2	VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE	118
8.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	119
8.4	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	122
	LEBENS LAUF	124
	SCHRIFTEN UND VORTRAGSVERZEICHNIS	126
	DANKSAGUNG	129
	ERKLÄRUNG	130

1. Einleitung

1.1 Historische Aspekte

Schon in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde man sich der bedeutenden Rolle des Erythrozyten als Sauerstofftransporter in unserem Körper bewusst. Zahlreiche wegweisende Untersuchungen, so wie die Entwicklung der Blutgasanalyse durch H. Gustav Magnus um 1840, die Struktur- und Funktionsanalyse des Hämoglobins durch Felix Hoppe-Seyler um 1860, sowie Arbeiten über die Gewebeatmung und die Hämatopoiese ermöglichten ein besseres Verständnis über die Versorgung des Organismus mit Sauerstoff und der dazu benötigten zellulären Bestandteile des Blutes. Der französische Atmungsphysiologe Paul Bert (Bert 1878) und sein Mentor Dennis Jourdanet (Jourdet 1863) beobachteten unabhängig voneinander während Exkursionen im Hochgebirge, dass die Konzentration der Erythrozyten im Blut von der Sauerstoffversorgung des Organismus abhängt. Beide nahmen jedoch fälschlicherweise an, dass die an Tier und Mensch beobachteten Polyglobulien erblich bedingt seien. Im selben Jahr noch wurde diese These von dem französischen Anatom Viault (Viault 1890) widerlegt. Auf einer Reise in die Anden stellte er nach einiger Zeit an sich und seinen Begleitern eine Erhöhung der Erythrozytenzahl von 5 auf 8 Millionen/ μ l Blut fest. Er schloss daraus, dass bei erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck im Blut die Zahl der roten Blutkörperchen akut ansteigt.

Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde die Idee einer hormonellen Regulation der Erythropoiese formuliert. 1906 postulierten Paul Carnot, Professor der klinischen Medizin an der Sorbonne in Paris, und seine Mitarbeiterin Catherine Deflandre die Existenz des „Hemopoiétine“, eines im Serum enthaltenen hämatopoietischen Hormons, welches die Blutbildung stimuliere (Carnot und Deflandre 1903). Damit widerlegten sie die bis dahin vorherrschende Idee, dass das Knochenmark selbst auf einen Abfall des Sauerstoffpartialdruckes reagiert. Die heute übliche Bezeichnung Erythropoietin wurde 1948 von Bonsdorff und Jalavisto eingeführt (Bonsdorff und Jalavisto 1948).

Fast eine Dekade später erkannten Leon Jacobson und seine Mitarbeiter, dass der Niere eine eminente Bedeutung bei der Synthese von Erythropoietin zukommt (Jacobson *et al.* 1957). Nach beidseitiger Nephrektomie bei Ratten reagierten diese nicht mit gesteigerten Plasmaerythropoietin-Konzentrationen als Antwort auf einen hypoxischen Reiz oder Cobaltgabe. Im Jahre 1961 wiesen Fisher und Birdwell sowie Kuratkowska *et al.* erstmals Erythropoietin im Perfusat isolierter Nieren nach.

Ungeachtet all dieser Befunde wurde lange Zeit diskutiert, ob Erythropoietin tatsächlich in

der Niere gebildet wird, denn bis dahin war es noch nicht gelungen, das Hormon aus der Niere zu extrahieren. Ende der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts kam die sogenannte Erythrogin-Hypothese auf. Albert Gordon und seine Mitarbeiter postulierten, dass die Niere bei Sauerstoffmangel das Enzym Erythrogin bildet, welches Erythropoietin aus einem Plasmaeiweiß abspaltet. Diese Hypothese gelangte damals in etliche Lehrbücher und gilt heute als überholt, da ein solches Enzym bis dato noch nicht identifiziert werden konnte. Zweifel an der Erythrogin-Hypothese kam überdies auf, als Erslev 1974 nach serumfreier Perfusion von Kaninchennieren im Perfusionsmedium Erythropoietin nachweisen konnte (Erslev 1974). Im Jahre 1981 gelang die Extraktion größerer Mengen dieses Hormons aus der Niere hypoxischer Ratten (Jelkmann & Bauer 1981).

Forschergruppen aus Boston (Genetics Institute) und Thousand Oaks (Amgen) klonierten 1985 unabhängig voneinander das Erythropoietin-Gen. Dies ermöglichte die Herstellung von Erythropoietin mithilfe gentechnischer Methoden, wobei das Erythropoietin-Gen zur Transfektion mit anderem genetischen Material (Plasmid und Antibiotikaresistenzgen) kombiniert wurde. Bei der pharmazeutischen Produktion des rekombinanten humanen Erythropoietins (rhEPO) bediente man sich Zellkulturen aus dem Ovar von chinesischen Hamstern (CHO-Zellen) und den Nieren von juvenilen Hamstern (BHC).

Heute zählt die Behandlung mit rhEPO zur Standardtherapie bei renalen und nicht renal bedingten Anämien, wie z. B. Tumoranämien, Anämien aufgrund einer Chemo- oder Strahlentherapie sowie der Anämie chronischer Entzündungen.

1.2 Erythropoietin

Das humane Erythropoietin ist ein saures Glycoprotein-Hormon mit einer molekularen Masse von etwa 30 kDa, welches durch Abspaltung von 27 Aminosäuren aus einem Prohormon mit 193 Aminosäuren entsteht (Recny *et al.* 1987). Der Proteinanteil des zirkulierenden Erythropoietins besteht aus einer einzelnen Peptidkette von 166 Aminosäuren. Die Strukturstabilität der Peptidkette beruht auf der Ausbildung von zwei Disulfidbrücken der vier Cysteinreste, wobei Cystein 7 mit 161 und 29 mit 33 durch Disulfidbrücken verbunden sind (Lappin *et al.* 1989). Etwa 40% des Molekulargewichtes stellen Zuckerreste dar, die aus vier verzweigten Polysaccharidkomplexen bestehen (Narhi *et al.* 1991). Drei dieser Komplexe sind an Asparaginsäurereste in Position 24, 38 und 83 der Kette über ein Stickstoffatom verankert, während der vierte am Serin in Position 126 über ein Sauerstoffatom gebunden vorliegt und keine funktionelle Bedeutung zu haben scheint (Takeuchi *et al.* 1990, Wasley

et al. 1991, Delorme *et al.* 1992). Die über den Stickstoff verankerten Polysaccharide weisen interindividuelle strukturelle Unterschiede auf. Vor allem unterscheiden sie sich in der Anzahl der terminalen Sialinsäurereste. Die Anzahl dieser Reste terminiert die Lebensdauer des Hormons, da im Organismus durch Desialinisierung Galaktosereste der Zuckerketten freigelegt werden. Durch Bindung der Galaktosereste an spezifische Rezeptoren der Membran von Leberzellen wird das Hormon dann internalisiert (Lukowsky & Painter 1972). Zusätzlich scheint die Lebenszeit des Hormons von dem Verhältnis der quatroantennaren zu den diantennaren N-gebundenen Oligosacchariden abzuhängen (Takeuchi *et al.* 1989). Wahrscheinlich schützen die quatroantennaren das Erythropoietin vor dem renalen Abbau (Misaizu *et al.* 1995).

Das humane Erythropoietin-Gen liegt als einfache Kopie auf der Mitte des langen Armes von Chromosom 7 in der Region q11-q22 (Powell *et al.* 1986). Die genomische DNA mit einer Größe von 5,4 Kilobasenpaaren ist in 5 Exons und 4 Introns unterteilt (Lin *et al.* 1985). Die Exons enthalten die codierende Sequenz für das Propeptid und zusätzlich die davor und dahinter liegenden nicht translatierten Sequenzen (Recny *et al.* 1987).

Das Erythropoietin-Gen ist durch das ganze Tierreich recht gut konserviert, dies gilt insbesondere für die Säugetiere.

1.3 Der Erythropoietinrezeptor (EPOR)

Die Zytokinrezeptoren sind im Allgemeinen gut charakterisiert. Die hauptsächliche Funktion des Erythropoietins liegt in der Aggregation der Rezeptoren untereinander und mit den Janus-Kinasen (JAKs) (Ihle & Kerr 1995). EPOR gehört zur Zytokin-Rezeptor-Familie Typ 1 und wird nach Bindung seines Liganden durch Dimerisierung und Assoziation mit JAK2 aktiviert (Watowich *et al.* 1992, Miura *et al.* 1994, Ferrag *et al.* 1998). Resultat der Interaktion zwischen EPOR und JAK2 ist die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der JAK2. Die so aktivierten Janus-Kinasen phosphorylieren eine Reihe von intrazellulären Proteinen, unter anderem den EPOR (Witthuhn *et al.* 1993) und die STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription); (Ihle *et al.* 1995). Im Falle der JAK2 wird STAT5 aktiviert, welcher in den Kern transloziert und nach Bindung der DNA die Transkription beeinflusst (Tilbrook & Klinken 1999). Die Inaktivierung der Erythropoietin-Wirkung am EPOR erfolgt durch Dephosphorylierung der JAK2 durch die Tyrosin-Phosphatase SH-PTP1, die an die c-terminale intrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet (Klingmueller *et al.* 1995, Bittorf *et al.* 1997).

Der aktivierte EPOR transduziert nicht nur mitogene Signale, sondern induziert auch die Differenzierung der erythrozytären Vorläuferzellen (Maruyama *et al.* 1994).

Das Gen für den humanen EPOR liegt auf Chromosom 19 und codiert ein 55-kDa-Polypeptid, welches aus 508 Aminosäuren besteht (Budarf *et al.* 1990). Physiologisch liegt das Protein glykosyliert vor, was zu einer Größe von 63-66 kDa des Rezeptors führt (Jones *et al.* 1990).

1.4 Erythropoiese

Da zirkulierende Erythrozyten keinen Zellkern und keine Mitochondrien besitzen, ist ihre Lebenszeit begrenzt. Nach 100-120 Tagen werden sie über den Milzsinus ausgesondert und durch Makrophagen des mononukleären Phagozytosesystems im Knochenmark, in Lymphknoten, Milz und Leber abgebaut. Zur Aufrechterhaltung des Atemgastransportes im Körper müssen daher kontinuierlich Erythrozyten gebildet werden. Erythrozyten entstammen pluripotenten Stammzellen, die sich beim Fötus in Milz und Leber, beim Adulten im roten Knochenmark finden. Während der fünf- bis siebentägigen Entwicklung zu funktionsfähigen Erythrozyten durchlaufen die erythrozytären Vorläuferzellen zehn bis zwölf Teilungs- bzw. Differenzierungsstadien (Wu *et al.* 1995). Erythropoietin wird hier, und insbesondere während der frühen Differenzierungsphasen, als spezifischer Wachstumsfaktor benötigt (Koury & Bondurant 1992). So werden aus lymphoid-hämatogenen Stammzellen (CFU-LH) unter Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Interleukin: IL-3 und IL-4; granulocyte-macrophage colony stimulating factor GM-CSF) Vorläuferzellen der lymphatischen Reihe sowie die gemeinsamen Vorläufer der Granulozyten, Monozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten (CFU-GEMM; vergl. Abb.1). In einem weiteren Differenzierungsschritt entstehen aus den CFU-GEMM die gemeinsamen Vorläufer der Granulozyten und Monozyten (CFU-GM), der Megakaryozyten (CFU-MEG) und der Erythrozyten (BFU-E). Die BFU-E stellen die frühesten erythroidären Vorläuferzellen dar. Die Abbreviationen CFU (engl., colony forming unit) und BFU (engl., burst forming unit) leiten sich von dem Verhalten der Zellen bei der Kultivierung aus Knochenmarkszellen ab. CFU-E proliferieren unter dem Einfluss von Erythropoietin zu Kolonien von 8 bis zu 64 Erythroblasten, während aus den BFU-E über 1000 Zellen hervorgehen.

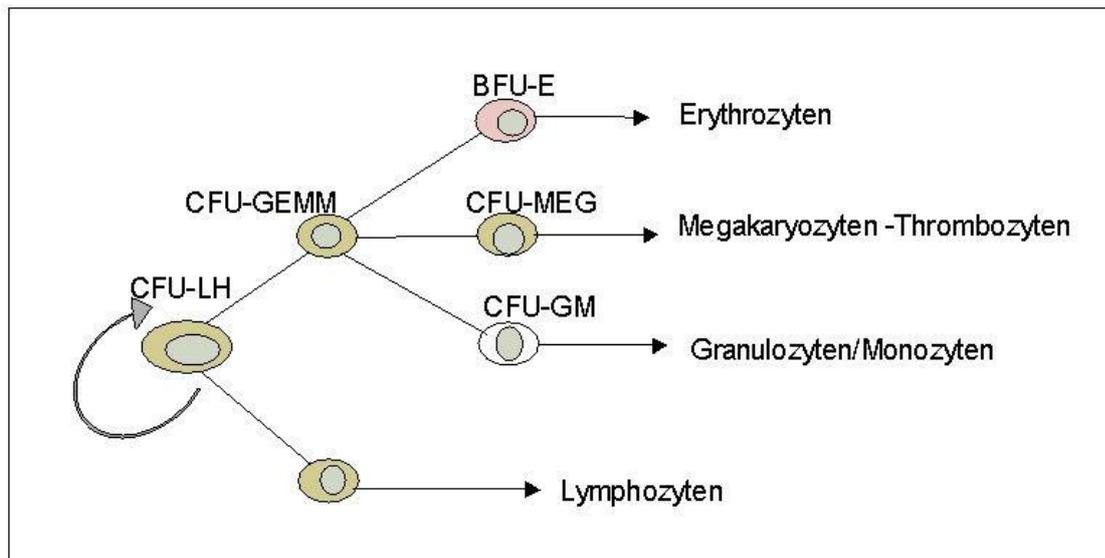


Abb.1: Schematische Darstellung der Hämatopoiese

Unter dem Einfluss spezifischer Zytokine und Wachstumsfaktoren entwickeln sich aus den pluripotenten, sich zeitlebens selbst erneuernden lymphoid- und hämatogenen Stammzellen (CFU-LH) die Vorstufen aller im Blut vorkommenden Zellen.

Unter dem Einfluss von Erythropoietin entwickeln sich die BFU-E zu CFU-E, wobei die Erythropoietin-Effekte durch membranständige Rezeptoren auf der Zelloberfläche der BFU-E Membran vermittelt werden (Abb.2). Das Hauptziel des Erythropoietins sind jedoch die CFU-E, die unter diesem Einfluss weiter proliferieren. Die hohe Affinität des Erythropoietins zu den CFU-E lässt sich mit ihrer bis zu 1000 Rezeptoren ausgestatteten Zelloberfläche erklären (D'Andrea & Zon 1990). Durch Anlagerung von Erythropoietin an diese Rezeptoren der Zytokin-Rezeptor-Familie Typ1 wird die Apoptose der ständig gebildeten Vorläufer verhindert und deren RNA- und DNA-Synthese, Zellteilung sowie die Hämoglobinsynthese gesteigert (Goldberg *et al.* 1990, Krantz 1991, Jelkmann & Wagner 2004). Neben seiner Wirkung auf die erythrozytären Vorläuferzellen aktiviert Erythropoietin auch die Proliferation, die Differenzierung und die Reifung der morphologisch identifizierbaren Proerythroblasten und der Normoblasten (Glass *et al.* 1975, Udupa *et al.* 1986). Während der 4- bis 6tägigen Entwicklung vom Proerythroblasten bis zum Reticulozyten durchlaufen diese 4 - 5 Zellteilungen. Der frühe basophile Normo- bzw. Erythroblast ist durch das Fehlen von Nukleoli charakterisiert, während im späten Stadium des polychromatischen Erythroblasten Hämoglobin akkumuliert. In der Folge wird der Kern pyknotisch und ausgeschieden. Der so entstandene Retikulozyt enthält noch RNA und trägt keine Erythropoietinrezeptoren mehr.

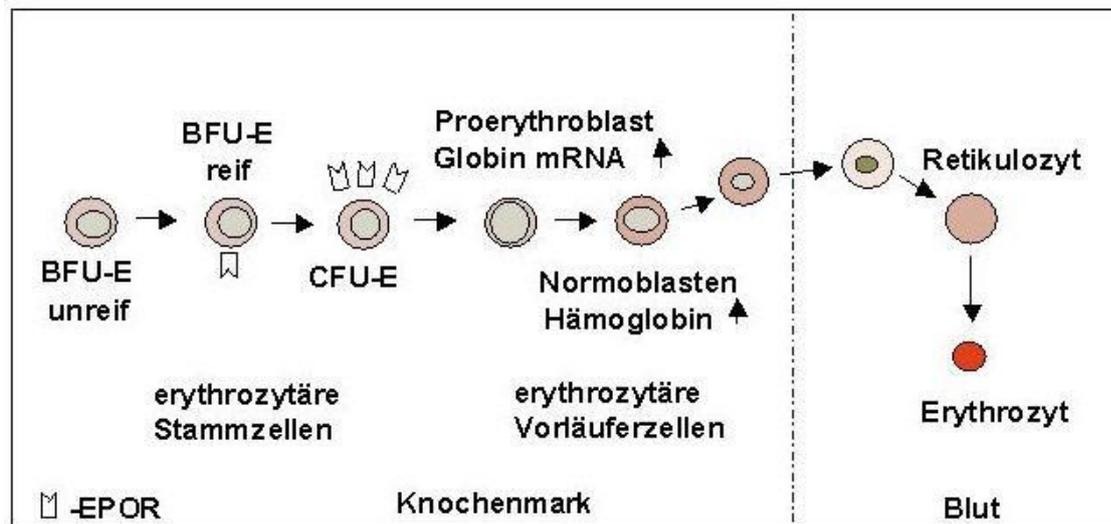


Abb.2: Schematische Darstellung der Erythropoese

Die Proliferation, Differenzierung und Reifung der erythrozytären Stamm- und Vorläuferzellen wird durch Erythropoietin mediiert, insbesondere auf der Stufe der reifen BFU-E und der CFU-E besteht eine hohe Empfindlichkeit der Zellen gegenüber diesem Zytokin aufgrund einer erhöhten Rezeptordichte auf der Zellmembran.

1.5 Orte der Erythropoietin-Synthese

Beim adulten Menschen stellt die Niere den Hauptort der Erythropoietin-Bildung dar. Das Hormon wird dort in speziellen Fibroblasten, die den proximalen Tubuluszellen benachbart sind, produziert. Neben den peritubulären Zellen sind auch andere Gewebe in der Lage das Erythropoietin-Gen zu exprimieren. Dies sind vor allem Leberzellen, Zellen in Milz, Lunge Knochenmark, Hoden und im Gehirn (Tan *et al.* 1992). Während der frühen Phase der Ontogenese stellt der Dottersack des Embryos den Syntheseort für das Erythropoietin dar. Dies ändert sich nach Eintritt in die Fetalphase, in der die Milz und vor allem die Leber die Produktion des Hormons übernehmen (Zanjani *et al.* 1977, Clemons *et al.* 1986, Dame *et al.* 1998). Beim Erwachsenen stammen nur noch 10-20% des Plasmaerythropoietins aus der Leber (Erslev *et al.* 1980, Koury *et al.* 1988a, Dame & Juul 2000). Innerhalb der letzten Schwangerschaftswochen beginnt bereits die Umstellung auf die Niere als Produktionsort für das Erythropoietin (Zanjani *et al.* 1981), und sechs bis acht Wochen nach der Geburt ist der Übergang von hepatischer zu renaler Erythropoietin-Produktion fast abgeschlossen (Zanjani *et al.* 1981, Moritz *et al.* 1997). Das im Gehirn, und dort von Astrozyten und zu geringem Anteil auch von Neuronen, produzierte Erythropoietin gerät wahrscheinlich nicht in die

Blutbahn, sondern wirkt parakrin als neuronaler Wachstumsfaktor (Masuda *et al.* 1994, , Marti *et al.* 1996, Marti *et al.* 1997, Masuda *et al.* 1999, Bernaudin *et al.* 2000). Zusätzlich konnte in der Zellkultur (Morishita *et al.* 1997, Digicaylioglu & Lipton 2001, Siren *et al.* 2001a, Yoo *et al.* 2009) und in *In-vivo*-Experimenten (Sakanaka *et al.* 1998, Brines *et al.* 2000, Marti *et al.* 2000, Siren *et al.* 2001b, Genc *et al.* 2001, Wen *et al.* 2002, Genc *et al.* 2002, Celik *et al.* 2002, Gorio *et al.* 2002, Gassmann *et al.* 2003, Ehrenreich *et al.* 2004b, Ehrenreich *et al.* 2004a, Weishaupt *et al.* 2004, Rabie & Marti 2008) eine neuroprotektive Wirkung des Hormons nachgewiesen werden.

1.6 Regulation der renalen Erythropoietin-Produktion

Um den Abbau überalterter Erythrozyten (täglich etwa 1% der zirkulierenden Erythrozyten) zu kompensieren und die Neubildungsrate der Erythrozyten konstant aufrechtzuerhalten, wird im Gesunden ständig Erythropoietin gebildet. Die basalen Plasma-Erythropoietinkonzentrationen liegen zwischen 6 und 36 IU/l Plasma (Erslev *et al.* 1979, Krantz 1991) und können bei schweren Anämien oder anderen Sauerstoffmangelsituationen auf bis zu 10.000 IU/l Plasma ansteigen (Erslev *et al.* 1987). Die Menge an produziertem Erythropoietin wird in IU (international units) angegeben und wurde vormals als die Menge Erythropoietin definiert, deren Produktion im Tierversuch durch Gabe von 5 µmol Kobaltchlorid induziert werden kann (Annable *et al.* 1972, Krantz 1991).

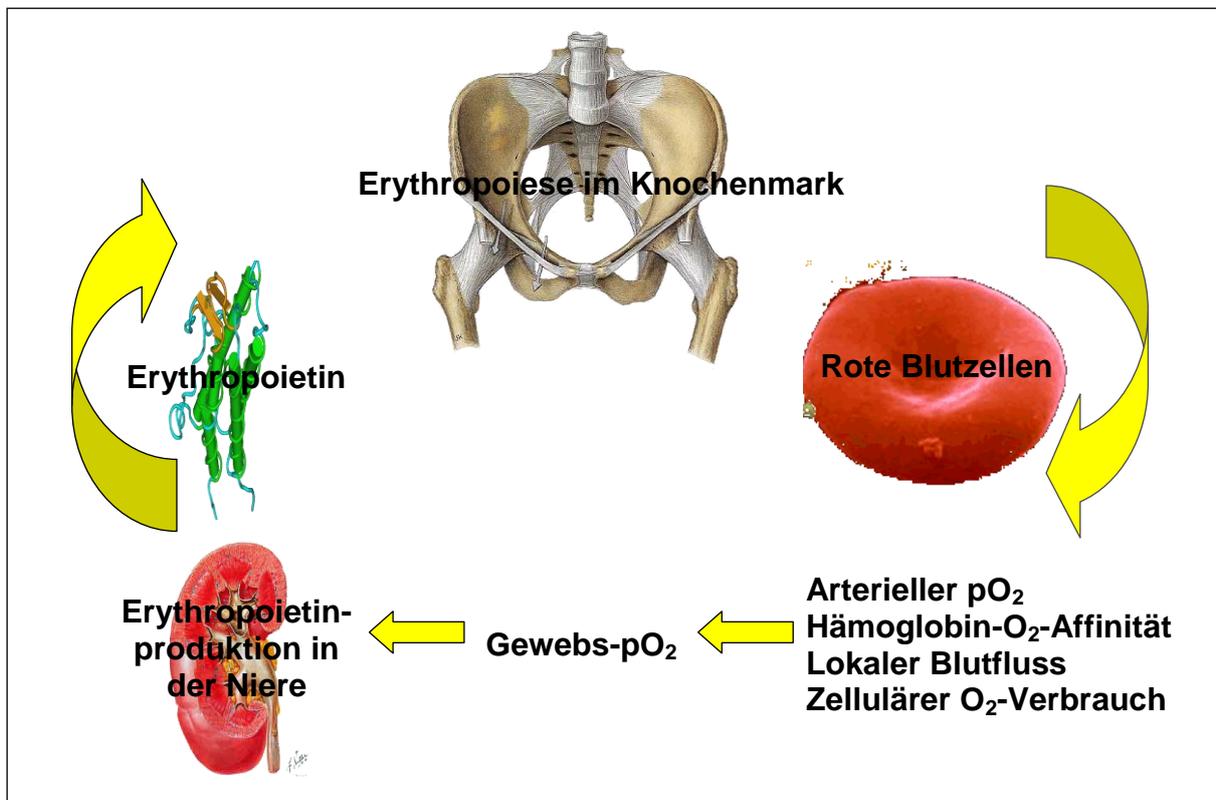


Abb.3: Regelkreis der Erythropoese

Dargestellt ist der in der Literatur postulierte Regelkreis der Erythropoese. Hauptstimulus für die in der Nierenrinde stattfindende Erythropoietinsynthese ist ein Abfall des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe. Über den Blutweg gelangt das Glycoprotein-Hormon in das Knochenmark, wo es an die membranständigen Rezeptoren der erythroidären Vorläuferzellen bindet, und so ihre Apoptose verhindert und ihre Proliferation zum fertigen Erythrozyten fördert.

Eine Gewebshypoxie stellt den Hauptstimulus für eine gesteigerte Erythropoietin-Synthese dar. Auf den Sauerstoffpartialdruck im Gewebe nimmt eine Zahl von Parametern Einfluss, wie die Sauerstoffkapazität des Blutes, der arterielle Sauerstoffpartialdruck, die Sauerstoffaffinität des Blutes, der lokale Blutfluss und der zelluläre Sauerstoffverbrauch (Abb. 3). So nimmt die Erythropoietin-Konzentration im Plasma exponentiell mit einer Abnahme der Hämoglobinkonzentration zu. Aber auch ein Absenken des Sauerstoffpartialdruckes im Atemgas führt zu einer exponentiellen Zunahme der Erythropoietin-Konzentration im Plasma (Jelkmann 1992). Diese tierexperimentell ermittelten Zusammenhänge können durch Beobachtungen am Menschen nach Höhengaufenthalt (Abbrecht & Littell 1972, Milledge & Cotes 1985, Smith *et al.* 2008) und Aufenthalt in einer Dekompressionskammer (Eckardt *et al.* 1989a) bestätigt werden.

Innerhalb der ersten Stunde nach Einsetzen des hypoxischen Reizes lässt sich eine Erhöhung der Erythropoietin-mRNA im Nierengewebe nachweisen. Um etwa 30 Minuten versetzt kann dann vermehrt Erythropoietin im Plasma nachgewiesen werden. Der Anstieg der Erythropoietin-Konzentration im Plasma verläuft proportional zur Zunahme der Erythropoietin-mRNA im Nierengewebe. Etwa ein bis zwei Tage nach dem Anstieg der Erythropoietin-Konzentration im Plasma treten vermehrt bereits im Knochenmark vorliegende Reticulozyten in die Blutbahn über (Jelkmann 1992, Koury 2005, Richmond *et al.* 2005).

Ein Abfall des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe kann auch durch verschiedene andere, teils hochpathologische Vorgänge zustandekommen. So führen akute oder auch chronische Blutverluste, wie z. B. bei gastrointestinalen Blutungen (Ladas *et al.* 2004, Vignot & Spano 2005, Quan *et al.* 2008) oder Hypermenorrhö (Shander *et al.* 2004, Kourounis *et al.* 2005, Adachi 2008) zu einem Anstieg der Plasma-Erythropoietin-Konzentration. Weitere Ursachen für eine gesteigerte Erythropoietin-Produktion können kardiale (Silverberg *et al.* 2004, Hörl & Ertl 2005) und pulmonale Insuffizienzen, wie z. B. chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD); (John *et al.* 2005, 2006) oder Hämoglobinopathien mit erhöhter Sauerstoffaffinität sein. Auch immer wiederkehrende kurzfristige Hypoxieperioden, wie sie beispielsweise beim obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom (OSAS); (Cahan *et al.* 1995, Winnicki *et al.* 2004, Zilberman *et al.* 2007) und dem zentralen Schlafapnoe-Syndrom (SAS); (Ran *et al.* 2005) vorkommen, führen zu einer Erhöhung der Plasmawerte.

Bei gesteigerter Sauerstoffzufuhr, wie sie beispielsweise bei einer Beatmung mit reinem Sauerstoff vorkommt (Hofso *et al.* 2005, Balestra *et al.* 2006), aber auch ein reduzierter Sauerstoffbedarf, z. B. bei ausgeprägter Mangelernährung oder Hypothyreose (Das *et al.* 1975, Brenner *et al.* 1994, Shetty 1999) führen zu einem Absinken des Erythropoietinspiegels im Plasma. Eine Besonderheit stellt hier die Polycythaemie vera dar, eine primäre Polycythaemie, bei der es aufgrund einer Mutation der Janus Kinase 2 zu einem Anstieg der Erythrozytenmasse bei erniedrigten Erythropoietin-Plasmawerten kommt (Spivak 2002, Schäfer 2006).

Wenn Erythropoietin in nur unzureichendem Maße in der Niere synthetisiert wird, kann dies die Folge einer chronischen Nierenerkrankung sein. Folgen einer chronischen Niereninsuffizienz können dann eine chronische Herzinsuffizienz und eine normochrom-normozytäre Anämie, das sogenannte Herz-Nieren-Anämie-Syndrom, sein (Silverberg *et al.* 2004, Besarab & Soman 2005, Silverberg *et al.* 2006). Der physiologische Regelkreis der Erythropoiese ist bei Patienten mit renalen Anämien außer Kraft gesetzt. Die niedrigsten Erythropoietin-Werte lassen sich bei anephrischen Patienten (Caro *et al.* 1979, Hampel *et al.* 2006) und im Tierversuch bei nephrektomierten Tieren finden (von Wussow *et al.* 2005).

Da Erythropoietin nicht intrazellulär gespeichert wird (Kinoshita *et al.* 1992, Misaizu *et al.* 1995), kommt es nach einem hypoxischen Reiz zu einer *De-novo*-Synthese in der Niere und anderen zur Erythropoietin-Synthese befähigten Geweben (Tan *et al.* 1992). Erythropoietin wird als intaktes Hormon aus der Niere an das Blut abgegeben, sodass die Erythropoietin-Konzentration im Plasma weitestgehend die Produktionsrate in der Niere widerspiegelt.

1.7 Sauerstoffsensing im Nierenkortex?

Entsprechend der gängigen Lehrmeinung wird angenommen, dass sich im renalen Kortex sauerstoffempfindliche Zellen befinden, die als eine Art Sauerstoffsensor fungieren. Diese Zellen sollen dann im Falle einer Gewebshypoxie ein Signal an die Erythropoietin produzierenden Zellen weitergeben (Erslev *et al.* 1985, Schurek 1988, Eckardt *et al.* 1989b, Bauer *et al.* 1989, Bauer & Kurtz 1989). So gibt es Untersuchungen an verschiedenen renalen Zelltypen, die zeigen, dass der Sauerstoffsensor möglicherweise in den Zellen zu lokalisieren ist, die das Hormon produzieren (Goldberg *et al.* 1987, Schuster *et al.* 1987, Maxwell *et al.* 1993). Aufgrund der Tatsache, dass peritubuläre Zellen des renalen Kortex das Glykoprotein-Hormon synthetisieren (Rich 1991, Lacombe *et al.* 1991, Bachmann *et al.* 1993), müsste der Sauerstoffpartialdruck in diesen Zellen die ausschlaggebende Regelgröße für die Bildung von Erythropoietin in der Niere sein. Wenn man nun in Betracht zieht, dass schon geringfügige Veränderungen der renalen Durchblutung, aufgrund ihrer ohnehin inhomogenen Sauerstoffversorgung, zu deutlichen Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes im Nierengewebe führen, so widerlegen die Daten zur Erythropoietin-Produktion bei verminderter renaler Durchblutung diese These. So konnte bei Patienten mit Nierenarterienstenose nur okkasionell, und dann auch nur eine marginale Erhöhung der Erythropoietin-Spiegel im Plasma, beobachtet werden (Bourgoignie *et al.* 1968, Taneichi *et al.* 1986, Jensen *et al.* 1992). Diese Ergebnisse können, zumindest teilweise, durch einen ebenfalls reduzierten renalen Sauerstoffbedarf erklärt werden. Des Weiteren führen Nierenarterienstenosen nur in den seltensten Fällen zu Polyzythämien (Luke *et al.* 1965, Tarazi *et al.* 1966, Hudgson *et al.* 1967, Holgado *et al.* 2001). Auch Shuntperfusionen von venösem Blut in die Nierenarterie konnten nur bei der Hälfte der Versuchstiere einen Anstieg der Erythropoietin-Produktion induzieren (Pavlovic-Kentera *et al.* 1965). In weiteren tierexperimentellen Studien konnte nach deutlicher Reduktion des Blutflusses an der Niere entweder eine Erhöhung oder eine Erniedrigung sowie auch gar keine Veränderung der

renalen Erythropoietin-Produktion beobachtet werden (Takaku *et al.* 1962). Studien an isoliert perfundierten Rattennieren zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Absenken des Sauerstoffpartialdruckes und einer Erhöhung der renalen Erythropoietin-Synthese. Bei der Perfusion sauerstoffarmen Mediums kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Erythropoietin-Spiegel. Im Gegensatz dazu kam es auch nach Perfusion von sauerstoffgesättigtem Medium zu einer verstärkten Bildung von Erythropoietin- mRNA in der Niere (Pagel *et al.* 1991).

Diese sehr inhomogenen und teils auch widersprüchlichen Ergebnisse lassen Zweifel an der Theorie aufkommen, dass die Sauerstoffversorgung der Niere die wesentliche Regelgröße für die renale Erythropoietin-Synthese darstellt.

Als einen weiteren möglichen Reiz zog man Variationen des Hämatokrits in Betracht. Doch auch eine Veränderung dieser systemischen Größe führte in *In-vivo* Experimenten zu keiner Reaktion der hormonproduzierenden Zellen (Pagel *et al.* 1991, Pagel *et al.* 1992).

Die biochemische Natur des renalen Sauerstoffsensors konnte bisher noch nicht geklärt werden, was teils darin begründet liegt, dass eine Isolation der Erythropoietin produzierenden Zellen bis heute nicht gelungen ist. Auch steht noch keine Nierenzelllinie zur Verfügung, die kontrolliert sauerstoffabhängig Erythropoietin synthetisiert. Es wurden allerdings zwei humane Hepatomzelllinien, HepG2 und Hep3B, etabliert, die sich als geeignete Modelle für die sauerstoffabhängige Erythropoietin-Produktion auszeichnen. Setzt man diese Zelllinien einem hypoxischen Reiz aus, so reagieren diese mit einem deutlichen Anstieg der Erythropoietin-mRNA Synthese sowie einer gesteigerten Abgabe von biologisch aktiven Erythropoietin in das Kulturmedium.

Mittels dieser Modelle war die Identifikation eines Hypoxie induzierbaren Faktors (HIF) möglich, welcher an ein transkriptionelles Verstärkerelement am Ende des Erythropoietin-Gens (3'-Enhancer) bindet und so die Erythropoietin-Promotoraktivität verstärkt. HIF ist ein heterodimeres Protein, welches aus zwei Untereinheiten besteht, HIF-1 α und HIF-1 β . Von der α -Untereinheit gibt es drei beschriebene Isoformen (HIF-1 α , -2 α und -3 α), die sich bezüglich ihrer Größe, Funktion und Gewebeverteilung unterscheiden. Erwähnt sei, dass HIF-2 α oder auch EPAS1 (endotheliales PAS domain Protein 1) starke Ähnlichkeit mit HIF-1 α in Bezug auf die N-terminale Proteinstruktur, die hypoxische Stabilisierbarkeit und die Dimerisierung mit HIF-1 β zeigt (Wiesener *et al.* 1998, O'Rourke *et al.* 1999, Brügge *et al.* 2007). HIF-1 β ist mit dem Heterodimerisierungspartner des Dioxinrezeptors, dem sogenannten Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) mit einem Molekulargewicht von 91-94 kDa (Wang *et al.* 1995) identisch. Im Gegensatz zur β -

Untereinheit sind die α -Untereinheiten unter Normoxie instabil. Sie werden durch Interaktion des von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Proteins (pVHL) mit der Sauerstoff-abhängigen Degradations-Domäne (ODD) von HIF durch die E3 Ligase polyubiquitiniert und im 26S Proteasom abgebaut. Der Bindung des pVHL und der ODD geht unter normalen Sauerstoffbedingungen eine Identifikation zweier spezifischer, durch Hydroxylasen postranslational modifizierter Prolinreste (Pro⁴⁰² und Pro⁵⁶⁴) durch Prolylhydroxylasen voraus (Cockman *et al.* 2000, Bruick & McKnight 2001, Epstein *et al.* 2001, Ivan *et al.* 2001). Unter Hypoxie kommt es nicht zu der beschriebenen Hydroxylierung und die α -Untereinheit wird stabilisiert. Es kommt zu einer Translokation vom Zytoplasma in den Kern, wo α - und β -Untereinheit dimerisieren (Stockmann & Fandrey 2006).

Der Transkriptionsfaktor HIF wird nicht nur von Hepatomzellen produziert, sondern auch in einer Vielzahl anderer Zelltypen in Abhängigkeit von Hypoxie und teilweise auch unter normoxischen Bedingungen. Zudem kontrolliert er die Expression einer ganzen Reihe von Zielgenen, die mit dem Schutz vor Hypoxie assoziiert werden, wie z. B. der vascular endothelial growth factor (VEGF), glykolytische Enzyme und iNOS (Brügge *et al.* 2007). Die molekularen Mechanismen des Sauerstoffsensing sind noch nicht vollständig geklärt. Vieles deutet darauf hin, dass die bereits erwähnten Prolylhydroxylasen als Sauerstoffsensoren fungieren. Aber auch die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen machen deutlich, dass noch keine eindeutige Klärung dieser Fragen in Sicht ist, obwohl man zusammenfassend schon von der Existenz, eines die Erythropoietin-Produktion lokal beeinflussenden, renalen und hepatischen Sauerstoffsensors sprechen kann.

Dennoch scheinen extrarenale humorale Mediatoren eine nicht unbedeutende Rolle in der Regulation der Erythropoietin-Synthese zu spielen. So könnte auch hier, wie auch bei der Regelung der Produktion anderer Hormone, der Hirnstamm-Hypophysen-Hypothalamus Bereich von zentraler Bedeutung sein.

So weiß man beispielsweise, dass eine Hypophysektomie die Erythropoietin-Produktion in hypoxischen Tieren deutlich herabsetzt. Ebenfalls bekannt ist, dass nach elektrischer Reizung des Hypothalamus vermehrt Erythropoietin aus der Niere freigesetzt wird (Halvorsen 1961, 1966, 1968, Mirand *et al.* 1964). Zudem konnte gezeigt werden, dass nach isovolämischen Austauschtransfusionen von hypoxisch vorkonditioniertem Blut eine signifikante Induktion der Erythropoietin-Produktion durch eine Hypophysektomie der Spendertiere vollständig eliminiert werden kann.

Als mögliche humorale Mediatoren wurden Thyroidhormone vorgeschlagen, da sie die Erythropoietin-Produktion in vitro und in vivo in Hypoxie verstärken (Fandrey *et al.* 1994), und eine Induktion auch unter Normoxie durch die Akkumulation des Transkriptionsfaktors

HIF hervorrufen (Ma *et al.* 2004, Otto & Fandrey 2008). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass nach pharmakologischer Zerstörung der Schilddrüsenfunktion keinerlei Veränderungen bei der Induktion der Erythropoietin-Produktion nach einem hypoxischen Reiz auftreten. Weitere wichtige Hinweise auf die Involvierung des Hirnstamm-Hypothalamus-Hypophysen-Bereiches bei der Regulation der renalen Erythropoietin-Synthese liefern *In-vivo* Versuche, bei denen nach Erzeugung einer cerebralen Hypoxie, bei gleichzeitiger systemischer Normoxie, eine Erhöhung der Erythropoietin-Werte im Plasma nachweisbar war (von Wussow *et al.* 2005).

1.8 Hypothalamus und Hypophyse

Der Hypothalamus, im Zwischenhirn liegend, medial vom 3. Ventrikel und kranial vom Thalamus begrenzt, stellt wohl das wichtigste Regulationszentrum des vegetativen Systems dar, welches selbst aus verschiedensten homöostatischen Regelkreisen besteht (Plant 2008). Der Hypothalamus ist über das Infundibulum (Hypophysenstiel) mit der Hypophyse, genauer gesagt mit dem Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) verbunden. Die Bedeutung der beiden kleinen Hirnareale kann man daraus ersehen, dass selbst geringfügige Störungen im Hypothalamus oder der Hypophyse Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit eines Individuums haben können.

Die Aufrechterhaltung der Homöostase, die Regulation der Nahrungs- und Wasseraufnahme, circadiane Rhythmen und Schlaf sowie die Steuerung des Sexual- und Fortpflanzungsverhaltens unterliegen der Regelung durch Releasing und oder Inhibiting-Hormone des Hypothalamus, welche dann die Produktion der Regulationshormone der Hypophyse anregen oder sie inhibieren (Charlton 2008).

Um aber seinen vielfältigen Aufgaben nachzukommen, benötigt der Hypothalamus noch weitere neuronale Verbindungen zu anderen Hirnzentren. Weiterhin produzieren der Nucleus paraventricularis und der Nucleus supraopticus die Hormone ADH (Antidiuretisches Hormon) und Oxytocin und geben diese über die Neurohypophyse in das Blut ab. Die Neurohypophyse stellt damit eine funktionelle Struktur des Hypothalamus dar, sie ist keine produzierende Drüse, sondern ein Speicherorgan. Der Hypophysenvorderlappen, auch Adenohypophyse genannt, stellt keinen direkten Bestandteil des Gehirns dar. Im Verlauf der Embryonalentwicklung entsteht sie durch Abspaltung des Rachendaches, der Rathke Tasche, die sich zunächst nach oben wölbt und sich schließlich ganz ablöst.

Die Sekretion der Adenohypophysenhormone wird durch Releasing- und Inhibitinghormone des Hypothalamus geregelt. Sie werden im proximalen Teil des Hypophysenhinterlappens in ein Kapillarnetz freigesetzt und erreichen über Portalvenen die Drüsenzellen im Vorderlappen. Die Hormone der Neurohypophyse werden im Hypothalamus gebildet und erst in der Hypophyse in den Blutkreislauf freigesetzt.

Bei den Hormonen der Adenohypophyse unterscheidet man generell zwischen Hormonen, die direkt auf Zielorgane wirken (nichtglandotrope Hormone: z. B. Somatotropin und Prolaktin) und solchen, welche die Hormonproduktion nachgelagerter endokriner Drüsen stimulieren (glandotrope Hormone: z. B. Follitropin, Lutropin, Corticotropin, Thyreotropin sowie Melanotropin).

1.8.1 Hypothalamus-Hypophyse und Hypoxie

Neben allen anderen Organsystemen und Hirnarealen reagiert auch die HPA-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse) auf die Veränderung der Sauerstoffverfügbarkeit. Hypobare Hypoxien, sowie Ischämien führen in den meisten beschriebenen Fällen zu einer Aktivierung der HPA-Achse. Beschrieben sind extreme Reduktionen der Hypophysenfunktion und damit ein Ausbleiben der reproduktiven Reife sowie Wachstumsretardierungen bei neugeborenen Ratten mit chronischer hypobarer Hypoxie (Nelson & Cons 1975). Experimente in einer Dekompressionskammer führten beim Herbeiführen einer hypobaren Hypoxie (380mmHg) zu einem Absinken der TSH-Spiegel bei den untersuchten Ratten (Varela *et al.* 1982). Im Tierversuch stiegen sowohl nach hypobarer Hypoxie oder nach einer cerebralen Ischämie die CRF-Spiegel an (Strijbos *et al.* 1994, Chen *et al.* 2004). Gleiches gilt für die durch die gestiegene CRF-Sekretion ausgelöste gesteigerte ACTH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen (Fassbender *et al.* 1994, Strijbos *et al.* 1994). Betrachtet man die gesamte HPA-Achse, so kommt es nach Hypoxien, gleichgültig welcher Natur, zu einer Aktivierung und Verschiebung der normalen Muster, häufig ausgelöst durch die Erhöhung der Cortisolwerte. Stress, wobei eine Hypoxie oder Ischämie erheblichen physiologischen Stress darstellen, führt zu vermehrter Ausschüttung von Cortisol aus der Nebennierenrinde und damit zur Aktivierung der HPA-Achse (Krugers *et al.* 1995, Marklund *et al.* 2004, Farias *et al.* 2008). Der Einfluss von Zytokinen auf diesen Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. So hat man nach Schlaganfällen eine HPA-Achsenaktivierung gefunden ohne die normale ACTH-Erhöhung. Hier wird die Beteiligung

von IL-6 vermutet (Johansson *et al.* 1997). Zudem wird eine Regulation durch Erythropoietin und VEGF nach Aktivierung der HPA-Achse durch Hypoxie/Ischämie angenommen (Tringali *et al.* 2007).

Nicht nur nach hypobarer Hypoxie oder nach Ischämien infolge von Traumata oder Schlaganfällen konnten Veränderungen der HPA-Achse mit gestörter Feedback-Regulation beobachtet werden, sondern ebenso im Zusammenhang mit obstruktiven Schlafstörungen mit Apnoe (OSAHS). Hier kommt es interessanterweise neben der bereits erwähnten Veränderung der HPA-Achse und der GH-Achse zu Erhöhungen der Plasma-Erythropoietinwerte (Feng *et al.* 2000, Zilberman *et al.* 2007).

1.9 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen extrarenale Mechanismen aufgezeigt werden, die die renale Erythropoietin-Produktion beeinflussen. Insbesondere soll die Beteiligung des Hypothalamus-Hypophysenbereiches und explizit die Involvierung der Hypophyse an der Signalübertragung und Auswertung eines hypoxischen Reizes beschrieben werden. Die Exklusivität der Nierenrinde als Hauptort der Sauerstoffsensitivität und somit alleiniger Initiator der renalen Erythropoietin-Synthese wird in der Literatur kontrovers diskutiert, Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten bereits gegenteilige Befunde liefern.

Die Versuche dieser Arbeit sollen der Identifizierung von Faktoren und möglichen Signalwegen der extrarenalen Induktion der renalen Erythropoietin-Produktion dienen.

Gewebshypoxie stellt den Hauptstimulus für eine gesteigerte Erythropoietin-Synthese an der Niere dar. Es soll nunmehr der Einfluss einer lokalen Hypoxie im Gehirn, bei gleichzeitiger systemischer Normoxie, auf die renale Erythropoietin-Synthese in normalen und hypophysektomierten Tieren überprüft werden. Zudem soll der Einfluss der Nierenperfusion bei bestehender lokaler Hypoxie im Gehirn betrachtet werden, da, wenn auch unterschiedlich in der Literatur bewertet, die Versorgung der Niere mit Sauerstoff eine mögliche Bedeutung bei der renalen Erythropoietin-Synthese haben kann.

Um den aus dem Gehirn stammenden Reiz bezüglich seiner Wertigkeit auf die renale Erythropoietin-Synthese zu beurteilen, sollen Vergleiche zwischen einer systemischen und einer lokalen cerebralen Hypoxie angestellt und die renale sowie hepatische Reaktion darauf beobachtet werden. Daneben soll auch die Erythropoietin-Expression im Gehirn selbst

betrachtet werden, um Einblicke auf endokrine und parakrine Mechanismen und mögliche Signalwege zu erhalten.

Die biochemischen Veränderungen im Hypothalamus-Hypophysenbereich in Folge einer Hypoxie sollen unter Zuhilfenahme der Mikrodialyse, der Zellkultur und der 2D-Gelelektrophorese aufgedeckt und ihr Potential auf die Induktion einer gesteigerten Erythropoietin-Synthese untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 *In-vivo*-Versuche

2.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit erwachsenen männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 200 g bis 400 g und männlichen hypophysectomierten Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 200 g (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt. Die Adaptionszeit der Tiere nach Lieferung betrug mindestens 4 Tage. Die Tiere wurden bis unmittelbar vor Versuchsbeginn mit Futter und Wasser bzw. 5 %iger Glucoselösung ad libitum versorgt und befanden sich in einem gesundheitlich einwandfreien Zustand.

Die Nutzung der Tiere im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen wurde gemäß Tierschutzgesetz durch das Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Vers. Nr. 21/ 1h/ 05).

2.1.2 Versuchsvorbereitung

Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von 100 mg Thiopental pro Kilogramm Körpergewicht narkotisiert und nach Rasur von Hals- und Brustbereich, Schädel, Nacken sowie linkem Innenschenkel und gegebenenfalls des gesamten Abdomens in Rückenlage auf einer Wärmeplatte positioniert. Die Körpertemperatur von 37,5 °C wurde mittels Rektalsonde während der gesamten Versuchsdauer überwacht.

Um eine gleichbleibend optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden die Tiere einer Tracheotomie unterzogen. Über den Trachealtubus wurde eine Beatmung mit Raumluft (Ugo Basile Rodent Ventilator UB7025; Atemzugvolumen 2,5 ml, Atemfrequenz 80 min⁻¹) über den gesamten Versuchszeitraum durchgeführt. Die Qualität der Beatmung wurde durch stündliche Blutgasanalysen (Radiometer Copenhagen GmbH, ABL5) überprüft. Die linke Vena femoralis der Tiere wurde katheterisiert, um eine unter Umständen notwendige Pharmakagabe (Thiopental als i.v. Bolus bei zu geringer Narkosetiefe, Dopamin bei einem Abfall des mittleren arteriellen Druckes unter 80 mmHg, Volumensubstitution mittels HAES/NaCl-Lösung) zu ermöglichen. Die linke Arteria femoralis wurde für die regelmäßigen Blutentnahmen (Blutgasanalysen, Plasmaerythropoietin-Konzentrationsbestimmung) und zur Kontrolle der Vitalparameter (Herzfrequenz und

mittlerer arterieller Druck) ebenfalls katheterisiert. Die Katheter (PE - 50) wurden vor Benutzung heparinisiert, um einen Verschluss der Gefäße durch Blutkoagula zu verhindern. Die Herzfrequenz wurde über einen Oszillographen dargestellt, während der mittlere arterielle Druck über einen Druckaufnehmer registriert und kontinuierlich aufgezeichnet wurde.

Nach Überführung der Tiere in die Bauchlage erfolgte die Positionierung des Schädels zwischen die Halterungen eines stereotaktischen Tisches. Der Kopf wurde um ca. 45° nach unten abgewinkelt, um die Cisterna magna (Cisterna cerebromedullaris) maximal zu exponieren, und dann in dieser Position fixiert.

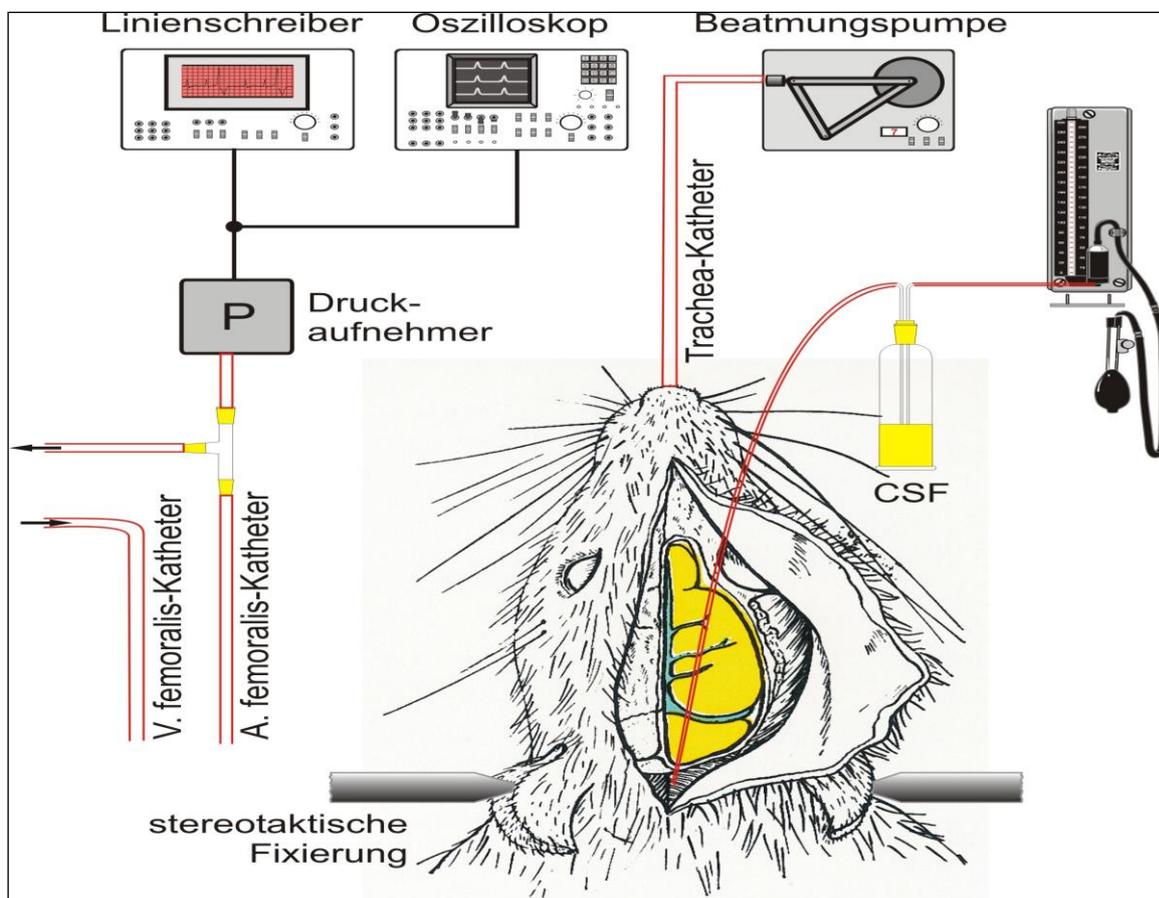


Abb.4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Dargestellt ist der experimentelle Aufbau: Messgeräte und Schreiber zur Erfassung der Herzfrequenz und des arteriellen Blutdruckes; Beatmungspumpe und Trachealkatheter zur Beatmung mit Raumluft; venöser Zugang über die V. femoralis zur Versorgung mit Pharmaka und Volumensubstitution; arterieller Zugang über die A. femoralis zur Messung der Druckparameter über einen Druckaufnehmer und zur regelmäßigen Blutabnahme für die Messung der systemischen Blutwerte und zur Ermittlung der Erythropoietin-Plasmawerte; Manometer und angeschlossenes Gefäß mit synthetischer Cerebrospinalflüssigkeit, Katheter zum Infundieren der Flüssigkeit in die freigelegte Cisterna magna und stereotaktischer Fixateur.

2.1.3 Versuchsdurchführung

2.1.3.1 Erzeugung einer cerebralen Hypoxie durch Erhöhung des intrakraniellen Druckes

Zunächst wurde ein ca. 1 cm langer Hautschnitt am okzipitalen Ende des Schädeldaches gesetzt. Die Muskelschichten über der Cisterna magna wurden stumpf zur Seite präpariert und mit Fäden rechts und links am stereotaktischen Tisch fixiert. Die freigelegte Membrana atlantooccipitalis posterior wurde mit einer Kanüle der Stärke 14 (0,60 mm x 30 mm) perforiert. An dieser Stelle wurde sogleich ein Katheter (Länge 3-4 mm, Außendurchmesser 0,96 mm, Innendurchmesser 0,58 mm) in die Cisterna magna eingeführt, der mit einer mit synthetischer Cerebrospinalflüssigkeit (Na^+ 150 mM, K^+ 3 mM, Ca^{2+} 1,4 mM, Mg^{2+} 0,8 mM, Cl^- 155 mM in Phosphat-Puffer pH 7,4, nach Ross und Duhaime) gefüllten Flasche verbunden war. Der Katheter wurde mittels Cyanoakrylatkleber im umliegenden Gewebe fixiert und flüssigkeitsdicht abgeschlossen.

Eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes wurde dann durch druckkontrolliertes Infundieren der synthetischen Cerebrospinalflüssigkeit in die Cisterna magna erreicht.

Durch Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für jeweils 10 min wurde eine cerebrale Hypoxie erzeugt.

2.1.3.2 Prüfung des Sauerstoffpartialdruckes im Gehirn

Die Absenkung des Sauerstoffpartialdruckes im Gehirn wurde exemplarisch an 3 bzw. 5 Tieren gemessen. Es wurde vor ($n = 3$) und nach ($n = 5$) der 10minütigen Erhöhung des intrakraniellen Druckes der Sinus Sagittalis Superior freigelegt (Abb. 5), um eine Blutprobe zu entnehmen. Dazu wurde aus der Schädeldecke ein kreisrundes (ca. 3 mm Durchmesser) Stück mit einem Mikrodrill herausgefräst und abgehoben, ohne die Dura zu verletzen. Mit einer Kanüle wurde dann eine Blutprobe aus dem Sinus entnommen. Die Entnahme aus dem Sinus stellt sicher, einen Überblick über die gesamte Sauerstoffpartialdrucksituation im Gehirn zu erlangen, da die Mehrzahl der cerebralen venösen Gefäße im Sinus zusammenläuft, bevor das Blut über die Vena vertebralis wieder zurück in den Körperkreislauf gelangt. Der Sauerstoffpartialdruck des venösen Blutes aus dem Sinus wurde dann mit dem Blutgasanalyser bestimmt.

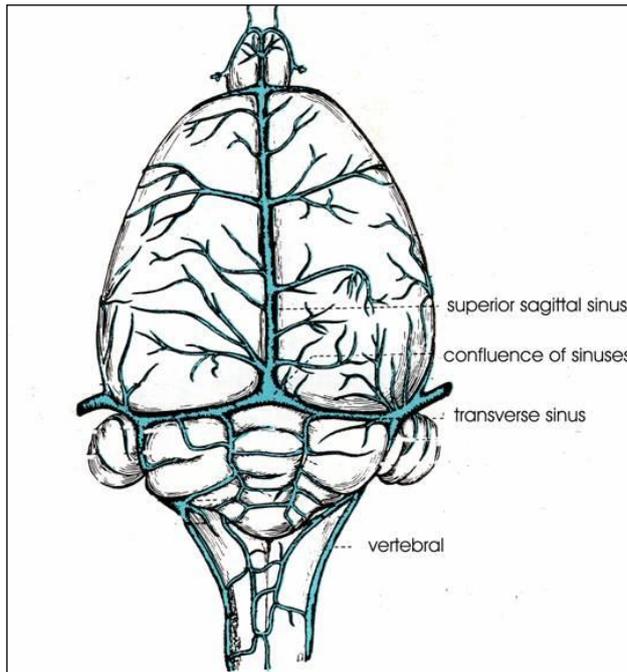


Abb.5: Darstellung des Sinus sagittalis superior

Dargestellt sind die venösen Gefäße in Aufsicht und deren Vereinigung zum venösen Sinus in der Spalte zwischen dem Klein- und Großhirn (Quelle: Anatomy of the rat; Eunice Chace Greene, 1955, Haffner, NY).

2.1.3.3 Messung des renalen Blutflusses unter Einfluss einer cerebralen Hypoxie

Zur Bestimmung des renalen Blutflusses wurde vor Implantation des Katheters in die Cisterna magna an 4 Tieren eine Laparotomie entlang der Linea alba vorgenommen. Eine Ultraschall-Flusssonde (Größe 1 mm, Transonic Systems T106, Ithaca, NY) wurde um die frei präparierte Nierenarterie positioniert und der renale Blutfluss für 10 min gemessen. Danach wurde den Tieren ein intrakranieller Katheter implantiert und während der Erhöhung des intrakraniellen Druckes der Fluss an der Arteria renalis noch einmal gemessen.

2.1.3.4 Erzeugung einer anämischen Hypoxie durch Absenkung des Hämatokrits

Zur Erzeugung einer anämischen Hypoxie wurde den Tieren 3 ml Blut über den arteriellen Zugang entnommen. Volumensubstitution fand hier durch Injektion von 3 ml isotonischer Kochsalzlösung statt. Durch Messung, vor und nach Blutentnahme, konnte eine Absenkung des Hämatokrits von durchschnittlich 40 % auf 30 % gezeigt werden.

2.1.4 Versuchsgruppen

Cerebrale Hypoxie: n = 10

Cerebrale Hypoxie, bei gleichzeitiger Messung des renalen Blutflusses: n = 10

Cerebrale Hypoxie an hypophysectomierten Ratten: n = 10

Cerebrale Hypoxie bei gleichzeitiger Mikrodialyse: n = 10

Anämische Hypoxie: n = 10

Anämische Hypoxie bei gleichzeitiger Mikrodialyse: n = 10

2.1.5 Probenentnahme

Zu Beginn aller Versuche wurden Blutproben zur Bestimmung der basalen Plasma-Erythropoietin-Konzentration entnommen. Nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes oder nach Senkung des Hämatokrits wurden insgesamt drei Blutproben in stündlichen Abständen aus der A. femoralis zur Blutgasanalyse sowie zur Bestimmung der Erythropoietin-Konzentration im Plasma gewonnen. Es wurden jeweils 0,5 ml Blut entnommen, von denen 0,2 ml für die Blutgasanalyse benötigt wurden. Aus den verbleibenden 0,3 ml wurde durch Zentrifugation (4000xg) das Serum gewonnen, das bis zur Bestimmung der Erythropoietin-Konzentration bei -80°C aufbewahrt wurde.

Nach jeder Blutentnahme wurde den Tieren das entnommene Volumen durch eine Mischung aus 10% HAES in 0,9 % NaCl Lösung (1+1) substituiert.

2.1.6 Mikrodialyse im Hypothalamus-Hypophysenbereich

Zur Gewinnung von Extrazellulärlüssigkeit aus dem Hirnstamm diente die Mikrodialyse. Diese Methode ermöglicht Probenahmen direkt aus dem zu untersuchenden Bereich unmittelbar während des Experimentes. Dem Tier wurde durch die Cisterna magna eine Mikrodialysesonde (CMA 12) bis in den Hypothalamus–Hypophysenbereich vorgeschoben. Durch diese Sonde wurde synthetische CSF mit definierter Geschwindigkeit (2 µl/min) mittels einer Mikroinjektionspumpe (CMA 100 / 400; CMA Microdialysis, Solna, Sweden) in das

Gewebe gepumpt. Dort erfolgte nach dem Prinzip der Diffusion ein Austausch von im CSF gelösten Substanzen durch die Mikro dialyse-Membran.

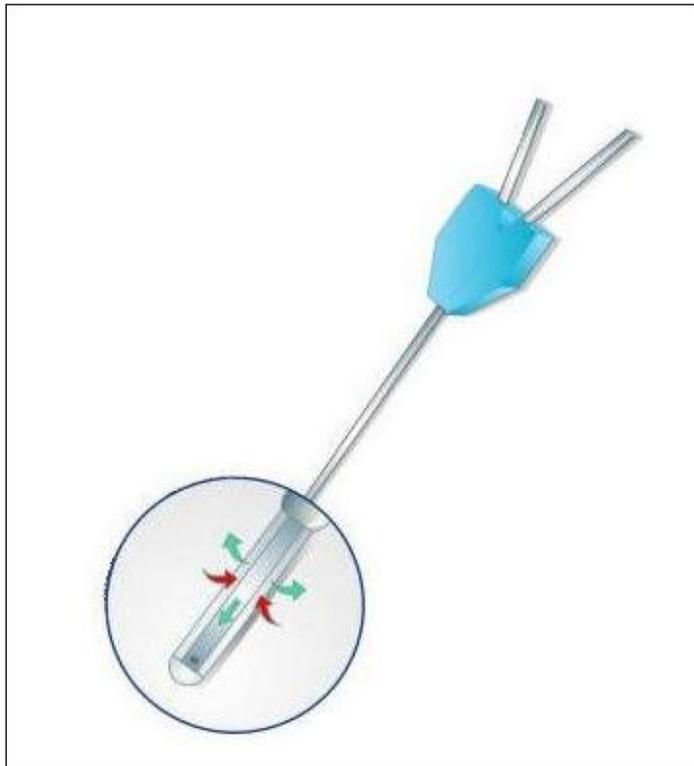


Abb.6: Dialysekatheter CMA 12

Dargestellt ist der Dialysekatheter, an dessen Spitze sich die Dialysemembran befindet. Nach dem Prinzip der Diffusion kommt es so zum Austausch von Dialysat und interstitieller Flüssigkeit über eine semipermeable Membran (Quelle: www.microdialysis.se).

Danach wurde entweder eine cerebrale oder eine anämische Hypoxie eingeleitet und jeweils über einen Versuchszeitraum von drei Stunden einstündige Probeentnahmen durchgeführt. Die Proben wurden bereits während des Sammelns mit einem Protease-Inhibitor Cocktail (Complete™ mini; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) versetzt und bei -20°C eingefroren.

2.1.7 Organentnahme

Den Tieren wurden nach Beendigung der Versuche die Nieren und die Gehirne entnommen. Zur Gehirnentnahme wurde die Kopfhaut bis zu den Augen nach rostral vorpräpariert, die Nackenhaut entfernt und unmittelbar oberhalb des ersten Halswirbels eine Durchtrennung des Rückenmarks vorgenommen. Danach wurden die beiden Mm. temporales vom Schädeldach abgehoben. Das freiliegende Os occipitale und das Os parietale konnten nun vorsichtig entfernt und die Dura aufgerissen werden. Zur Exenteration des Gehirns mussten Dura mater, Arachnoidea und die oberflächlichen Gefäße entfernt werden.

Nach Trennung der Verbindung zwischen N. opticus und Gehirn am basalen Foramen magnum konnte das Gehirn aus der knöchernen Schädelkalotte, und der auf dem Os palatinum aufliegende Teil der Hypophyse, entnommen werden. Das Gehirn wurde unter ständiger Befeuchtung mit isotonischer Kochsalzlösung in Cerebellum, Cortex, Hirnstamm, Hypothalamus und Hypophyse geteilt.

Zur Entfernung der Niere wurde das Abdomen entlang der Linea alba eröffnet und das Organ nach Abtrennen der zu- und abführenden Gefäße entnommen. Außerhalb der Bauchhöhle wurde die Nierenkapsel entfernt und das Organ in vier gleich große Teile aufgeteilt. Leberproben wurden durch Entnahme von Teilstücken der Leber im Tier erhalten. Diese, die Nierenproben sowie die Hypophyse und die anderen Gehirnteile wurden gewogen und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Die Organe wurden dann bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

2.2 *In-vitro*-Versuche

2.2.1 Versuche in der Zellkultur

Um die Aussage zu prüfen, ob während einer Hypoxie im Hypophysenbereich Faktoren freigesetzt werden, welche die Erythropoietin-Synthese steigern können, wurden Microdialysate aus dem Hypothalamus-Hypophysenbereich in der Zellkultur eingesetzt.

Die während der experimentell erzeugten Hypoxien gesammelten Microdialysate wurden in zwei unterschiedlichen Zelllinien als Stimulans eingesetzt. Zunächst wurden humane Hepatomzellen (HepG2), die unter Hypoxie ihre Erythropoietin-Synthese steigern, mit den Dialysaten behandelt. In Folge wurde die Wirkung der Dialysate in einer Nierenfibroblasten-Zelllinie (COS-7) der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) getestet. Nach jeweils 24 Stunden Hypoxie bzw. Normoxie wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, die Erythropoietin-Genexpression mittels quantitativer real time RT PCR und die Erythropoietin-Konzentrationen im Medium per ELISA (Medac, Hamburg, Deutschland/ R&Dsystems, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt.

2.2.1.1 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Zellen der humanen Hepatomzelllinie HepG2 (ATCC: HB-8065) und COS7-Zellen (ARCC: CRL-1651) von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville USA) gearbeitet.

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden als Monolayerkulturen in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter S-1-Sicherheitsbedingungen in Sterilbänken (Heraeus, Hanau, Deutschland) mit sterilen Lösungen und sterilem Kunststoffmaterial durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen in wasserdampfgesättigten Brutschränken bei 37°C und 5 % CO₂. Die Subkultivierung wurde nach Standardprotokoll mit Trypsin-EDTA (Lindl & Bauer, 1994) bei Erreichen von nahezu konfluenten Bedingungen durchgeführt.

Die HepG2-Zellen wurden in RPMI-Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und die COS7-Zellen in DMEM (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert, welche mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS, Gibco), 2 mM Glutamin, 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Sigma, Steinheim, Deutschland) supplementiert wurden.

2.2.3 Behandlung der Zellen

Die Zellen wurden zur Versuchsdurchführung in konventionelle gasundurchlässige Zellkulturschalen überführt und bei Adhärenz wie folgt mit Probenmaterial aus der Mikrodialyse und /oder Sauerstoffentzug behandelt.

2.2.3.1 Stimulation der Erythropoietin-Produktion durch Hypoxie

Zur Stimulation der Erythropoietin-Produktion in den behandelten und unbehandelten Zellen wurden diese entweder in einem Brutschrank mit O₂-Regulationseinheit (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 21 % O₂, oder in einem Inkubator mit einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 1 % O₂, 5 % CO₂ und einer ausgleichenden N₂-Fraktion für jeweils 24 h begast.

2.2.3.2 Normoxische Induktion der Erythropoietin-Produktion

Zur Induktion der Erythropoietin-Produktion unter normoxischen Bedingungen wurde ein Teil der Zellen mit den Mikrodialysaten aus der Hypothalamus-Hypophysen-Region behandelt. Dazu wurden zu 492 µl Medium jeweils definierte Mengen der Mikrodialysate mit 10 µg Gesamtprotein gegeben.

Nach 24 h wurden die jeweiligen Überstände aus der Zellkultur gewonnen und der Erythropoietingehalt mittels ELISA ermittelt.

2.3 Proteomanalysen

2.3.1 Das Proteom

Die Mehrzahl unserer Körperfunktionen wird von Proteinen ausgeführt, sie stellen die Träger der im Genom festgelegten Zellfunktionen dar.

Das Proteom ist die quantitative Darstellung der Proteinzusammensetzung einer Zelle, eines Organs oder eines gesamten Organismus unter genau definierten Bedingungen (Wilkins *et al.* 1996). Im Gegensatz zum Genom, welches ein gut charakterisiertes und statisches Gebilde ist, reflektiert das Proteom die dynamische Proteinexpression, die durch eine sehr große Zahl von Parametern beeinflusst wird. So besteht beispielsweise zwischen der Menge einer mRNA und der dazugehörigen Proteinmenge nur eine schwache Korrelation (Gygi & Aebersold 1999). Im Proteom werden, im Vergleich zum Genom, auch Translationsregulation, mRNA-Stabilität, Proteinstabilität und Proteinabbau erfasst. Bei höheren Organismen werden Struktur und auch Funktion vieler Proteine durch posttranslationale Ereignisse stark beeinflusst. So werden neu synthetisierte Proteine häufig prozessiert oder es finden posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen statt, welche für die Aktivierung einer Vielzahl von Proteinen von entscheidender Bedeutung sind und aufgrund der Genstruktur nur bedingt vorausgesagt werden können.

2.3.2 Untersuchung des Proteoms

Um komplexe zelluläre Vorgänge verstehen zu können, ist es notwendig, zusätzlich zur Analyse des Genoms, auch das Proteom zu untersuchen. Solche Untersuchungen werden mit dem Begriff Proteomics umschrieben und umfassen Projekte, die dazu dienen, das Proteinrepertoire zu erfassen und die Funktionen der Proteine sowie Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinen aufzudecken (Anderson & Anderson 1998).

Die Schlüsseltechnologie zur Untersuchung der Proteinexpression ist die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese, mit der komplexe Proteingemische aus Zellen oder Geweben in einer zweidimensionalen Matrix voneinander separiert und visualisiert werden (Gorg *et al.* 1995). Das hohe Auflösungsvermögen der 2D-Gelelektrophorese beruht auf der Trennung nach zwei unabhängigen Eigenschaften von Proteinen. In der ersten Dimension werden die Proteine aufgrund ihrer Isoelektrischen Punkte (IP) getrennt, während in der zweiten Dimension eine Trennung aufgrund der Molekularmasse erfolgt. Nach der 2D-Gelelektrophorese können die Proteine direkt im Gel oder nach Transfer auf eine Membran durch Färbung quantifiziert werden. Die Methode der Wahl zur Identifizierung der Proteine ist die Massenspektrometrie (James 1997, Burlingame *et al.* 1998, McLafferty *et al.* 1999).

Unterschiede im Proteinexpressionsmuster im Gewebe der Hypophyse oder in der interstitiellen Flüssigkeit aus diesem Hirnareal bei unterschiedlichen Versorgungszuständen mit Sauerstoff zeigen im Gel die Möglichkeit für die extrarenale Steuerung der renalen Erythropoietin-Synthese auf. Die Unterschiede stellen sich dabei in Form von Intensität- oder Positionsveränderungen der Proteinspots im Gel dar.

2.3.3 Proteinanalytik

2.3.3.1 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Extraktion der Proteine aus den Geweben erfolgte in Gewebe-Lysispuffer (0,1 g/ 300 µl) und einem Proteaseinhibitormix (Roche) mit dem Ultraturrax (Ultra Turrax T25, IKA Werke, Staufen) auf Eis. Der im Puffer enthaltene Harnstoff dient als denaturierendes Reagenz, das Proteine löst und zu einer vollkommen zufälligen Konformation entfaltet, bei der alle ionisierbaren Gruppen exponiert sind. CHAPS ist ein zwitterionisches Detergens, welches eine komplette Solubilisierung der Proteine ermöglicht und Aggregation durch hydrophobe Interaktionen verhindert. Das im Puffer enthaltene DTT (Dithiothreitol) dient der Reduktion

der Disulfidbrücken. Das gewonnene Homogenat wurde für 12 min bei 3000 xg und 4°C (Haraeus Labofuge) zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.

Gewebe-Lysispuffer:	7 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	4 %	CHAPS
	40 mM	DTT

Vor Bestimmung der Proteinkonzentration wurden sowohl die Homogenate als auch die Microdialysate mittels Zeba Desalting Spins entsalzt (Pierce, Rockford, IL, USA). Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (Bradfordreagenz: 0,01% Coomassie brilliant blue G250, 5% Ethanol, 10% Phosphorsäure) und mit der BCA-Methode bestimmt (Pierce: BCA Protein Assay).

2.3.3.2 2D-Gelelektrophorese

Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die einzelnen Proteine eines Proteingemisches in der ersten Dimension zunächst durch isoelektrische Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht in einem SDS-Gel aufgetrennt. Durch geeignete Bedingungen erhält man eine Auflösung von mehreren hundert Proteinspots in einem Gel (Klose 1975, Klose & Kobalz 1995). Durch den Einsatz von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) in der ersten Dimension ist die Methode gut reproduzierbar und stellt derzeit die Standardmethode in der Proteomanalyse dar (Gorg *et al.* 1995).

Probenvorbereitung und Rehydratation

Je 100 µg bzw. 50 µg Protein wurden in je 340 µl Rehydrationspuffer aufgenommen.

Rehydrationspuffer:	7 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	2 %	CHAPS

0,5 %	Pharmalyte (entsprechend des zu untersuchenden PI Bereiches)
0,002 %	1 % Bromphenolblau Lösung
7 mg DTT pro 2,5 ml Stock kurz vor Nutzung!	

Die Proben wurden auf den Rehydrierungstray aufgebracht und die IPG-Streifen (18 cm IPG Blue Serva, Serva, Heidelberg, Deutschland) mit der Gelmatrix nach unten auf die Lösung gelegt. Die Streifen wurden dann mit Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten der Probe zu vermeiden. Um ein optimales Einquellen der Probe zu gewährleisten, musste der Rehydrierungstray vor jeder Nutzung neu ausnivelliert werden. Schräglage führt zum Verlaufen der Probe und dem Ausfallen der Proteine aus der Lösung. Die Probe wurde dann über Nacht und bei Raumtemperatur in den IPG-Streifen eingequollen.

Auftrennung in der ersten Dimension

Die aufgequollenen IPG-Streifen wurden aus dem Rehydrierungstray entnommen und das anhaftende Mineralöl durch vorsichtiges Auflegen der Unterseite des Streifens auf eine saugende Unterlage entfernt. Danach wurden die Streifen auf den Fokussierungstray (Multiphor, GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland) überführt und die hydrierten Elektrodenpapiere auf das anodische und kathodische Ende des Streifens aufgelegt. Nach Fixierung der Elektroden und dem Überschichten der Streifen mit Mineralöl wurde die Fokussierung gestartet:

1. Step:	500 V	1:00 h
2. Gradient:	1000 V	8:00 h
3. Gradient:	10.000 V	3:00 h
4. Step:	10.000 V	0:55 h.

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Streifen direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

Auftrennung in der zweiten Dimension

Vor dem Aufbringen der fokussierten IPG-Streifen auf ein SDS-Gel mussten diese equilibriert werden.

Equilibrationspuffer 1:

6 M Harnstoff

75 mM Tris HCl pH 8,8

29,3 % Glycerol (87 %)

2 % SDS

0,002 % Bromphenolblaulösung (1 %)

50 mg DTT pro 5 ml fertigen Puffer (kurz vor Nutzung dazu gegeben)

Equilibrationspuffer 2:

Siehe oben

125 mg Iodacetamid pro 5 ml fertigen Puffer (kurz vor Nutzung dazu gegeben)

Die IPG-Streifen wurden nacheinander in jeweils 5 ml Equilibrationspuffer 1 und 2 für je 15 min inkubiert. Die Inkubation der Streifen im Equilibrationspuffer 1 führte zu einer besseren Löslichkeit und Entfaltung der Proteine sowie zur Verhinderung der Aggregation und Reduktion des Elektroosmoseeffektes und somit insgesamt zu einem verbesserten Proteintransfer. Das dem ersten Puffer zugefügte DTT hält die Proteine in ihrem reduzierten Zustand. Der zweite Puffer enthält neben den bereits genannten Reagenzien statt dem DTT Iodacetamid, welches überschüssiges DTT entfernt und die Reoxidation verhindert. Es alkyliert die Thiolgruppen der Proteine und schützt so die SH-Gruppen dauerhaft. Resultat der Equilibration soll demnach ein verbesserter Proteintransfer und schärfere Banden und deutlichere Spotumrisse sein. Nach Equilibrierung wurden die Gelstreifen kurz in den Laufpuffer überführt um überschüssiges Iodacetamid zu entfernen. Danach wurden die Streifen auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgelegt und nach Applikation eines Proteinmarkers und dem Befüllen der Elektrophoresekammer (BioRad Laboratories, München, Deutschland) mit Laufpuffer bei 70 mV für ca. 18 Stunden (über Nacht) aufgetrennt.

SDS Gele:	<i>Sammelgel</i>		<i>Trenngel</i>		10 %	15 %
	Acrylamid	1,3 ml	Acrylamid	16,70 ml	25 ml	
	0,5 M TrisCl pH 6,8	2,5 ml	1,5 M TrisCl pH 8,8	21,50ml	12,5 ml	
	10 % SDS	100 µl	10 % SDS	500 µl	500µl	
	10 % APS	50 µl	10 % APS	250 µl	250 µl	
	TEMED	10 µl	TEMED	25 µl	25µl	

5xElektrodenpuffer: 45 g Tris
 216 g Glycin
 15 g SDS in 3 Liter Aqua bidest

Visualisierung der Proteine im Gel

Nach dem Auftrennen der Proteine in der 2. Dimension wurden die Gele entsprechend der geladenen Proteinmenge entweder mit Coomassie-Blau (0,25% Coomassie brilliant blue G250, 45,5 % Methanol, 9% Eisessig, 45,25% A. dest) oder mit Silber (Proteo Silver Plus, Silver Staining kit, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gefärbt.

Bei der Coomassie-Blau-Färbung wurden die Gele für jeweils 1 h gefärbt und über Nacht entfärbt (Entfärber: 30% Methanol, 7,5% Eisessig, 62,5% A.dest). Der Nachweis der kleinvolumigeren Spots wurde mit dem Proteo Silver Kit (untere Nachweisgrenze 1 ng/mm² BSA Spot) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die Gele wurden nach Färbung mit einem Durchsichtscanner (CanoScan 8400F, Canon, Hanau, Deutschland) eingelesen (300 dpi TIF-Format) und mittels 2D Auswertungssoftware analysiert (Phoretics 2D, Version 2004, Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).

Die mittels Scanner ausgelesenen Gele wurden unter Zuhilfenahme des Gel Drying Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) für das Spotpicking konserviert.

2.3.3.3 Auswertung der 2-D Gele mittels Software

Zur Auswertung der Proteinspots auf den SDS-Gelen, wurden diese nach Färbung eingescannt und als Dateien im TIF-Format abgespeichert.

Die Geldateien wurden nach Anpassung auf die gleiche Bildgröße in die 2D-Software Phoretix 2D (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) geladen. Zunächst wurde eine Intensitätskalibrierung an allen in einer Auswertung befindlichen Gelen durchgeführt, da die Proteinspots zuvor nicht densitometrisch erfasst worden waren. Dazu wurde eine vom Hersteller mitgelieferte Beispieldatei geladen und die an dieser Datei erstellte Kalibrierungskurve auf alle anderen Gele übertragen, sodass die normalerweise ermittelten arbiträren Werte mit Intensitäten verglichen werden konnten. Notwendig war diese Vorgehensweise, weil keine lineare Beziehung zwischen denen vom Scanner ermittelten Werten und denen im Originalgel besteht.

Nach erfolgter Kalibrierung und der Kontrasteinstellung konnte mit der Detektion der Proteinspots begonnen werden. Dazu wurden für alle Gele innerhalb einer Auswertung die gleichen Parameter gewählt:

Sensitivität:	9688
Operator size:	49
Noise factor:	15
Background:	15

Die Veränderung der Sensitivität und der Operator size führt zur vermehrten oder verminderten Detektion von Spots, wohingegen eine Erhöhung des Noise factors und dem Background zur vermehrten Entfernung von sogenanntem „Noise“, also Störpixeln und Hintergrundverunreinigung führt. Allerdings birgt eine zu starke Erhöhung von Noise factor und Background die Gefahr einer reduzierten Spotdetektion bzw. dem Löschen von kleinvolumigen Spots.

Zudem wurde die Funktion des automatischen Splittens von Spots, die Pen Size (1) und Grow% (30) Funktion vom Programm übernommen. Die initial gewählten Einstellungen wurden bei Einfügen eines neuen Gels oder dem Beginn einer neuer Auswertung überprüft. Es zeigte sich jedoch, dass mit der primär gewählten Einstellung, die beste Auflösung und deutlichste Darstellung der Spots erreicht werden konnte.

Nach erfolgter Detektion der Spots mussten diese manuell überprüft und korrigiert werden. Dabei war zu beachten, dass insbesondere Verunreinigungen der Gele oder typische

Marken, entstanden durch Markerbanden oder beispielsweise Beschädigungen der Glasplatten, nicht in die Auswertung gelangten. Nach Entfernung „falscher“ Spots, Teilung oder manuellem Detektieren von Spots war dieser Teil abgeschlossen.

Im nächsten Schritt wurde der Hintergrund aus den Gelen abgezogen, um genaue Messungen der Spots zu ermöglichen. Für die hier verwendeten Gele wurde der „Mode of Non-Spot“ gewählt, der vollautomatisch funktioniert. Dazu sucht das Programm ein Rechteck, welches den Spot komplett umschließt. Dieses Rechteck wird nun zu allen Seiten mit einer vom Anwender gewählten Zahl von Pixeln umgeben, in denen nach „Störpixeln“, die nicht zum eigentlichen Spot gehören, gesucht wird. Die am häufigsten auftretende Pixelintensität innerhalb eines solchen Rechtecks gilt dann als Hintergrundwert für diesen Spot. Es wurde hier der Pixel-„default“-Wert 45 des Programmes für den Ausschnitt übernommen, bei dem erfahrungsgemäß die besten Ergebnisse erzielt werden.

Im nächsten Schritt wurde der eigentliche Abgleich/Vergleich der Gele vorgenommen. Dazu musste ein Referenzgel innerhalb der Auswertung bestimmt werden. Die Spots des Referenzgels werden, dann farblich hervorgehoben, als „Masterspots“ im zu bestimmenden Gel dargestellt. So konnten übereinstimmende Punkte im Overlay-Modus übereinandergelegt, gematcht, werden. Aufgrund unterschiedlicher Laufmuster von Gel zu Gel würde dies normalerweise zu Verzerrungen führen, die jedoch durch die Software ausgeglichen werden.

Nach erfolgreichem Matching musste die Normalisierung erfolgen. Die Normalisierung erlaubt einen genaueren Vergleich der Spotmessungen zwischen verschiedenen Gelen. Im hier gewählten Modus „Total Spot Volume Normalisation“ wurde die Größe jedes einzelnen Spots durch die Totalgröße aller im Gel befindlichen Spots geteilt. Die daraus resultierende Zahl war erwartungsgemäß sehr klein und musste mit einem Skalierungsfaktor multipliziert werden, der im Programm mit x100 vorgegeben ist und somit eine prozentuale Spotgröße ergab.

Im Folgenden wurde nun für jeden Versuchsansatz (Kontrolle, Erhöhung des ICP und Anämie) ein Durchschnittsgel, ein sogenanntes Average Gel, erstellt. Dazu wurden für jeden Versuchsansatz mehrere Gele, auch derselben Probe, angefertigt und mit Hilfe eines Referenzgels gematcht. Diese artifiziellen Gele wurden aus einer statistischen Kombination

der verschiedenen Gele generiert. Dabei wurde die Spotgröße im Durchschnittsgel aus den Mittelwerten, den dazugehörigen Fehlern und Abweichungen errechnet.

Mithilfe dieser Average Gele war es dann möglich einen tatsächlichen Vergleich zwischen den verschiedenen Versuchskonditionen anzustellen. Um diese Unterschiede kenntlich zu machen verfügt die Software über eine Vielzahl von Möglichkeiten. Hier wurde die farbige Kennzeichnung verschieden stark regulierter Punkte oder neu erscheinender Spots gewählt.

2.3.3.4 Identifikation der Proteinspots mittels MALDI-MS

Zur Bestimmung der in der 2D-Gelelektrophorese entdeckten, gemeinsam regulierten Proteine, wurden eine MALDI-MS (tryptischer Fingerprint) bei der Firma WITA GmbH (Teltow, Deutschland) in Auftrag gegeben.

Den getrockneten silbergefärbten Gelen wurde pro Probe jeweils ein Spot entnommen und einem tryptischen In-Gel-Verdau unterworfen. Alle der untersuchten Proben waren frei von humanem Keratin.

Materialien

Es wurden ausschließlich Chemikalien, inklusive Wasser der Reinheitsklasse "MALDI-MS Grade", "LC-MS-Grade" oder "Protein Sequence Analysis-Grade" verwendet. Alle Gebrauchslösungen wurden frisch angesetzt. Alle verwendeten Glasgeräte werden ausschließlich für MS-Zwecke verwendet.

Tryptischer In-Gel Verdau

Die mit einem Skalpell ausgeschnittenen Gelproben wurden 30 min rehydriert, anschließend gevortext. Die noch anhaftende Folie wurde mit Skalpell und Pinzette auf einer Glasplatte unter einer Cleanbench entfernt. Die Spots wurden mit 15 mM Kaliumhexacyanoferrat / 50mM Natriumthiosulfat entfärbt, mit Wasser und 10 % Acetonitril farblos gewaschen und mit 25 ng Sequence-Grade modified Trypsin (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) in 10 % Acetonitril über Nacht verdaut. Die Peptidextraktion erfolgte mit 5 µl 50 % bzw. 5 µl 70 % Acetonitril.

Target-Präparation

Verdaulösung und Extrakte wurden auf 4 Positionen eines 400/384 Anchor Chip Target (Bruker Daltonics, Bremen) aufgetragen. Position 1: 2-3 µl Verdaulösung, Position 2: 2-3 µl 50 % Extrakt, Position 3: 2-3 µl 70% Extrakt, Position 4: Pool von je 2-3 µl aller Extrakte, mit 1 µl Matrixlösung (HCCA, α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) aufgenommen und mit Methanol rekristallisiert.

Proteinidentifizierung mit MALDI-MS-Fingerprint

Die Spektrenaufnahme erfolgte automatisch mit einem Bruker Reflex III MALDI Massenspektrometer. Als Messbereich wurde 0 – 4 kDa verwendet. Als MALDI-MS Geräteparameter waren eingestellt: Reflektor: „Positive Mode“, 25 kV und „Matrix Deflection“: 0-400 Da. Die Analyse und Spektrennachbearbeitung erfolgte mit der FlexAnalysis 2.0 Software (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Die Identifizierung der Proteine erfolgte mit der Bio-Tools 2.2-Software (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) und über einen Mascot Server 2.0 (Matrix Science, London, UK) unter Verwendung der NCBI nr Proteinsequenzdatenbank.

Für 10 der 11 untersuchten Spots waren Massenlisten erhältlich, die im Rahmen einer Mascotsuche im Rattengenom signifikante Zuordnungen zu Proteinen erlaubten. Die im Rattengenom nicht zuordenbare Massenliste des elften Spots ergab einen signifikanten Treffer bei der Suche in Säugergenomen.

2.4 Analytik

2.4.1 Bestimmung der Erythropoietin-Konzentration

Die Bestimmung der Erythropoietin-Konzentration erfolgte mittels ELISA (Medac, Hamburg, Deutschland). Der Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert.

Mit Hilfe des ELISA können verschiedenste biomolekulare Substanzen oder auch niedermolekulare Verbindungen in einer Probe nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezieller Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Die Antikörper oder teilweise auch das Antigen werden zuvor mit einem bestimmten Enzym markiert. Die von dem Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens.

Die hier verwandte Technik ist der klassische Sandwich-ELISA, bei dem zwei hoch spezifisch an das Antigen bindende Antikörper genutzt werden. Eine 96-Well Mikrotiterplatte war mit Anti-Epo-Antikörpern (Maus, monoklonal) gebrauchsfertig vorbeschichtet. Das 1:2 verdünnte Plasma wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation band das Antigen (Epo) aus der Probe an den an die Platte gebundenen Antikörper. Nach dreimaligem Auswaschen der Platte mit Puffer wurde das Anti-Epo-Antikörper-ALP-Konjugat (Anti-Epo-Antikörper konjugiert mit alkalischer Phosphatase) in die Wells pipettiert. Durch Bindung des enzymkonjugierten Antikörpers wurde der Sandwichkomplex komplettiert. Nach erneutem Auswaschen wurde das zunächst farblose Substrat pNPP (p-Nitrophenylphosphat) hinzu gegeben, welches durch das Enzym in ein gelbes Substrat umgesetzt wurde. Die Stärke dieser Farbreaktion ist mittels eines Photometers (Extinktion bei 405 nm) messbar und ihre Intensität ist proportional zur Antigen (Epo)-Konzentration in der Probe.

Bei der Ermittlung der Erythropoietin-Konzentration aus den Blutproben der Ratten wurde anstelle eines humanen Erythropoietin-Standards, ein Ratten-Erythropoietin-Standard verwandt, der mit Hilfe der *In-vivo*-Methode nach Cotes und Bangham (1961), modifiziert nach Jelkmann und Bauer (1981) kalibriert wurde.

2.4.2 mRNA Extraktion aus Geweben

Die Extraktion der mRNA aus den Organproben wurde mit Hilfe der ABI 6100 PrepStation (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Dazu wurden die Organe (20 mg/ ml) in Lysispuffer (2x Nucleic Acid Purification Lysis Solution, Applied Biosystems) 1:2 verdünnt mit PBS aufgenommen und mit einem Ultraturrax (Ultra Turrax T25, IKA Werke, Staufen, Deutschland) auf höchster Stufe homogenisiert. Nach 30 min auf Eis wurden die Proben zur weiteren Verarbeitung aliquotiert. Aufgrund der hohen Viskosität von Gewebeproben musste ein Verdau mit Proteinase K (Fluka, Steinheim, Deutschland) durchgeführt werden, dem dann eine Vorfiltration (Tissue Prefilter Tray, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) in der ABI 6100 PrepStation folgte. Danach konnte die eigentliche Extraktion der mRNA aus den Gewebekomponenten erfolgen. Im letzten Schritt der Extraktion wurde die mRNA in 500 µl Puffer (Nucleic Acid Purification Elution Solution, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) eluiert und sofort bei -20°C eingefroren.

2.4.3 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (QRT-PCR) nach reverser Transkription

2.4.3.1 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, muss die abgelesene RNA untersucht werden. Bei der Amplifikation von DNA werden spezifische DNA-Polymerasen verwendet, die DNA-abhängig sind. Diese sind daher nicht in der Lage RNA zu amplifizieren. Stattdessen bedient man sich der RNA-abhängigen-DNA-Polymerase Reverse Transkriptase (RT), welche aus der mRNA eine komplementäre cDNA erstellt. Als Primer für die Reverse Transkription wurden Oligo-dt-Primer verwendet, diese sind kurze Nukleotide, die ausschließlich aus der Base Thymidin bestehen. Sie binden an den Poly-A-Überhang von zellulärer mRNA und ermöglichen so eine gezielte Amplifikation. Die cDNA kann im Anschluss als Ausgangsprodukt in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren.

2.4.3.2 QRT-PCR

Die QRT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während des PCR-Zyklus. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung des Amplikons ist die Nutzung von DNA-interkalierenden-Farbstoffen. Diese emittieren, nach Anregung durch energiereiche ultraviolette Strahlung, Licht im sichtbaren energieärmeren Bereich (Fluoreszenz). Liegt der Farbstoff frei vor, ist die Emission sehr gering. Erst nach Einbau des Farbstoffes in die doppelsträngige DNA während der Amplifikation wird die Lichtemission verstärkt. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist es, dass nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse des Produktes durchgeführt wird, anhand derer man die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität bestimmen kann.

Das Reaktionsgemisch wird dabei in 1°C-Schritten von 50°C auf 95°C erhitzt, wobei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wird. Am Schmelzpunkt der doppelsträngigen DNA kommt es zu einem Abfall der Fluoreszenz, einem Peak, da der interkalierende Farbstoff von der nun einzelsträngigen DNA dissoziiert.

2.4.3.3 Primer und Programme:

cDNA-Synthese (Gesamtreaktionsvolumen 25 µl):

1 µg Gesamt-RNA

2,5 µl einer 50 pmol Oligo-dt-Primer Lsg. (Roche, Penzberg, Deutschland) in A. bidest
Denaturierung bei 68°C für 15 min; 15 min Abkühlen auf Eis

RT- Puffer (Roche, Penzberg, Deutschland)

2,5 mM Mischung aller 4 NTPs (peqLab, Erlangen, Deutschland)

100 U Reverse Transkriptase (SuperScript III, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Die Synthese erfolgte in einem Biometra Thermocycler: 45 min bei 42 °C, weitere 45 min bei 52 °C, die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 100 °C für 10 min gestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

QRT- PCR:

Die Analyse der Erythropoietin-Genexpression wurde mittels semiquantitativer PCR in Doppelbestimmung in einem Volumen von 25 µl durchgeführt:

5 µl Template der cDNA

PCR SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

20 pM des 5'- und 3'- Primers aus der codierenden Sequenz des Rattengens:

(5'-CAGCCACCAGAGAGTCTTCAGC-3' und 5'-ACATCAATTCCTTCTGAGCTCCC-3')

Die Amplifikation wurde im ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) wie folgt durchgeführt: 10 min bei 95°C zur Aktivierung der DANN-Polymerase und der Doppelstrangdissoziation, gefolgt von 40 Zyklen (15 s, 95 °C für die Primeranlagerung und 1 min, 60 °C zur Strangverlängerung). Durch die bereits erwähnte Schmelzkurvenanalyse wurde die Bildung eines spezifischen PCR-Produktes bestätigt.

Die erhaltenen Daten wurden mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet, bezogen auf eine endogene Kontrolle. Als endogene Kontrolle diente hier das murine ribosomale Protein L28 (5'-CAGATCCGGTCAGCGAAAAC-3' und 5'-GATGCTGCTGAGGGTAGCCC-3') das in 5 µl einer 1:4000 Verdünnung quantifiziert wurde.

2.4.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger, z.B. eine Nitrocellulosemembran, übertragen

werden, wobei die Proteine auf der Membran immobilisiert werden. Die Bindung der Makromoleküle erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken. Das ursprünglich im Gel erhaltene Bandenmuster bleibt nach der Übertragung erhalten, sodass sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine, z.B. deren enzymatische Aktivität erhalten bleibt.

Als Immuno-blotting bezeichnet man generell immunologische Techniken, bei denen man die auf die Membranen transferierten Proteine mit Antikörpern reagieren lässt. Die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Proteine kann auf verschiedene Weise nachgewiesen werden. Beim direkten Nachweis der Proteine werden Antikörper eingesetzt, die mit Enzymen (z.B. Peroxidase) konjugiert oder in anderer Weise markiert sind. Bei der indirekten Nachweismethode wird ein bereits gebundener, spezifischer Antikörper durch einen Sekundärantikörper nachgewiesen, der seinerseits in geeigneter Weise markiert ist.

Im hier vorliegenden Versuch wurden Leberhomogenate in einer 12,5 % SDS-PAGE bei 120 V im elektrischen Feld aufgetrennt und im Semidry Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (10 V, 1 h). Der Erfolg der Übertragung wurde mit einer Ponceau S Färbung überprüft. Nach Blockierung der Membran mit 5 % Trockenmilch (in PBS) über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten Primärantikörper EPO-goat, N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland); α -Tubulin Mouse, AA12 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) in 3% Milch (in PBS) für 1 Stunde. Die Membran wurde mehrfach mit PBS gewaschen (3 x 15 min) und dann mit dem 1:1000 verdünnten Sekundärantikörper (donkey-anti-goat –HRP, sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland); goat-anti–mouse-HRP (DAKO, Carpinteria, CA, USA) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit ECL-Spray (Amersham, Braunschweig, Deutschland) versehen und auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Die im Verlauf auftretende Chemiluminiszenzreaktion des Luminols, katalysiert durch die am Sekundärantikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase, schwärzte den Film an den jeweiligen Bindungsstellen.

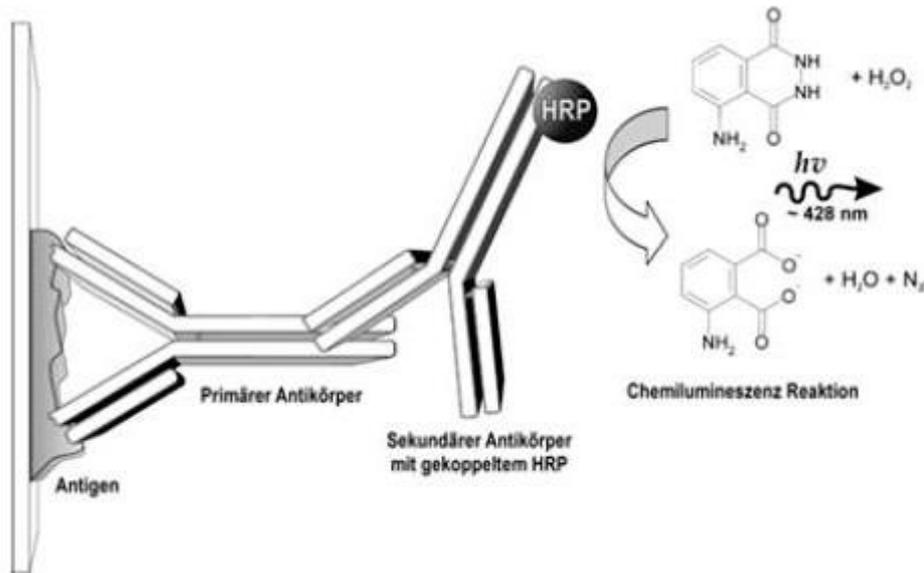


Abb.7: Proteinnachweis im Western Blot mittels indirektem Immuno-Blotting

An die auf der Membran befindlichen Proteine bindet spezifisch der Primärantikörper. An diesen bindet wiederum der mit der Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper. Zur Visualisierung der Proteine wird die Membran mit einem ECL-Spray versehen. Das im ECL-Spray befindliche Luminol wird durch das Enzym in seine oxidierte Form überführt, und die bei der Reaktion freiwerdenden Lichtquanten schwärzen den vorher aufgelegten Röntgenfilm.

(Quelle: www.wikipedia.org)

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der intrakraniellen Druckerhöhung auf verschiedene Kreislauf- und systemische Parameter

Wie unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte (von Wussow *et al.* 2005), führt eine 10 minütige Erhöhung des intrakraniellen Druckes zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Erythropoietin-Konzentration im Plasma. Die intrakranielle Druckerhöhung führte zu einem konsekutiven und statistisch signifikanten Abfall des Sauerstoffpartialdruckes im venösen Blut des Sinus sagittalis superior (Abb. 8).

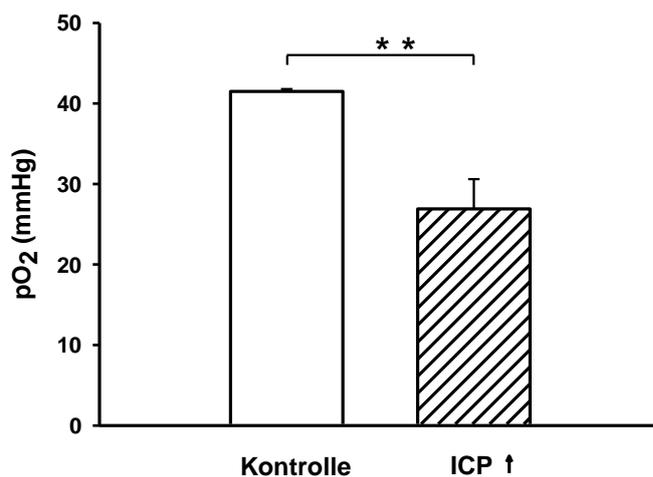


Abb.8: Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes im venösen Blut des Sinus sagittalis superior

Dargestellt ist die Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) im venösen Blut des Sinus sagittalis superior nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min (**: $p < 0,01$ vs. Kontrolle; ungepaarter t-Test, $n = 3 - 5$).

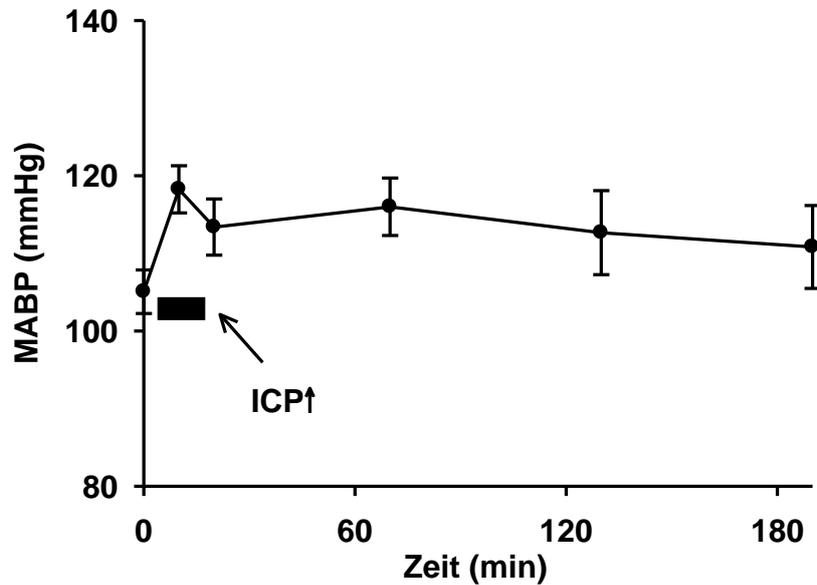


Abb.9: Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)

Die Erhöhung des intrakraniellen Druckes für 10 min auf 100 mmHg führte zu keiner bleibenden Veränderung des mittleren arteriellen Blutdruckes

Eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes führte nur initial zu einer leichten Veränderung des mittleren arteriellen Blutdruck von $112,7 \pm 14,2$ mmHg (Abb. 9), gemittelt über den gesamten Versuchszeitraum.

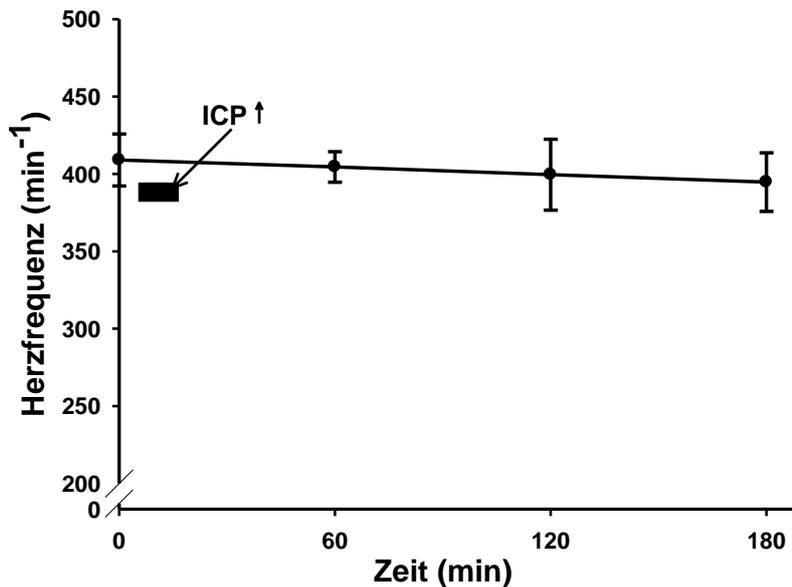


Abb.10: Messung der Herzfrequenz während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)

Bei der Messung der Herzfrequenz während und nach der Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min zeigte sich keine unmittelbare Beeinflussung der Schlagfrequenz durch das experimentelle Prozedere.

Die Konstanz der Blutdruckwerte spiegelt sich in den Werten für die Herzfrequenz wieder. Weder während der Druckerhöhung noch im restlichen Verlauf der dreistündigen Versuche zeigten sich nennenswerte Abweichungen von der mittleren Herzfrequenz von $401,9 \pm 17,7 \text{ min}^{-1}$ (Abb. 10).

Über die Versuchsdauer wurden stündlich arterielle Blutproben entnommen, um die Sauerstoffversorgung des restlichen Organismus im Vergleich zur cerebralen Situation zu dokumentieren. Der arterielle pO_2 lag durchschnittlich bei $85,0 \pm 8,8 \text{ mmHg}$ (Abb. 11) und blieb über den gesamten Versuchszeitraum stabil.

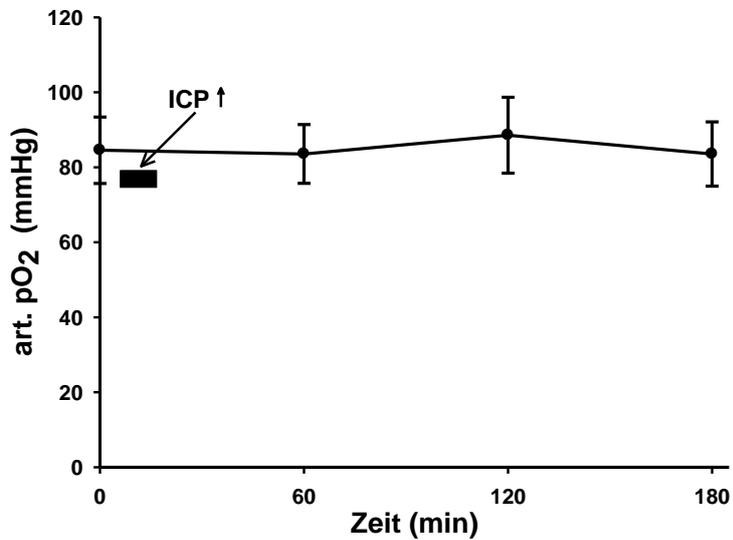


Abb.11: Arterieller pO₂ während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)

Dargestellt ist der Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min.

Die Werte für den pCO₂ lagen über den gesamten Versuchszeitraum durchschnittlich bei $39,4 \pm 2,8$ mmHg (Abb. 12).

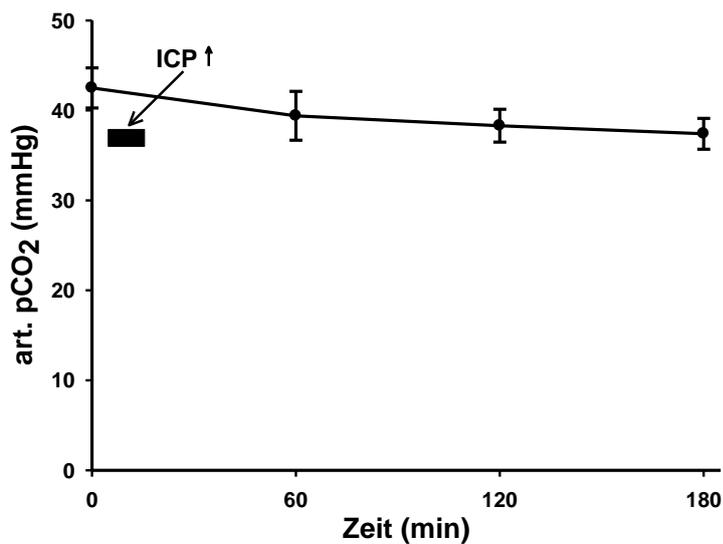


Abb.12: Arterieller pCO₂ während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)

Dargestellt ist der arterielle Kohlendioxidpartialdruck im Blut der A. femoralis während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min.

Der arterielle pH-Wert lag durchschnittlich bei $7,4 \pm 0,1$ und schwankte nur minimal um diesen Wert (Abb. 13).

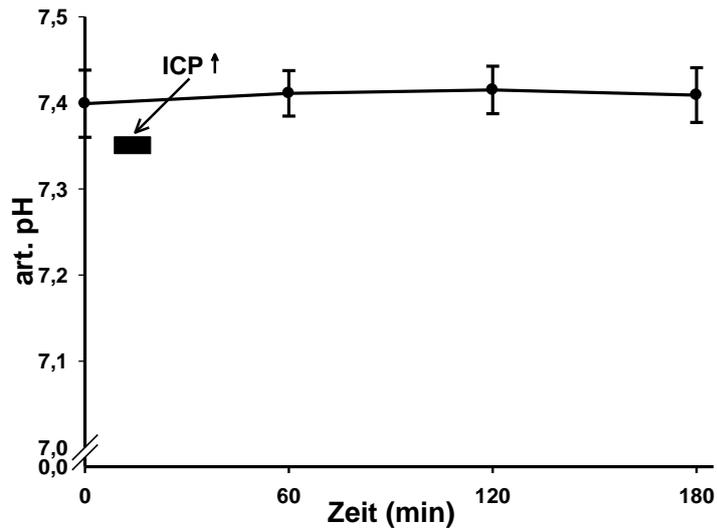


Abb.13: Messung des pH-Wertes während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)

Aufgetragen sind die stündlich gemessenen pH-Werte im arteriellen Blut während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min.

3.2 Einfluss der Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf den renalen Blutfluss

Um sicherzustellen, dass die Erhöhung des intrakraniellen Druckes keinen Einfluss auf den renalen Blutfluss und damit die O₂-Versorgung der Niere hatte, wurde der renale Blutfluss an der Arteria renalis während der Erhöhung des ICP gemessen (Abb. 14).

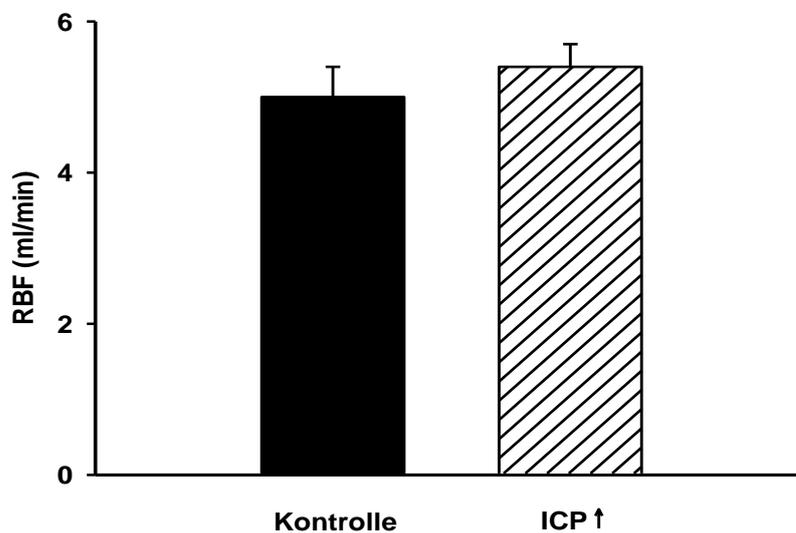


Abb.14: Renaler Blutfluss (RBF) unter Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)

Gemessen wurde der renale Blutfluss unter Kontrollbedingungen und bei Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min (n = 4 - 5).

Es zeigte sich, dass keine Unterschiede hinsichtlich des renalen Blutflusses zwischen den Kontrolltieren ($4,9 \pm 0,4$ ml/min) und den Tieren mit Erhöhung des intrakraniellen Druckes ($5,4 \pm 0,2$ ml/min) durch die Erhöhung des intrakraniellen Druckes resultieren.

3.3 Messung der Erythropoietin-Konzentration nach Erhöhung des ICP bei hypophysektomierten Tieren

Die Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg führte bei hypophysektomierten Tieren (HX-Tiere) zu keiner gesteigerten Erythropoietin-Produktion in der Niere.

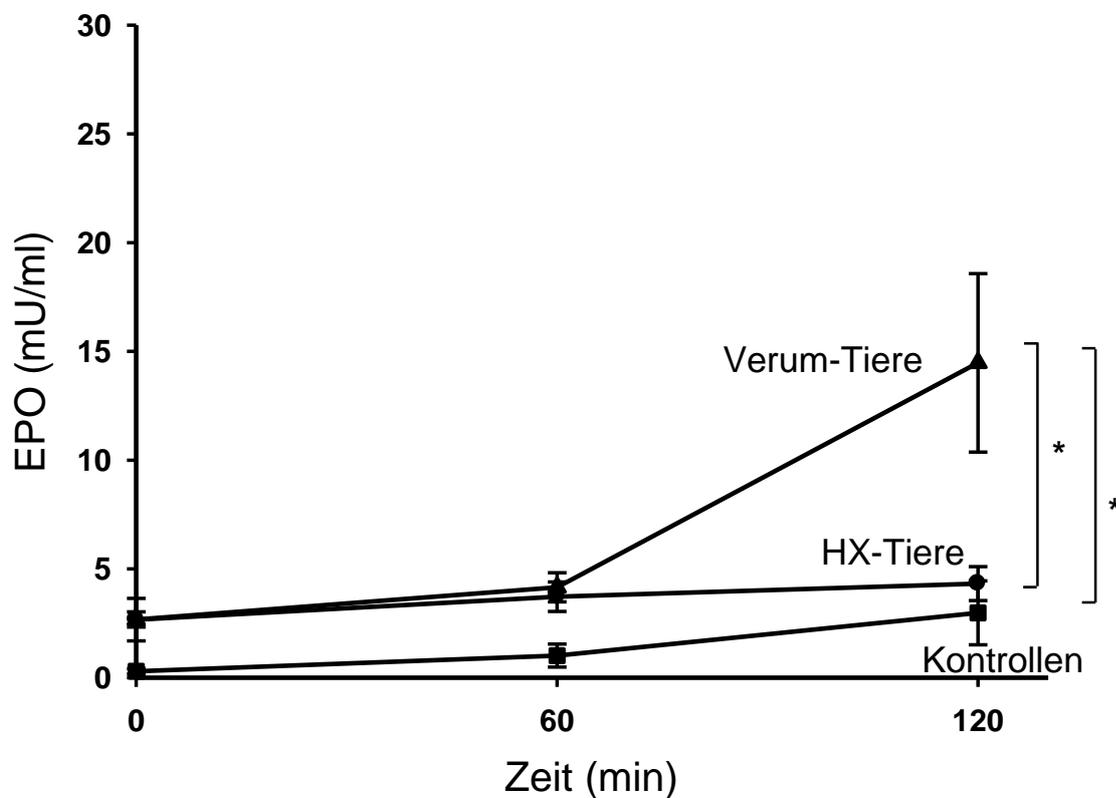


Abb.15: Erythropoietin-Konzentration im Plasma von HX-Ratten nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)

Dargestellt sind die Erythropoietin-Konzentrationen im Plasma von Kontrolltieren und nach Erhöhung des ICP auf 100 mmHg für 10 min in normalen Tieren sowie in hypophysektomierten Tieren (n = 5 – 10; * : p < 0,05; Tukey-Kramer-Test).

Über den Versuchszeitraum von 120 min stieg bei den intakten Tieren (Verum-Tiere) die Plasma-Erythropoietin-Konzentration statistisch signifikant an (vergl. von Wussow *et al.*

2005). Dieser Anstieg ist bei den hypophysektomierten Tieren (HX-Tiere) komplett ausgeblieben (Abb.15).

3.4 Vergleich einer gesteigerten Erythropoietin-Produktion durch eine lokale und systemische Hypoxie

Vergleicht man die Ergebnisse der Konzentrationsmessung im Plasma, die nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes gewonnen wurden, mit den Werten nach Erzeugung einer Anämie, so ergab sich kein nennenswerter Unterschied zwischen den beiden Versuchsansätzen. Die Erhöhung des intrakraniellen Druckes führte zu einer signifikanten Erhöhung des Erythropoietin-Spiegels im Plasma von $2,67 \pm 0,75$ mU/ml auf $14,47 \pm 9,17$ mU/ml und auch die Induktion einer Anämie führte zu einem signifikanten Anstieg der Erythropoietin-Konzentration im Plasma von $2,03 \pm 1,25$ mU/ml auf $17,76 \pm 13,53$ mU/ml (Abb. 16).

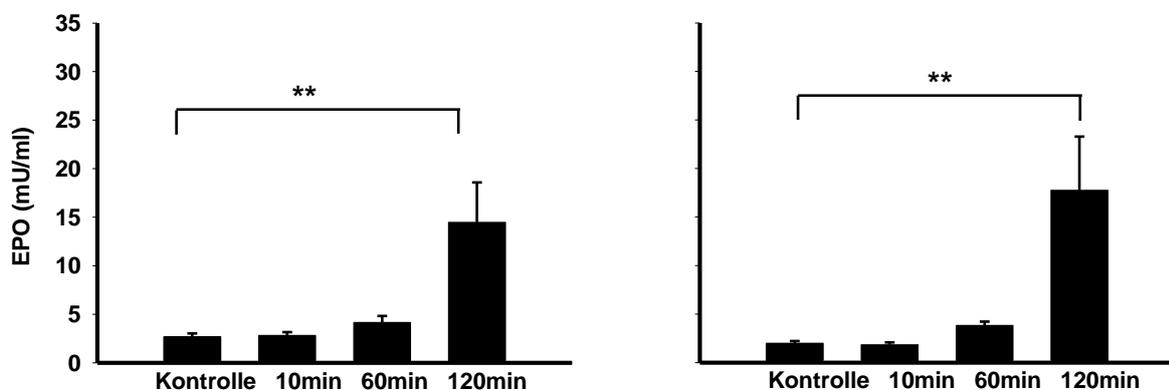


Abb.16: Erythropoietin-Konzentration im Plasma nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder Induktion einer Anämie.

Gemessen wurden die Konzentrationen im Plasma zum Zeitpunkt 0, 10, 60 und 120 min nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min ($n = 5 - 13$) oder nach Erzeugung einer Anämie durch Senkung des Hämatokrits von 40 auf 30 % ($n = 6 - 12$; **: $p < 0,01$; Dunnetts-Test).

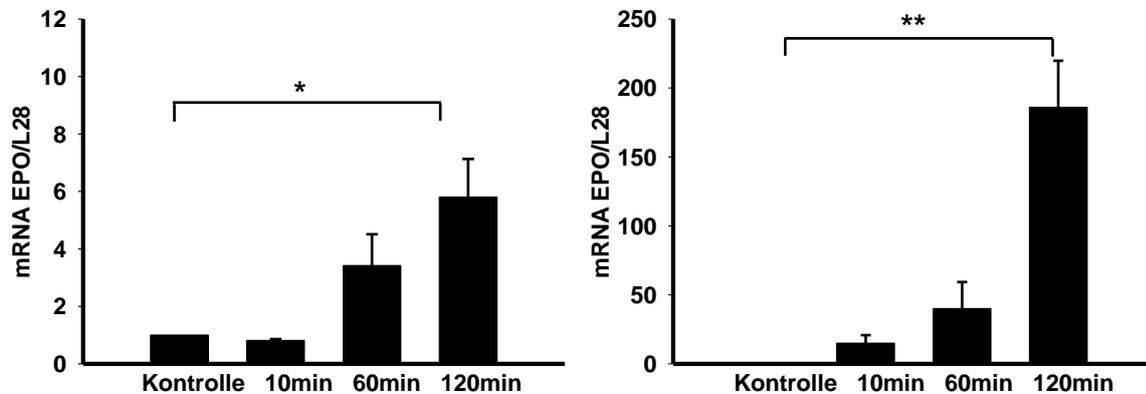


Abb.17: Erythropoietin-Gen-Induktion nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder der Erzeugung einer Anämie

Aufgetragen ist die mittels quantitativer real time RT PCR ermittelte Induktion der Erythropoietin-Genexpression nach Erhöhung des ICP zum Zeitpunkt 10, 60 und 120 min ($n = 3 - 5$; *: $p < 0,05$; Dunnetts-Test), sowie nach Erzeugung einer Anämie durch Senkung des Hämatokrits um 10% bezogen auf den auf 1 normalisierten Kontrollwert (interner Standard L 28) ($n = 3$; **: $p < 0,01$; Dunnetts-Test).

Auch auf Ebene der Genexpression war bei beiden Versuchsansätzen eine Induktion zu beobachten, wobei es unter der systemischen Hypoxie, herbeigeführt durch eine Absenkung des Hämatokrits, zu einer deutlicheren Induktion der Genexpression kam. Eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min führte zu einer $5,8 \pm 2,9$ fachen Induktion der Genexpression, während eine Anämie zu einer 186 ± 58 fachen Induktion führte (Abb. 17).

3.5 Einfluss einer lokalen bzw. systemischen Hypoxie auf die Erythropoietin-Genexpression in verschiedenen Hirnarealen

Die Messung der Erythropoietin-Genexpressionsraten erbrachte folgende Ergebnisse für die verschiedenen Hirnarealen: Im Cortex kam es initial nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes zu einer $4,9 \pm 4,3$ fachen Induktion, die im Verlaufe der Versuche auf Werte von $1,8 \pm 0,9$ und $1,7 \pm 0,6$ zurückging. Nach Erzeugung einer Anämie kam es im Cortex zunächst zu einer deutlich verminderten Expression ($0,5 \pm 0,1$), die nach 1 Stunde bei

0,8 ± 0,1 bzw. nach 2 Stunden bei annähernd dem Niveau der Kontrollwerte lag 0,9 ± 0,3 (Abb. 18 A).

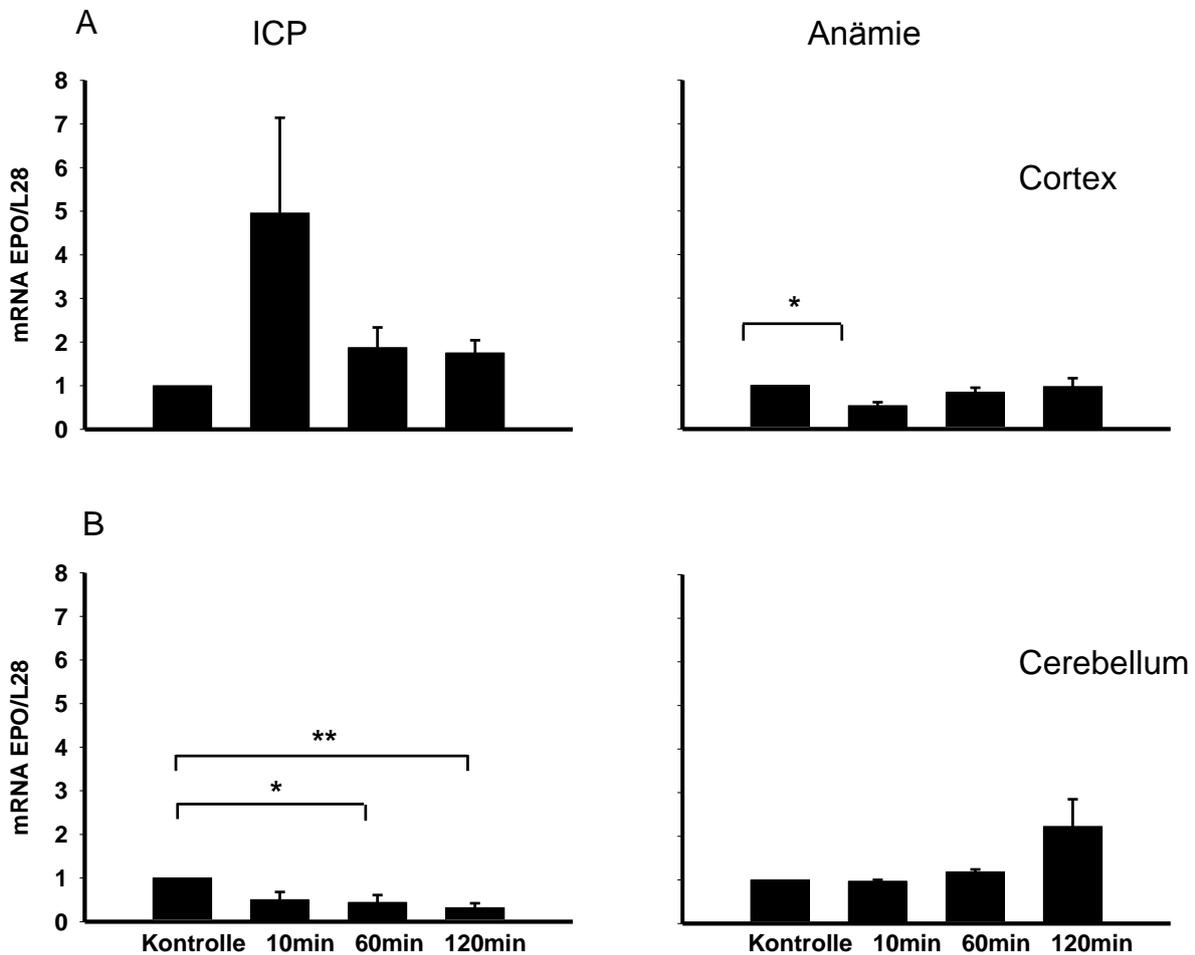


Abb. 18: Erythropoietin-Genexpression nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder nach Induktion einer Anämie in Cortex und Cerebellum

Dargestellt ist die mittels quantitativer real time RT PCR gemessene Expression des Erythropoietin-Gens im Cortex (A) und Cerebellum (B) jeweils nach Erhöhung des ICP auf 100 mmHg für 10 min (Cortex: n = 4 - 5; Cerebellum: n = 4) oder nach Auslösung einer Anämie (Cortex: n = 3 - 5; Cerebellum: n = 3 - 4) zu den Zeitpunkten 10, 60 und 120 min bezogen auf den auf 1 normalisierten Kontrollwert (interner Standard L28) (*: p < 0,05 und **: p < 0,01; Dunnetts-Test).

Im Cerebellum kam es nach Hirndruckerhöhung zu einer konsekutiven und deutlichen Herunterregulation der Erythropoietin-Genexpression von dem auf 1 normalisierten Kontrollwert auf eine 0,5fache (± 0,3) Induktion nach 10 min, über eine 0,4fache (± 0,3)

Induktion nach einer Stunde bis hin zu einer 0,3fachen ($\pm 0,2$) Induktion nach zwei Stunden. Im gleichen Hirnareal führte ein Absenken des Hämatokrits hingegen zu einer Zunahme der Erythropoietin-Genexpression von einer 1,2fachen ($\pm 0,1$) Induktion nach einer Stunde bis hin zu einer 2,2fachen ($\pm 1,1$) Induktion nach zwei Stunden (Abb.18 B); diese Änderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

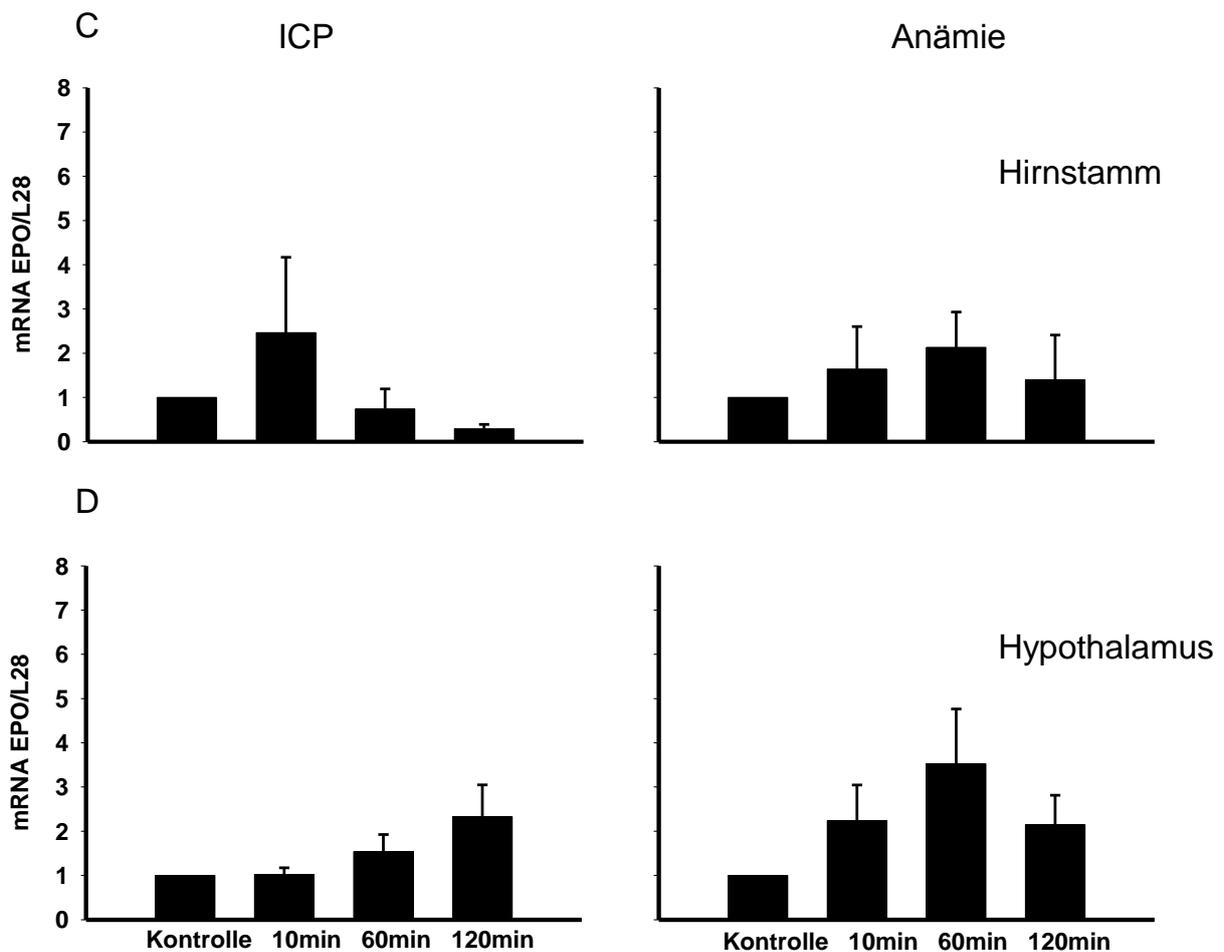


Abb.19: Erythropoietin-Genexpression nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder nach Induktion einer Anämie in Hirnstamm und Hypothalamus

Aufgetragen sind die mittels quantitativer real time PCR gemessenen Expressionsraten des Erythropoietin-Gens im Hirnstamm (C) und im Hypothalamus (D) nach Erhöhung des Hirndruckes auf 100 mmHg für 10 min (Stamm: n = 2 - 5; Hypothalamus: n = 3 - 5) oder nach Erzeugung einer Anämie (Stamm:n = 2 -5; Hypothalamus: n = 2 - 4) zu den Zeitpunkten 10, 60 und 120 min bezogen auf den auf 1 normalisierten Kontrollwert (interner Standard: L28).

Ein Anheben des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min führte im Hirnstamm initial zu einem Anstieg der Genexpression um ein 2,4faches ($\pm 2,4$), um dann im Verlauf des Versuchszeitraums auf Werte deutlich unter den Kontrollwert zu sinken, nach einer Stunde lagen die Werte bei $0,7 \pm 0,7$ bzw. bei $0,3 \pm 0,2$ nach zwei Stunden. Die Induktion einer Anämie führte in diesem Hirnareal zu einer Hochregulation des Erythropoietin-Gens innerhalb der ersten Stunde vom Kontrollwert auf $1,6 \pm 1,3$ zum Zeitpunkt 10 min hin zu $2,1 \pm 1,3$. Bis zum Zeitpunkt 120 min kam es dann zu einer leichten Abnahme auf $1,4 \pm 1,4$ (Abb. 19 C).

Im Hypothalamus führte die Erhöhung des intrakraniellen Druckes über die gesamte Versuchsdauer zu einem kontinuierlichen Anstieg der Erythropoietin-Genexpression vom Kontrollwert auf ein $2,3 \pm 1,6$ faches zum Zeitpunkt 120 min, während das Herbeiführen einer Anämie bis zum Zeitpunkt 60 min zu einem Anstieg auf ein $3,5 \pm 2,1$ faches führte und die Werte bis zum Zeitpunkt 120 min wieder auf ein $2,1 \pm 1,4$ faches fielen (Abb. 19 D).

Im Gegensatz diesen Ergebnissen stehen die Werte der Messungen im Hypophysengewebe. Dort führte die Erhöhung des intrakraniellen Druckes zu einem deutlicheren Anstieg der Genexpression als in allen anderen untersuchten Hirnarealen. Innerhalb der ersten Stunde kam es zu einer 124fachen (± 168) Induktion der Genexpression im Vergleich zum Kontrollwert. Im Verlauf der zweiten Stunde sank die Genexpression auf eine 94fache (± 84) Induktion und lag damit immer noch deutlich über den Kontrollwerten (Abb. 20). Das Absenken des Hämatokrits und damit das Herbeiführen einer systemischen Hypoxie führte in der Hypophyse zu einer signifikanten Abnahme der Expression des Erythropoietin-Gens über den Versuchszeitraum verglichen mit dem auf 1 normalisierten Kontrollwert. Zum Zeitpunkt 10 min lagen die Werte bei $0,03 \pm 0,04$, nach einer Stunde bei $0,03 \pm 0,03$ und nach zwei Stunden bei $0,07 \pm 0,01$ (Abb. 20).

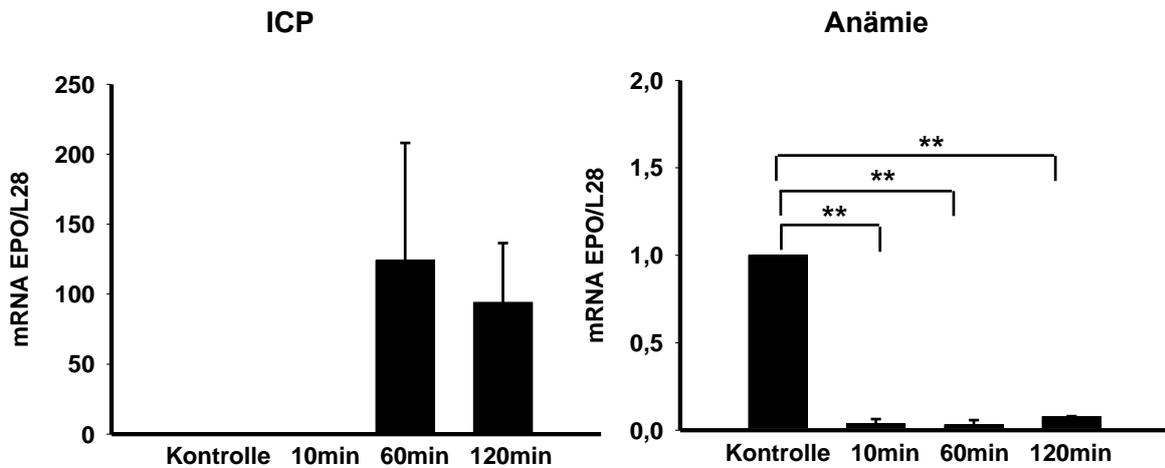


Abb.20: Erythropoietin-Genexpression in der Hypophyse nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder nach Induktion einer Anämie

Gemessen wurde die Expression des Erythropoietin-Gens mittels quantitativer real time PCR im Hypophysengewebe nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes auf 100 mmHg für 10 min (n = 4) oder nach Induktion einer Anämie (n = 2 – 4; **: p < 0,01 Dunnetts-Test) nach jeweils 10 min, 60 min und 120 min bezogen auf den auf 1 normalisierten Kontrollwert (interner Standard: L28).

3.6 Induktion einer gesteigerten Erythropoietin-Synthese in der Leber durch eine cerebrale und systemische Hypoxie

Um die Bedeutung einer cerebralen bzw. systemischen Hypoxie auf die Erythropoietin-Produktion zu beurteilen, muss auch die Produktion von Erythropoietin in der Leber betrachtet werden. Zwar ist die Leber nur während der fötalen Phase Hauptproduzent des die Erythropoiese stimulierenden Hormons, jedoch leistet sie auch im Adulten einen, wenn auch geringen, Anteil an der gesamten Erythropoietin-Produktion im Körper. Die Reaktionen der Leber auf die Erhöhung des intrakraniellen Druckes und auf eine Anämie wurden im Folgenden mittels quantitativer real time RT RCR und im Western Blot dargestellt.

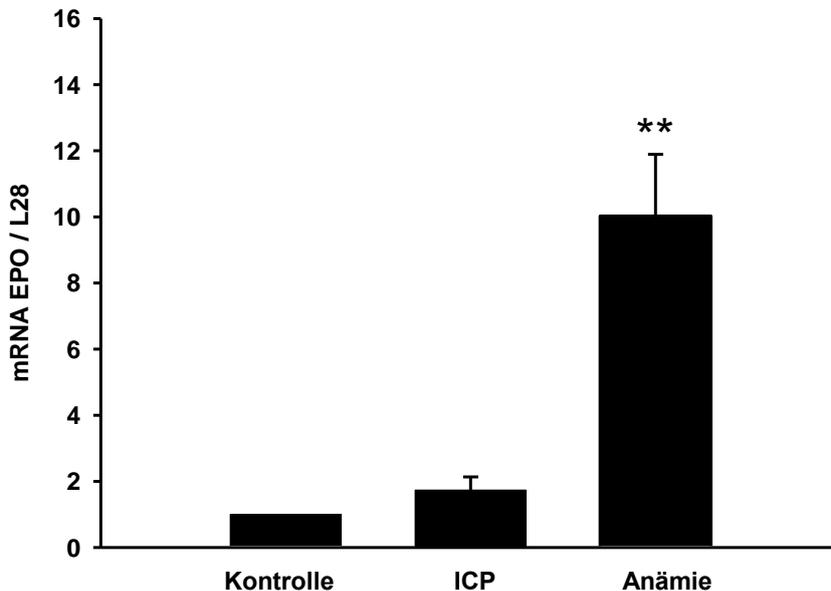


Abb. 21: Erythropoietin-Genexpression in der Leber nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder nach Induktion einer Anämie

Dargestellt ist die Erythropoietin-Genexpression gemessen mit quantitativer real time RT PCR nach Erhöhung des ICP auf 100 mmHg für 10 min und nach Induktion einer Anämie (n = 4; **: p < 0,01; Dunnett's-Test) im Vergleich zur auf 1 normalisierten Kontrolle (interner Standard: L28).

Die Leberhomogenate zeigten eine Induktion der Erythropoietin-Genexpression von $1,7 \pm 0,4$ nach Erhöhung des ICP und eine Induktion von $10,0 \pm 1,8$ unter Anämie im Vergleich zur auf 1 normalisierten Kontrolle. Nur die systemische Hypoxie führte in der Leber zu einer signifikanten Erhöhung der Erythropoietin-Genexpression und verdeutlichte die Bedeutung der cerebralen Hypoxie für die renale Erythropoietin-Expression (Abb. 21).

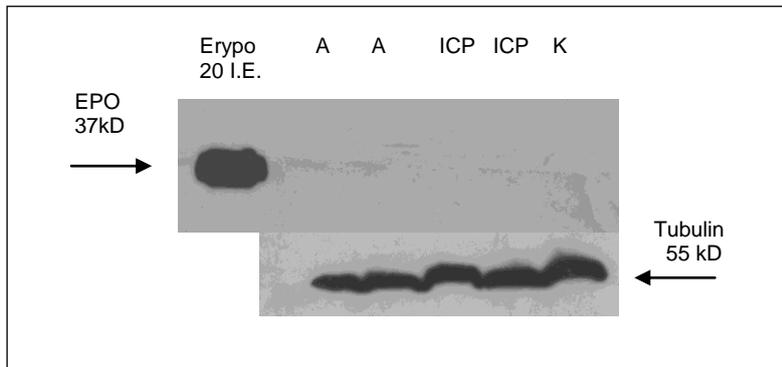


Abb. 22: Erythropoietin Western Blot der Leberhomogenate

Aufgetragen waren jeweils 200 μg Protein der Kontroll-, 2 Hirnhochdruck- und 2 Anämieproben, sowie 20 I.E. des gentechnisch hergestellten Erythropoietins (Erypo; Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) als Positivkontrolle. Der Nachweis von Tubulin diente als interne Kontrolle. Nachgewiesen wurde mit dem polyclonalen Erythropoietin-Antikörper N-19 und dem Tubulin-Antikörper AA12 (beide Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland).

Auf Proteinebene ließ sich weder nach Einleitung einer cerebralen Hypoxie noch nach Einleitung einer Anämie eine Induktion der hepatischen Erythropoietin-Produktion beobachten. Der ebenfalls ausgebliebene Nachweis von Erythropoietin in der Kontrolle machte deutlich, dass zu wenig Erythropoietin unter allen drei Bedingungen in der Leber produziert wurde, um sie im Western Blot nachweisen zu können. Die Nachweisgrenze der Meerrettich-Peroxidase lag im Bereich von 10-20 pg (Burnette 1981); demnach sollten schon kleine Mengen sichtbar sein. Die Ladekontrolle mit dem Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung des Geles mit jeweils 200 μg Gesamtprotein (Abb. 22).

3.7 Stimulation der Erythropoietin-Produktion durch Hypophysendialysate *in-vitro*

3.7.1 Stimulation der Erythropoietin-Produktion durch Hypophysendialysate in einer Hepatom-Zelllinie

Die Microdialysate aus den Versuchen mit erhöhtem ICP lösten sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie keine statistisch signifikante Induktion der Erythropoietin-Genexpression in den HepG2-Zellen aus. Unter hypoxischen Bedingungen kam es zu leichten Anstiegen der

Expression, die je nach Dialysat schwankten und wie erwähnt keine statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. (Abb. 23 links).

Tab. 1: Zusammensetzung der Proben für Versuche in der Zellkultur

Leerkontrolle (nur Medium)	LK
Implantation + Equilibration (1h)	E
Kontrolle	K
ICP/Anämie(0-60 min)	P1
ICP/Anämie (60-120 min)	P2
ICP/Anämie (120-180min)	P3

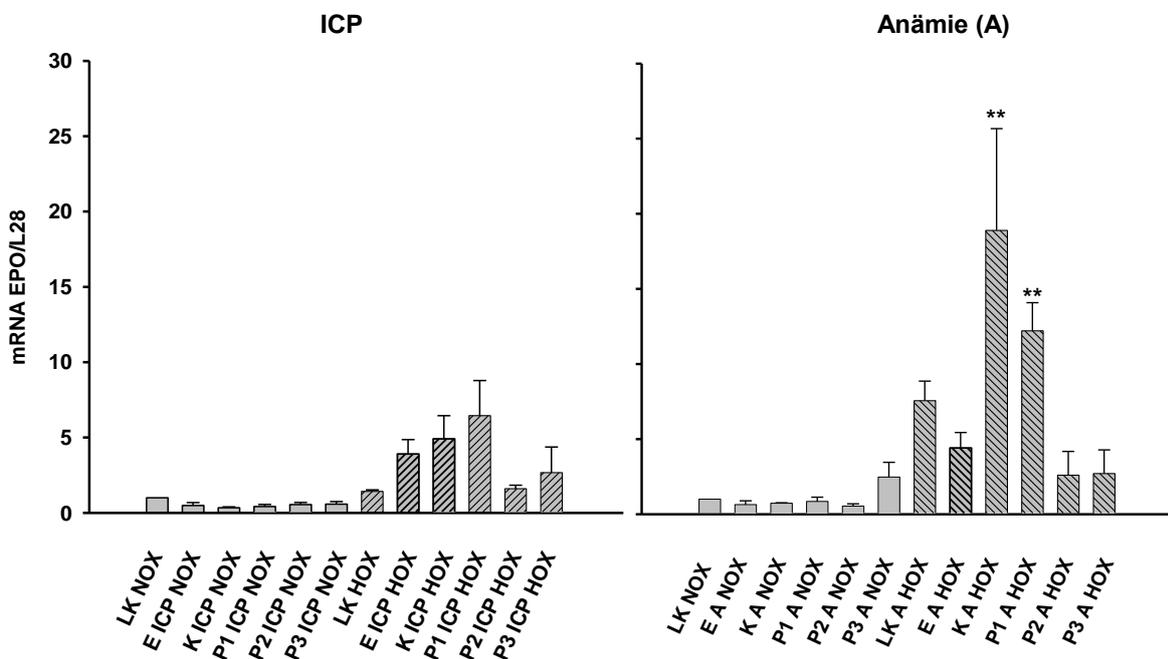


Abb. 23: Erythropoietin-Genexpression in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Mikrodialysaten aus dem Bereich der Hypophyse

Aufgetragen sind die mittels quantitativer real time RT PCR ermittelten Erythropoietin-Genexpressionsraten von HepG2-Zellen unter Normoxie (NOX = 21% O₂) oder unter Hypoxie (HOX = 1 % O₂) und 24stündiger Inkubation mit den jeweiligen Microdialysaten (n = 4, **: p < 0,01 Dunnetts – Test vs. LK A NOX) bezogen auf die auf 1 normalisierten Kontrollen (interner Standard: L28).

Die unter Anämie gewonnenen Dialysate lösten unter Normoxie eine geringgradige Hemmung der Erythropoietin-Genexpression aus. Lediglich die HepG2-Zellen, die mit der P3 Probe inkubiert wurden, zeigten eine leichte Induktion auf. Unter hypoxischen Bedingungen kam zu der für HepG2-Zellen typischen hypoxischen Induktion der Erythropoietin-Genexpression im Vergleich zur normoxischen auf 1 normalisierten Medium-Leerkontrolle. In den Zellen, die mit der Equilibrationsprobe inkubiert wurden, zeigte sich eine leichte Hemmung der hypoxischen Induktion. Die während der Kontrollphase in den Anämieversuchen gewonnenen Dialysate, sowie die Dialysate der mit der Probe 1 behandelten Zellen lösten unter Hypoxie eine statistisch signifikante Induktion der Erythropoietin-Genexpression in den HepG2- Zellen aus im Vergleich zu den normoxischen Leerkontrollen (Abb. 23 rechts).

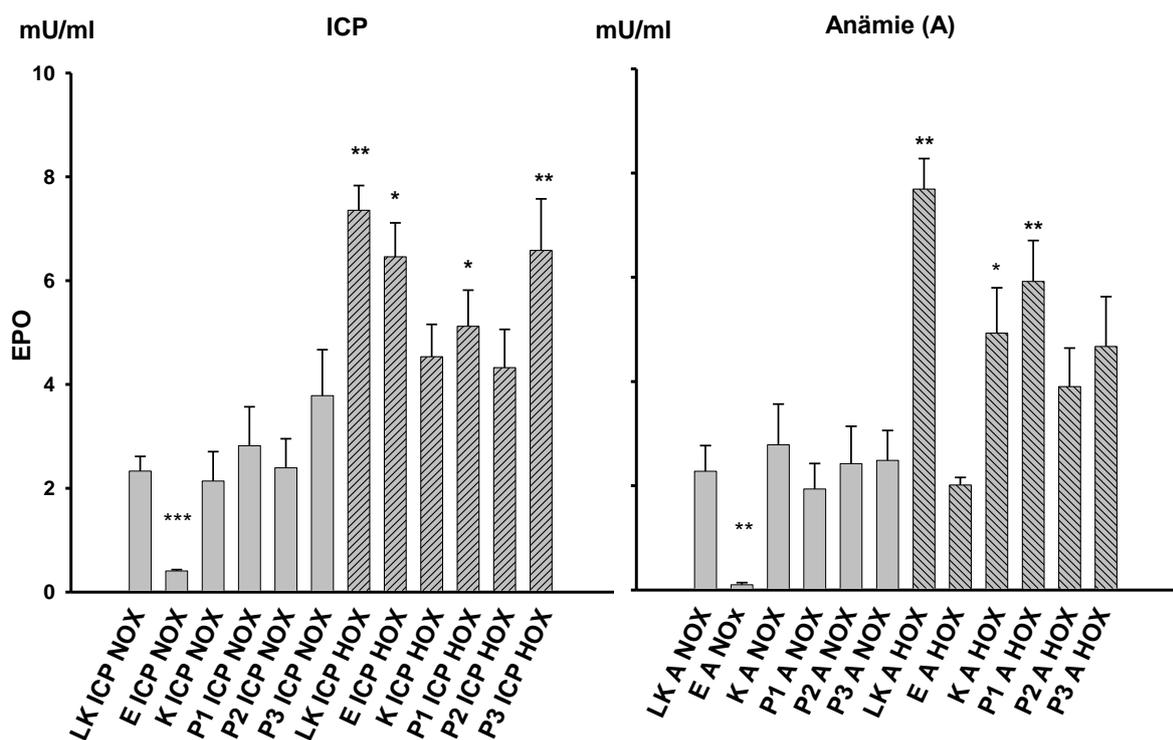


Abb. 24: Erythropoietin-Konzentrationen im Medium nach Inkubation mit hypophysären Mikrodialysaten

Dargestellt sind die im Medium mittels ELISA gemessenen Erythropoietin-Konzentrationen aus HepG2-Zellen, inkubiert (24 h) mit verschiedenen Microdialysaten aus Versuchen mit erhöhtem ICP ($n = 4$, *: $p < 0,05$ und **: $p < 0,01$ Dunnetts-Test vs. LK ICP NOX sowie ***: $p < 0,001$ Welch t-Test vs. LK ICP NOX) und herbeigeführter Anämie ($n = 4$, *: $p < 0,05$ und **: $p < 0,01$ Dunnetts-Test vs. LK A NOX sowie **: $p < 0,01$ Welch t-Test vs. LK A NOX) unter normoxischen (21% O_2) und hypoxischen (1% O_2) Verhältnissen.

Die Inkubation der HepG2-Zellen mit den Dialysaten aus den Versuchen mit erhöhtem ICP und Anämie führte unter normoxischen Bedingungen nur zu marginalen Änderungen der Erythropoietin-Synthese (Abb. 24).

Unter Kontrollbedingungen, also Einsatz von normalem Kulturmedium, ließ sich bei den HepG2-Zellen $2,3 \pm 0,2$ (LK ICP NOX) bzw. $2,7 \pm 0,4$ (LK A NOX) mU/ml Erythropoietin nachweisen. Die Equilibrationsproben, sowohl aus Versuchen mit erhöhtem ICP als auch Anämieversuchen, führten unter normoxischen Bedingungen zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Erythropoietin-Synthese in den Zellen. Die Dialysatkontrollen aus den Hirnhochdruckversuchen führten unter Normoxie zu Erythropoietin-Konzentrationen im Medium, die dem Kontrollniveau entsprachen. Gleiches galt für Dialysate aus den Probezeiträumen P1-P3.

Unter Hypoxie kam es in den Medium-Leerkontrollen zu der für HepG2-Zellen typischen hypoxischen Induktion der Erythropoietin-Synthese auf $7,3 \pm 0,4$ mU/ml (LK ICP HOX) bzw. $7,7 \pm 0,6$ mU/ml (LK A HOX). Sowohl die Dialysate aus den Hirnhochdruckversuchen als auch aus den Anämieversuchen führten unter Hypoxie zu vergleichbaren, teils statistisch signifikanten Steigerungen, der Erythropoietin-Abgabe in das Medium im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen und auch im Vergleich zur Inkubation unter Normoxie.

3.7.2 Stimulation der Erythropoietinproduktion durch Hypophysendialysate in einer Nierenfibroblasten-Zelllinie

Auch hier konnte eine hypoxische Induktion der Erythropoietin-Genexpression in den Medium-Leerkontrollen beobachtet werden (Abb. 25). Die unter Hirnhochdruck gesammelten Dialysate des Kontrollintervalls führten unter Normoxie zu einer Induktion der Erythropoietin-Genexpression in der Nierenfibroblasten-Zelllinie, die sich unter Hypoxie noch steigerte. Die Dialysate des Hirnhochdruck-Intervalls P2 führten weder unter Normoxie noch unter Hypoxie zu einer weiteren Induktion der Erythropoietin-Genexpression im genutzten Nieren-Zellmodell.

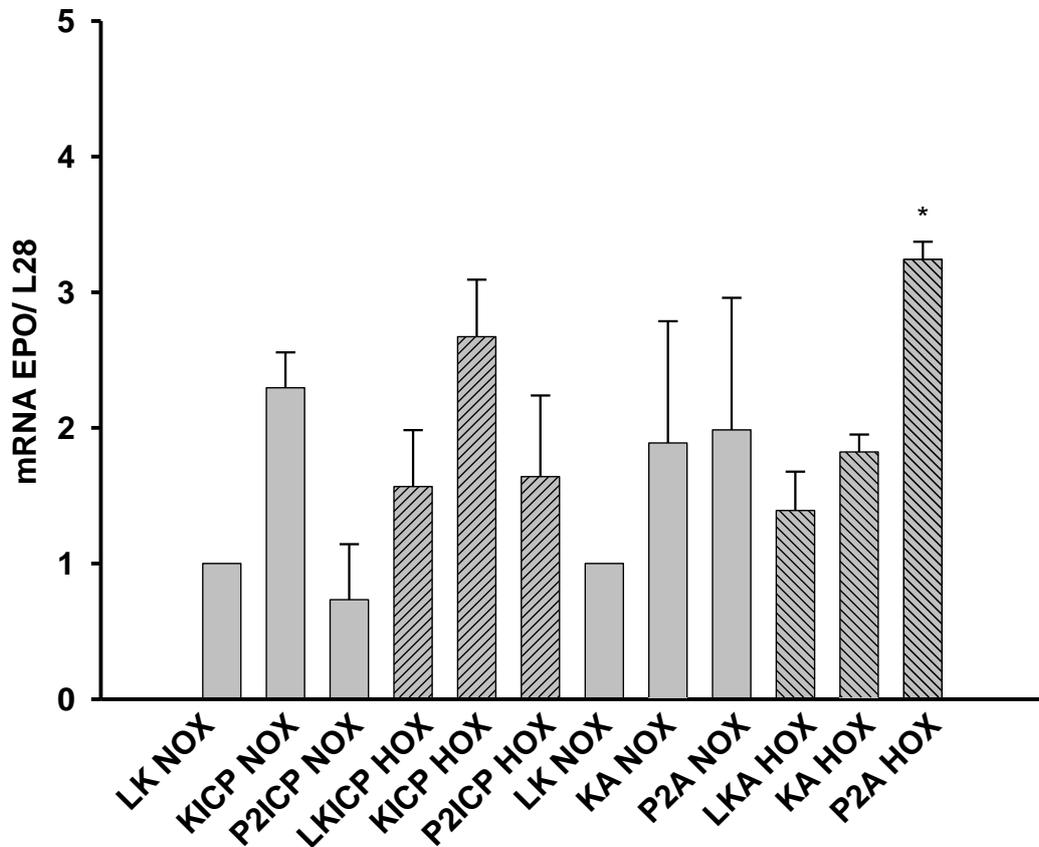


Abb. 25: Erythropoietin-Genexpression in COS7-Zellen nach Inkubation mit hypophysären Mikrodialysaten

Aufgetragen sind die mittels real time RT PCR gemessenen Erythropoietin-Genexpressionen in COS7-Zellen nach Inkubation mit Microdialysaten, gewonnen während Erhöhung des ICP (n = 3 - 4) und nach Erzeugung einer Anämie (n = 3 - 4, *: p < 0,05 Tukey-Kramer-Test) unter normoxischen (21% O₂) und hypoxischen (1 % O₂) Bedingungen, bezogen auf die auf 1 normalisierten Kontrollen (interner Standard L28).

Im Vergleich dazu führten die Dialysate aus den Kontrollintervallen der Anämieversuche während normoxischer Inkubation zu einer Induktion der Erythropoietin-Genexpression in den COS7-Zellen. Unter hypoxischer Inkubation zeigte sich keine Veränderung zum unter Normoxie erreichten Induktionwert. Die Dialysate der Anämieversuche aus dem Sammelintervall P2 führten unter Normoxie zu einer leichten Induktion der Erythropoietin-Genexpression und unter Hypoxie zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Genexpression in der Nierenfibroblasten-Zelllinie.

3.8 Veränderungen des hypophysären Proteoms nach cerebraler und systemischer Hypoxie

Um genauere Aussagen über Faktoren der Hypophysen-Hypothalamus-Region treffen zu können, die durch die hier angewandten Versuchsansätze beeinflusst worden waren, wurde das Proteom dieser Region mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht. Hypophysen wurden nach Kontrollversuchen, nach Erhöhung des ICP und nach Erzeugung einer Anämie entnommen, homogenisiert und deren Proteine in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die während der verschiedenen Versuche gewonnenen Mikrodialysate stellten den Teil der in die Cerebrospinalflüssigkeit sezernierten Proteine dar und wurden ebenfalls in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteinspots wurden mit Hilfe der Silberfärbung visualisiert und mit einer Auswertungssoftware nach Vorkommen, isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht beurteilt. Zur Unterscheidung wurde das normalisierte Volumen der Spots herangezogen.

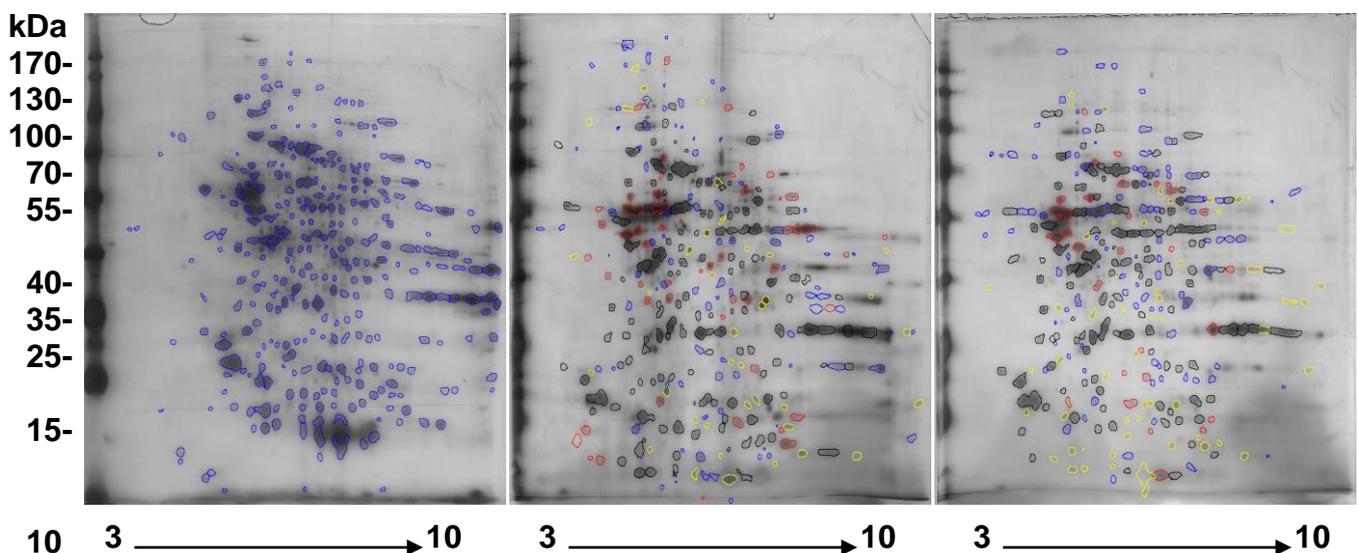


Abb. 26: Unterschiede im hypophysären Proteom nach Induktion einer cerebralen Hypoxie oder Anämie

Dargestellt sind 2D-Durchschnittsgel (n = 13 - 14 aus 3 – 5 Versuchen), die das jeweilige Proteom für die unter Kontrollbedingungen (links), nach Erhöhung des ICP (mitte) und Erzeugung einer Anämie (rechts) gewonnenen Hypophysenhomogenaten zeigen. Rot dargestellt sind die mehr als 2fach heraufregulierten Proteinspots, gelb dargestellt sind die mehr als 2fach herunterregulierten Spots und schwarz umrandet sind die weniger als 2fach regulierten Proteine dargestellt. In den Gelen nach Induktion einer Hypoxie blau umrandete Spots markieren nicht gemeinsam auftretende Proteinmuster.

Die entweder nach cerebraler oder systemischer Hypoxie gewonnenen Hypophysenhomogenate zeigten in der 2D-Gelelektrophorese neben konservierten Proteinmustern auch eine Vielzahl von Unterschieden, sowohl im Muster als auch in der Intensität der konservierten Spots. In den Kontrollgelen konnten durchschnittlich $492,9 \pm 35,3$ Spots ($n = 13$ aus 3 – 5 Versuchen) detektiert werden. In den Gelen aus den Homogenaten der Hypophysen nach ICP waren $414 \pm 14,8$ Proteinpunkte ($n = 14$ aus 4 - 5) und in denen der Hypophysen nach Anämie waren $395,5 \pm 35,2$ Punkte ($n=14$ aus 4 - 5) nachweisbar.

Nach 3 voneinander unabhängigen Gesamtauswertungen mit gleichen Detektions-, Matching-, Subtraktions- und Normalisationsmethoden der Gele aller Individuen, Eingrenzung der pI-Bereiche und mehrfachen Wiederholung aller Gelelektrophoresen, konnte ein Vergleich angestellt werden. Um Unterschiede in der Regulation verschiedener Proteinspots deutlich zu machen, wurde mittels der Software das normalisierte Volumen der Spots in Bezug auf eine gegen 1 gesetzte Kontrolle errechnet. Diese Regulationsunterschiede konnten dann durch verschieden farbige Spotumrandungen visualisiert werden (Abb. 26). Nach Abgleich der unterschiedlichen Regulationsmuster und Volumina konnte ein Durchschnittskontrollgel erstellt werden, in dem alle gemeinsam regulierten Spots aus allen Gelen, sowohl unter erhöhtem ICP oder Anämie in ihrer Regulation dargestellt wurden (Abb. 27).

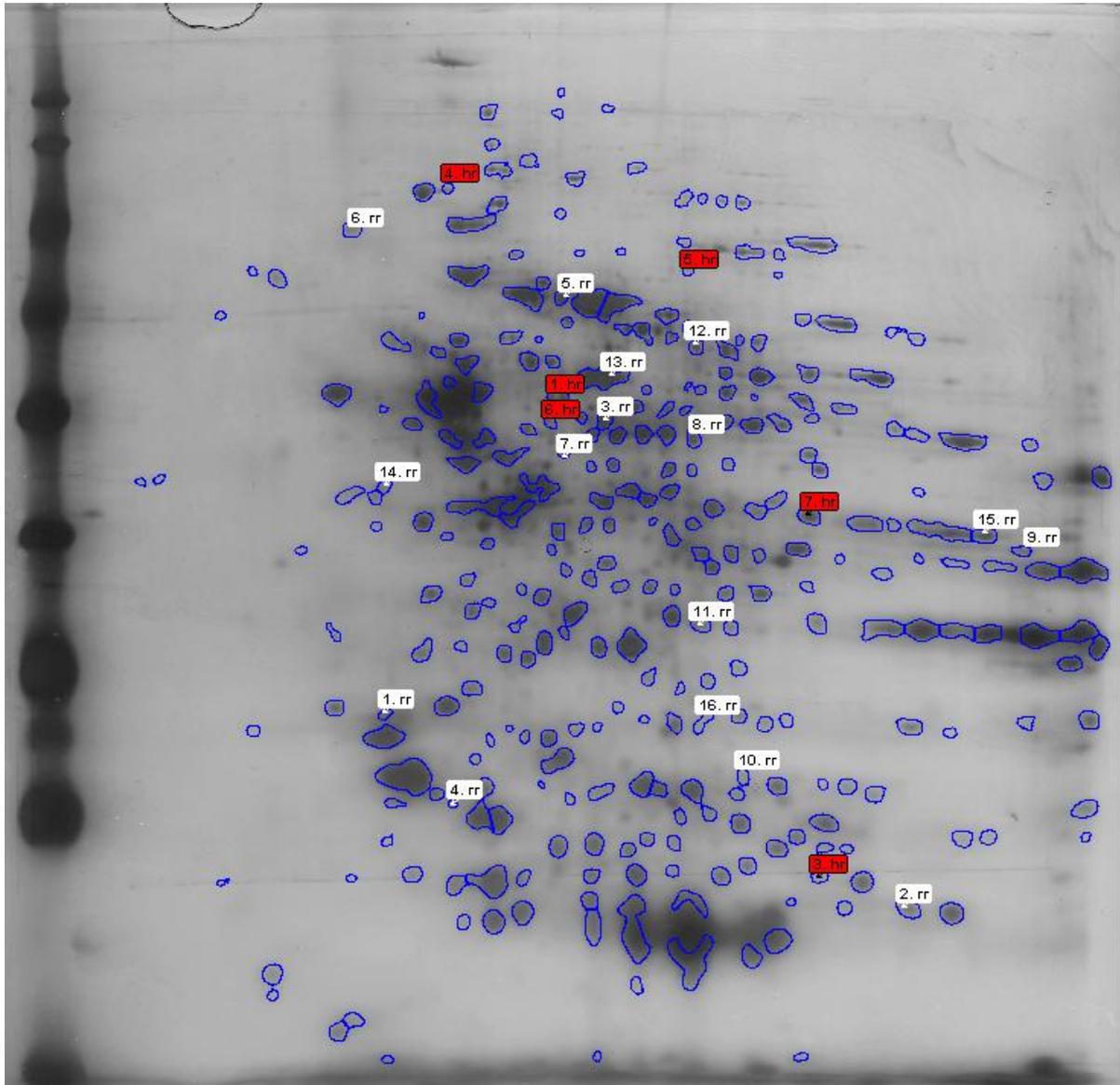


Abb. 27: Vergleichsdarstellung der gemeinsam regulierten Proteinspots aller Gele

Dargestellt ist ein Durchschnittskontrollgel mit den gemeinsam in Hirnhochdruckversuchen und Anämieversuchen regulierten Proteinspots. Weiß markiert sind die Proteine, die sowohl unter Erhöhung des ICP als auch unter einer Anämie mehr als 1,8fach im Vergleich zu denen auf 1 normalisierten Kontrollspots herunterreguliert oder komplett verschwunden waren. Rot markiert sind die Proteinspots, die unter beiden Versuchsbedingungen mehr als 1,8fach im Vergleich zu denen auf 1 normalisierten Kontrollspots herraufreguliert waren.

Zur Auswertung mittels MALDI-MS waren nur 11 der 22 deutlich unterschiedlich regulierten Proteinspots aufgrund zu geringer Proteinmenge oder zu kleinem Gesamtvolumen der übrigen Spots geeignet; die regulierten Spots waren dabei mit einer Signifikanz von 0,01

insgesamt unterschiedlich (ANOVA) und mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ bis $0,001$ (Student t-Test) unterschiedlich zur Kontrolle (Abb. 28).

Es handelte sich bei diesen Spots ausschließlich um Proteine aus den Hypophysenhomogenaten.

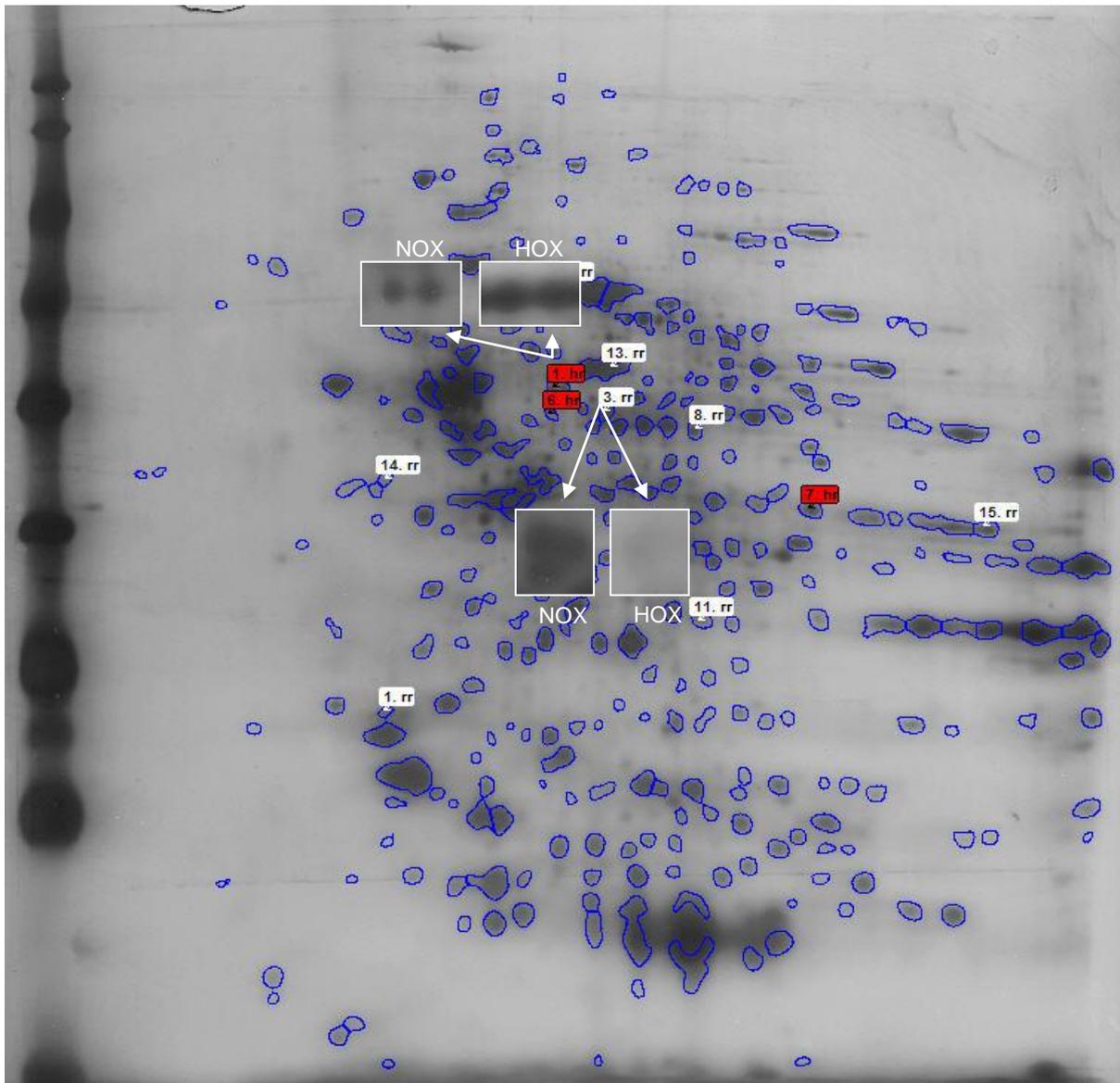


Abb. 28: Vergleichsdarstellung der gemeinsam regulierten und in der MS ausgewerteten Proteine

Dargestellt sind die sowohl unter cerebraler als auch unter systemischer Hypoxie, gemeinsam regulierten Proteine, die mit der MALDI-MS auswertbar waren. Herausgestellt sind Beispiele für ein hochreguliertes (1hr) und ein herunterreguliertes (3rr) Protein unter Kontrollbedingungen (NOX) und unter Hypoxie (HOX).

Von den 11 gemeinsam regulierten und per MS auswertbaren Proteinen wurden 3 nach Induktion einer Hypoxie hochreguliert (vergl. Tab.2). Bei den signifikant regulierten Proteinen handelt es sich einmal um eine Protonenpumpe (1hr: 2,9fach hochreguliert) und um eine Methyltransferase (7hr:1,8fach hochreguliert). Das dritte nicht signifikant hochregulierte Protein wurde in der MS als Regulator der Rab-GTAPase Aktivität (6hr: 3,5fach hochreguliert) identifiziert (Abb. 28). Die restlichen 8 Proteinspots wurden nach Induktion einer Hypoxie herunterreguliert und konnten weitgehend eindeutig mittels MALDI-MS bestimmt werden. Im Einzelnen handelt es sich dabei um zwei Oxidoreductasen mit verschiedenen Lokalisationen. Der Spot 1rr (3,3fach herunterreguliert) wurde als cytoplasmatische Dehydrogenase des Folatmetabolismus identifiziert, während es sich bei Spot 3rr (11,3fach herunterreguliert) um ein mitochondriales Protein, die Aldehyddehydrogenase 2 handelte.

Ebenfalls herunterreguliert, wenn auch aufgrund starker Varianzen nicht signifikant, wurde der Spot 5rr (2,4fach herunterreguliert), für den in der MS eine Albuminisoform ermittelt wurde. Spot 8rr (1,9fach herunterreguliert) auch aufgrund hoher Varianzen nicht signifikant reguliert, wurde in der MS als CDC25A, ein Protein des Zellzyklus identifiziert.

Der Spot 11rr (9,7fach herunterreguliert) stellt einen hoch signifikant und stark durch Hypoxie herunterreguliertes, nicht charakterisiertes Protein der UPF (uncharacterized protein family) dar. Weiterhin signifikant herunterreguliert war der Spot 13rr (3,5fach herunterreguliert), ein ER-(Endoplasmatisches Retikulum) Protein, welches der Zell-Redoxhomöostase dient. Bei der Bestimmung des deutlich regulierten Spot 14rr (6fach herunterreguliert), wenn auch nicht statistisch signifikant, gab es keinen Treffer im Rattengenom. Es wurde ein Protein aus dem Genom einer Makakenart identifiziert, welches starke Sequenzhomologien zu einem Aktivatorprotein der Rho-GTPase 25 Familie aufweist.

Ebenso deutlich herunterreguliert, jedoch nicht statistisch signifikant, war der Spot 15rr (15fach herunterreguliert), ein glycolytisches Protein.

Tab. 2: Proteine der Rattenhypophyse, unterschiedlich reguliert nach cerebraler und anämischer Hypoxie im Vergleich zur Normoxie

Spot Nr.	Accession Nr. in NCBI	Proteinname/ Funktion	Norm. Spotvol. gegen Kontrolle =1	P value Student t-Test	Position im 2D-Gel theor. PI/kDa	Expect. value	Mascot Score/ Threshold	MS seq. coverage (%)
1hr	gi 17105370	Vacuolar H ⁺ ATPase B2/ Membranprotein, Ionentransport	2,9	<0,05	5,9/58 (5,6/56,5)	7,7e-006	100/61	22
6 hr	gi 149060318	TBC1 domain family, member 23(predicted), isoform CRA_B/ Regulation der Rab GTPase Aktivität	3,5	0,146	5,9/54 (5,5/52)	0,044	62/61	11
7hr	gi 149022193	Similar to BC004363(pred.)isoform CRA_a, Methyltransferase like protein 6/ Methyltransferaseaktivität	1.8	<0.001	7,6/41,3 (8,4/45,6)	0,11	58/61	19
1rr	gi 57921067	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase/ Cytoplasmatisch, one-carbon Metabolismus, Oxidoreductase	-3,3	<0,001	4,7/23 (5,6/98)	0,3	54/61	5
3rr	gi 14192933	Aldh2, Aldehyde dehydrogenase 2/ mitochondriales Protein, Oxidation, Reduktion	-11,3	<0,05	6,3/54,5 (6,6/56,4)	8,9e-012	159/61	26
5rr	gi 149033753	Albumin isoform CRA_a/Transport	-2,4	n.s.	6,1/62 (6,72/51,5)	0,0014	77/61	17
8rr	gi 19424258	CDC25A/cell division cycle 25 homolog A, M-phase inducer phosphatase 1/ Zell-Zyklus Mitose, Zellteilung	-1,9	0,07	6,9/51 (6,7/59)	0,0061	71/61	16
11rr	gi 14905026	A2ld1, similar to cDNA seq. BC006662, isoform CRA_a/ uncharakterisiertes Protein	-9,7	<0,001	6,9/30 (6,4/19)	0,079	60/61	25

Tab. 2 (Forts.): Proteine der Rattenhypophyse, unterschiedlich reguliert nach cerebraler und anämischer Hypoxie im Vergleich zur Normoxie

13rr	gi 149023098	Erp 60, protein disulfide isomerase associated 3, isoform CRA_B, Pdia3/ ER – Protein, Zell-Redox Homöostase	-3,5	<0,05	6,1/62 (5,8/57)	7e-024	280/61	44
14rr	gi 679702824	Unnamed Protein; Rho GTPase activating protein 25(Macaca fasc.)	-6	n.s.	4,7/46 (5,75/38,2)	6,6e-005	100/71	24
15rr	gi 40254752	Pgk1, Phosphoglycerate kinase1/ glycolytisches Enzym	-15	0,08	8,9/39 (8.02/44)	4,4e-007	112/61	27

Neben der Regulation der Proteine aus den Hypophysenhomogenaten waren auch in den 2D-Gelen der Microdialysate Veränderungen im Verlauf der Versuche zu beobachten (Abb. 29). Es waren Hochregulationen unmittelbar nach Induktion der jeweiligen Hypoxie zu beobachten mit folgender Abnahme im Zeitverlauf der Experimente. Es waren ebenfalls Herunterregulationen zu beobachten, wie auch das völlige Verschwinden von Spots.

In den Equilibrationsgelen konnten $242,0 \pm 53,0$, in den Kontrollgelen $213,5 \pm 10,5$, in den Gelen P1 $155,5 \pm 0,5$, in den P2 Gelen $17,0 \pm 12,0$ und in den P3 Gelen $24 \pm 62,5$ Spots ($n = 2$) nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Probenmenge und der somit geringen Proteinmenge auf den Gelen war eine weitere Auswertung mittels MALDI-MS für die hier auffälligen Proteinspots nicht möglich. Eine weitere Zuordnung der Proteinspots war nur nach dem aus dem Gel zu bestimmenden pI und dem Molekulargewicht zu bewerkstelligen und muss somit als Trend gewertet werden.

Von allen detektierten Spots wurden 23 auf sowohl den Equilibrationsgelen als auch auf den Kontrollgelen und den Gelen P1 bis P3 detektiert. Allerdings zeigte sich bei nur 6 Spots ein gemeinsames Regulationsmuster mit einer deutlichen Hoch- bzw. Herunterregulation der normalisierten Spotvolumina in Bezug auf die auf 1 gesetzte Kontrolle (Abb. 30 und Tab. 3). Eine statistische Auswertung der Spots entfiel aufgrund des geringen Probenumfangs.

Auch hier wurden die mittels der Software errechneten normalisierten Spotvolumina zur Bestimmung der Unterschiede herangezogen und diese durch farbige Umrisse auf den Beispielgelen für den Versuchsverlauf dargestellt.

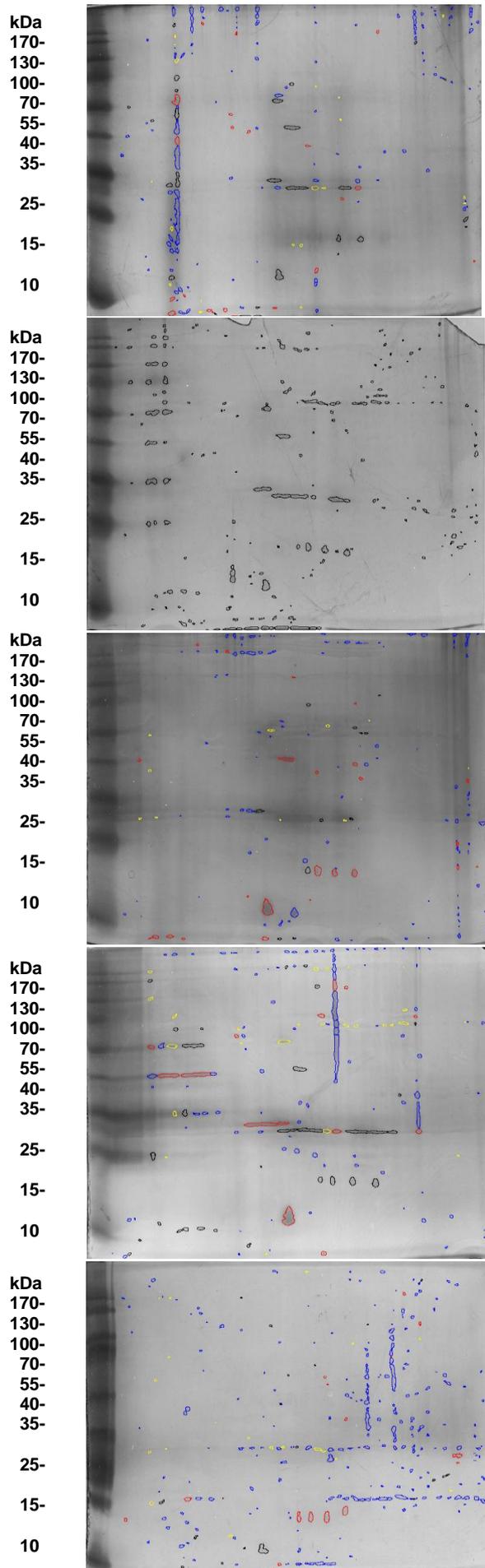


Abb. 29: Regulation verschiedener Proteinspots nach Hypoxie in der CSF von Ratten

Dargestellt ist die Veränderung im Proteinmuster in den Mikrodialysaten, die vor, während und nach Erhöhung des ICP oder Induktion einer Anämie gewonnen wurden.

Von oben nach unten sind aufgeführt: Equilibration, Kontrolle, Probe 1 (unmittelbar während und nach Hypoxie), Probe 2 und Probe 3. Rot dargestellt sind die mehr als 2fach heraufregulierten Proteinspots, gelb aufgeführt sind die 2fach herunterregulierten Spots, schwarz hervorgehoben sind die weniger als 2fach regulierten Proteine und blau dargestellt sind die nicht gemeinsam regulierten Spots jeweils gegen die auf 1 gesetzte Kontrolle.

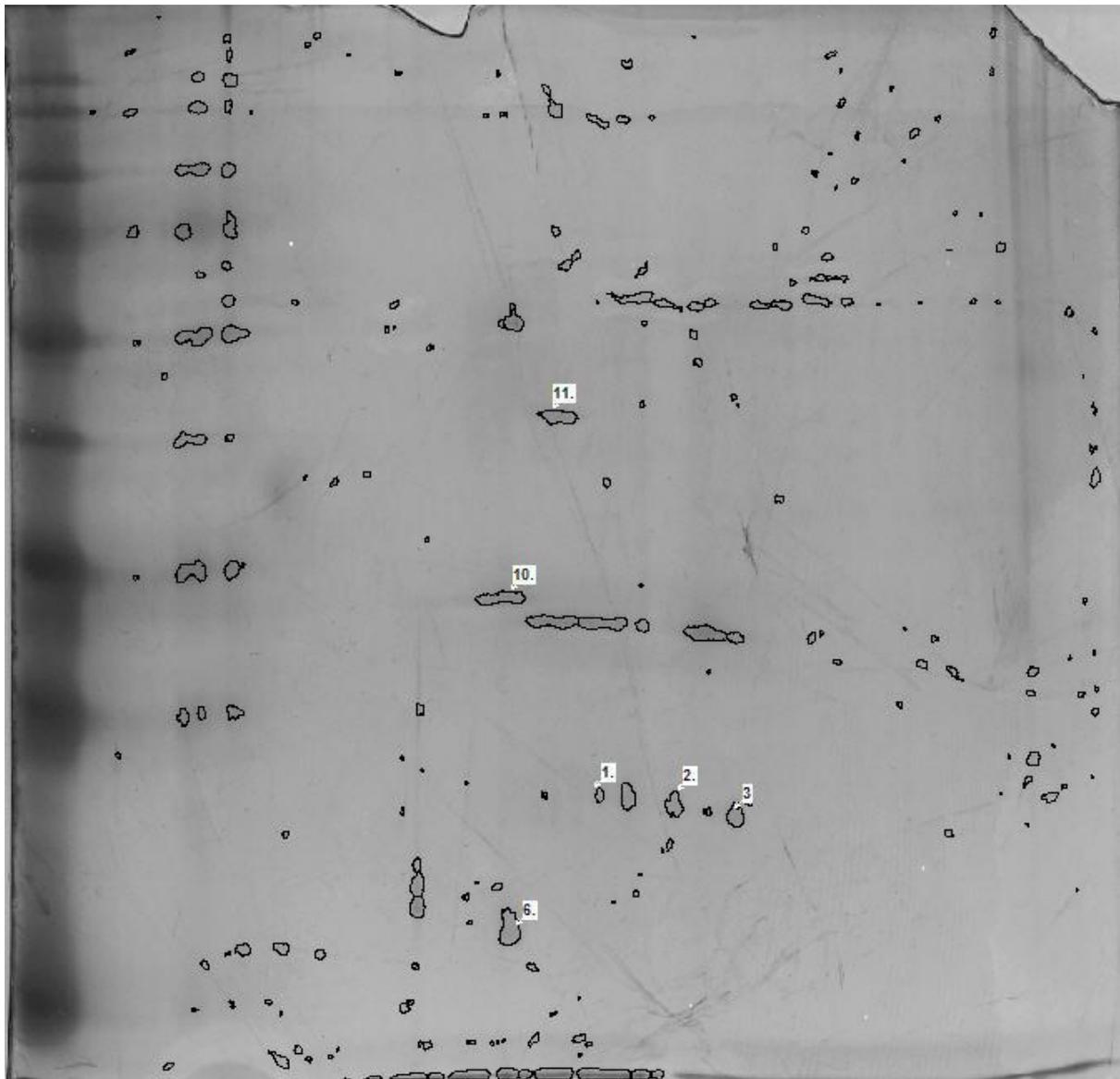


Abb. 30: Darstellung der durch Hypoxie regulierten Proteinspots aus Mikrodialysaten des CSF

Markiert erscheinen 6 Proteinspots, die sowohl in den Equilibrationsgelen, Kontrollgelen und den Gelen der Proben P1 bis P3 unter beiden hypoxischen Bedingungen ähnliche Regulationsmuster mit einer deutlichen Hoch- bzw. Herunterregulation zeigten.

Tab. 3: Regulation von Proteinen im CSF nach einer Hypoxie

Aufgeführt ist die Regulation der in den Mikrodialysaten mittels 2D-Gelelektrophorese nachgewiesenen Proteine sowohl unter cerebraler als auch anämischer Hypoxie. Die Werte sind angegeben für die jeweiligen Probennahmezeiträume: Equilibration (60min nach Implantation der Mikrodialysesonde bei beiden Versuchsansätzen und Implantation des Katheters zur Erhöhung des ICP bei den Versuchen mit cerebraler Hypoxie), Kontrolle (60 min), P1 (60 min, incl. der 10 min Erhöhung des ICP bei cerebraler Hypoxie und Blutentnahme und Volumensubstitution bei Induktion einer Anämie), P2 (60 min nach P1), P3 (60 min nach P2). Die Werte wurden mittels 2D-Software in Bezug auf die auf 1 gesetzte Kontrolle errechnet.

Spot Nr.	Regulation unter Hypoxie (n fach)				
	Equilibration	Kontrolle	P1	P2	P3
1	-98,5	1	90,29	98,61	7,46
2	-2,09	1	5,92	1,93	0,60
3	-0,5	1	4,46	2,41	2,48
6	-0,275	1	5,42	3,08	-0,34
10	-1,31	1	1,48	3,16	-34,36
11	1,69	1	10,74	4,2	-2,25

Bei der Suche nach Proteinen in der Datenbank UniProtK/SwissProt. ergaben sich für die 6 verschiedenen Spots unterschiedlich viele Treffer. Entscheidendes Kriterium für die Auswahl eines Proteins war neben dem passenden Molekulargewicht (10% Abweichung um ein gegebenes Molekulargewicht) und dem isoelektrischen Punkt die Information über Gewebespezifität und die subzelluläre Verteilung wichtig. Das Protein sollte im NS bzw. ZNS lokalisiert sein und sekretiert werden.

Tab. 4: Darstellung der Suchergebnisse aus TagIdent in der Datenbank UniprotK/SwissProt

Ergebnisse der Uni-ProtK/Swiss Prot. Suche (TaxID.10114)					
Spot Nr.	pI Bereich/ Mw-Bereich (Da)	Eingangsnr./ Eingangsname	Proteinname	pI / Mw(Da)	Bemerkungen
1	6,38-6,46/ 18000-22000	P09321/ PR3P1_RAT	Prolaktin-3B1	6,41/ 21713	sekretiert, gehört zur Somatotropin/Prolaktin Familie
2	6,7-6,9/ 17100-20900	Q5BJU5/ CNIh2_RAT	Protein cornichon homolog2	6,87/ 18932	Membranprotein
		Q62785/ HAP28_RAT	28kDa-heat-and acid stable phosphoprotein	6,8/ 20605	weit verbreitet, vor allem im Hirn
		Q9QWE9/ GGT5_RAT	Gamma-glutamyltransferase 5 (Prec.)	6,83/ 19562	
3	7,27-7,38/ 17100.20900	O35485/ VEGFB_RAT	Vascular endothelial growth factor B (Prec.)	7,36/ 19564	sekretiert
6	5,74-5,84/ 12600-15400	P0278/ TTHY_RAT	Transthyretin (Prec.)	5,76/ 13598	sekretiert,
10	5,75-5,79/ 29700-36300	P97887/ PSN1_RAT	Presenilin1	5,79/ 34184	ER-Protein, apoptoseassoziiert
		Q66H53/ CLO71_RAT	Uncharacterized protein C12 orf 71 homolog	5,79/ 34296	
		P26794/ PIM1_RAT	Proto-oncogene serine/threonine-Protein kinase PIM1	5,79/ 35631	Cytopl., Signal Transduktion in Blutzellen
		P52844/ ST1E1_RAT	Estrogen-sulfotransferase, isof. 1	5,78/ 35590	
11	6,07-6,17 46800-57200	P35053/ GPC1_RAT	Glypican-1	6,07/ 55890	sekretiert, trophischer Faktor im NS und bei Verletzung von Neuronen
		Q6IE64/ C1RL_RAT	Complement C1r subcomp-like protein	6,09/ 48655	Sekretiert, mediiert proteolyt. Abbau von Haptoglobin in das ER

Bei der Datenbankrecherche ergab sich für die Spots 1 und 3 jeweils nur ein Treffer, womit die Zuordnung dieser Proteine als durchaus sicher zu bezeichnen ist.

Für den Spot 2 ergaben sich 7 Treffer in der Datenbank, von denen nur drei annähernd in Betracht gezogen werden können, da sie nicht sekretiert werden und auch nur eines der gefundenen Proteine im Gehirn vorkommt.

Bei der Suche des Spots Nr. 6 ergaben sich 2 Treffer in der Datenbank, wobei nur eines der gefundenen Proteine im Hirn sekretiert wird, womit auch hier eine recht sichere Zuordnung vorliegt.

Die Recherche für den Spot 10 ergab insgesamt 12 Treffer von denen 4 erwähnenswert erschienen. Die Zuordnung zu diesem Spot ist damit als unzureichend einzustufen.

Dem Spot 11 wurden insgesamt 45 Treffer zugeordnet, wobei nur 2 dieser Proteine sekretiert und nur einer dazu als trophischer Faktor im Nervensystem in Erscheinung tritt (Tab. 4).

Insgesamt konnten mittels 2D-Gelelektrophorese und teilweiser nachfolgender MALDI-MS 11 Spots genau und 6 weitere per Datenbankrecherche den passenden Proteinen zugeordnet werden.

Unter diesen befanden sich einige, deren Regulation durch Hypoxie gut beschrieben ist. So wurde die VH^+ -ATPase durch Hypoxie heraufreguliert, die als Regulator der Ionenhomöostase beschrieben wird. Bei dem durch die Hypoxie abfallenden pH-Wert dient die Hochregulation der Protonenpumpe dem Schutz vor Apoptose über den MAPK-Weg (Wagner *et al.* 2004, Li *et al.* 2006, de Seigneux *et al.* 2007).

Ebenfalls heraufreguliert war eine Methyltransferase, deren hypoxischer Anstieg über Zytokine die Genexpression steigern soll (Hodge *et al.* 2001) und ein Regulator der Rab GTPase Aktivität. Dieses ER-Protein ist essentiell für den Vesikeltransport und die Exocytose und könnte im Zusammenhang mit der Sekretion von hormonähnlichen Stoffen und Hormonen stehen.

Herunterreguliert wurde neben einem Enzym des Folatmetabolismus auch die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase, was mit denen bei Hypoxie vermehrt entstehenden ROS erklärt werden kann (Hink *et al.* 2007, Alnouti & Klaassen 2008, Ohsawa *et al.* 2008, Chakravarti *et al.* 2009).

Eine Abnahme zur Kontrolle zeigte ebenfalls das Protein CDC25, dessen Expression bei Hypoxie über HIF-1 α inhibiert wird (Hammer *et al.* 2007). Desweiteren kommt es zu einer Herunterregulation bei einer Albuminisoform und einem bisher uncharakterisiertem Protein. Zudem wird das ER-Protein PDIA3 bzw. Erp60 vermindert exprimiert, welches im Gehirn und

der Schilddrüse zu finden ist und über den Glucosespiegel und auch Stress reguliert werden soll.

Ferner zeigt sich für die Phosphoglyceratkinase, ein glycolytisches Enzym, im 2D-Gel eine Abnahme der Expression.

Das letzte in der MALDI-MS identifizierte Protein ergab keinen Treffer im Rattengenom jedoch einen deutlichen Treffer bei einer Rho GAP im Makakengenom. Da zwischen den Rho GAPs der meisten Mammalia eine hohe Sequenzhomologie vorliegt (Tcherkezian & Lamarche-Vane 2007), wird das vorliegende Protein als eine Rho GAP betrachtet und wurde herunterreguliert gefunden.

Desweiteren wurde in den 2D-Gelen der hypoxischen Microdialysate 6 Spots mit gleicher Regulation gefunden, von denen 4 als sekretierte Proteine ermittelt werden konnten. Neben Prolaktin, Transthyretin und VEGF wird Glypican1 unmittelbar nach dem hypoxischem Reiz hochreguliert, um dann wieder herunterreguliert zu werden.

4. Diskussion

4.1 Physiologische Bedeutung der Erythropoietin-Synthese, Reaktion des Körpers auf verschiedene Hypoxieformen

Die Versorgung des menschlichen Körpers und seiner Zellen mit Sauerstoff dient primär der Gewinnung von Energie für die zahlreichen Leistungen, die selbst im Ruhezustand ablaufen. Bei Arbeit, Krankheit, also einem gesteigertem Sauerstoff-Bedarf oder Veränderungen der externen Bedingungen kann es zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff kommen, einer Hypoxie. Um diesen Zustand möglichst schnell auszugleichen, bedient sich der Körper einer Reihe von Mechanismen. Zunächst wird die Atmung den veränderten Bedingungen angepasst, um den Gasaustausch zu erhöhen. Um längerfristig auf die neue Situation angepasst zu sein, wird dann die Sauerstoffkapazität des Blutes erhöht; es werden vermehrt Transporteure bereit- gestellt. Bei der Bewerkstelligung dieser Aufgabe erfüllt das Glycoprotein-Hormon Erythropoietin eine wichtige Funktion. Nach einem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe des erwachsenen Organismus kommt es vor allem an der Niere zu einer gesteigerten Synthese des Hormons, welches dann auf humoralem Weg in das Knochenmark gelangt. Dort bindet es an die membranständigen Rezeptoren der erythrozytären Vorläuferzellen und verhindert so deren Apoptose und fördert ihre Proliferation (Adamson 1996, Jelkmann & Metzner 1996, Fisher 2003, Farrell & Lee 2004, Koury 2005). Diese Reaktion auf den Sauerstoffmangel im Gewebe erfolgt nicht nur an der Niere, sondern auch in einer Vielzahl anderer Gewebe, wie z.B. der Leber, dem Gehirn, der Lunge, dem Herzen und den Testes (Masuda *et al.* 1994, Semenza 1994, Dame *et al.* 1998, Gassmann *et al.* 2003). Die Produktion von Erythropoietin ist also weit im Körper verbreitet und gewebespezifisch angepasst an die jeweilige Grundversorgung mit Sauerstoff.

Der Leber kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu, da sie während der Embryonalphase bis unmittelbar nach der Geburt die Hauptquelle für endogenes Erythropoietin darstellt. Erst nach der Geburt kommt es zur Umstellung auf die Niere als fortan Hauptproduzenten des Hormons. Die Leber synthetisiert im weiteren Verlauf nur noch marginale Mengen an Erythropoietin und auch nicht in deutlicher Abhängigkeit zur Bedarfssituation (Dame & Juul 2000).

Generell akzeptiert ist die These, dass der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe im hauptsächlich produzierenden Organ wahrgenommen wird. Demnach stellt die Nierenrinde den Ort der Sensorik dar (Koury *et al.* 1988b, Bachmann *et al.* 1993).

In der Literatur findet man eine Zahl von Hinweisen auf alternative Wege der Induktion der renalen Erythropoietin-Synthese (Halvorsen 1961, 1966, 1968, Halvorsen *et al.* 1968) und auch in bereits durchgeführten Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnten Hinweise gesammelt werden (Pagel *et al.* 1988, 1989, 1991). So scheint der Hypophysen-Hypothalamusbereich von erheblicher Bedeutung für die Regulation der Erythropoietin-Produktion an der Niere zu sein.

In Versuchen mit Erhöhung des intrakraniellen Druckes von verschiedener Höhe und unterschiedlichen Zeitintervallen konnte gezeigt werden, dass hypoxische Bedingungen im Gehirn ausreichen, um eine gesteigerte Erythropoietin-Synthese an der Niere einzuleiten. Der Anstieg der Erythropoietin-Produktion war dabei umso deutlicher, wenn man den Druck über den mittleren arteriellen Druck an hob (von Wussow *et al.* 2005).

Die Versuche dieser Arbeit greifen auf das Modell der intrakraniellen Druckerhöhung (ICP) als Modell einer cerebralen Hypoxie bei gleichzeitiger systemischer Normoxie zurück.

Die bereits publizierten Daten konnten mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen bestätigt werden. Eine Erhöhung des ICP auf 100 mmHg für jeweils 10 min führte zu einem signifikanten Anstieg der Erythropoietin-Plasmaspiegel bei einem Gleichbleiben der systemischen Parameter. Es kam initial zu einem leichten Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes, was auf eine Sympathikusaktivierung zurückzuführen war. Dieser Anstieg normalisierte sich jedoch schon während des 10minütigen Reizes.

Wenn nun die Niere als Hauptort der Synthese und auch als Ort der Sensorik favorisiert wird, so sollten Veränderungen in der Sauerstoffversorgung, z.B. durch Veränderungen in der Durchblutung, besondere Auswirkungen haben. In der Niere liegt keine einheitliche Versorgung des Gewebes mit sauerstoffreichem Blut vor, vielmehr kommt es durch die direkte Nachbarschaft von arteriellen und venösen Gefäßen zu Gebieten (Baumgartl *et al.* 1972), die, trotz hoher Durchblutungsrate der Niere, inhomogen mit Sauerstoff versorgt sind (Schurek & Kriz 1985, Eckardt *et al.* 2005). Allerdings zeigten sich in den vorliegenden Versuchen keinerlei Veränderungen des renalen Blutflusses an der A. renalis nach Erhöhung des ICP, sodass dies als Stimulus für die gesteigerte Erythropoietin-Synthese ausgeschlossen werden kann. Zudem findet man in der Literatur widersprüchliche Befunde zum Einfluss der Nierendurchblutung auf die Erythropoietin-Produktion der Niere. In Versuchen mit Konstriktion der Nierenarterie bei Ratten zeigte sich tatsächlich eine

gesteigerte Erythropoietin-Produktion (Takaku *et al.* 1962), während in anderen Versuchsmodellen mit Hunden nach Reduktion des Blutflusses entweder nur leichte Erhöhungen der Synthese (Fisher & Samuels 1967) oder gar ein Abfall der Erythropoietin-Spiegel im Plasma zu beobachten waren (Murphy *et al.* 1971). Die Stimulation der renalen Erythropoietin-Synthese durch Reduktion der Nierendurchblutung gelang anderen Gruppen weder an der Ratte noch am Schaf (Zivny *et al.* 1972).

Bei Patienten mit Nierenarterienstenosen zeigte sich ebenfalls kein nennenswerter Anstieg in den Erythropoietin-Plasmawerten oder eine Polyzythämie (Luke *et al.* 1965, Tarazi *et al.* 1966, Hudgson *et al.* 1967, Bourgoignie *et al.* 1968, Taneichi *et al.* 1986, Holgado *et al.* 2001).

Daher kann die Beeinflussung der Erythropoietin-Synthese an der Niere durch Veränderungen der renalen Durchblutung für die vorliegende Arbeit außer Acht gelassen werden, zumal keine Änderungen in dem hier benutzten Modell zu beobachten waren.

Die cerebrale Hypoxie scheint in den durchgeführten Versuchen einen spezifischen Reiz für die renale Erythropoietin-Synthese darzustellen. Diese These wurde in weiteren Versuchen mit Erhöhung des ICP an hypophysektomierten Tieren untersucht (von Wussow *et al.* 2005). In den durchgeführten Experimenten war keine Induktion der Erythropoietin-Synthese nach Erhöhung des ICP zu verzeichnen, was die Bedeutung der Hypophyse für die renale Erythropoietin-Produktion unterstrich. Allerdings bedeutet die Entfernung der Hypophyse als zentrale Hormonregelinanz einen immensen Eingriff in den gesamten Status der physiologischen Körperfunktionen. Eine somit veränderte Reaktion auf den hypoxischen Reiz könnte Folge dieses Mangelzustandes sein (Flohr & Seufert 2007, Plant 2008). Bei Betrachtung der im Verlauf gesammelten Ergebnisse kristallisierte sich jedoch die Bedeutung der Hypophyse weiter heraus.

Eine cerebrale Hypoxie, wie sie hier als Modell benutzt wurde, stellt einen Sonderfall dar. Aufgrund der Stärke des ausgeübten Druckes kommt es zu einer Mangel durchblutung des Gehirns und damit verbunden zu einem deutlichen Abfall des Sauerstoffgehaltes im Hirngewebe. Daneben können Teile des Gehirns stark komprimiert werden, zu vergleichen mit den Folgen eines Hirntraumas oder eines Hydrozephalus. Daher sollte die Bedeutung der cerebralen Hypoxie im Vergleich zu einer systemischen Hypoxie betrachtet werden.

Eine Anämie, gleichgültig welchen Ursprungs, stellt eine Verschlechterung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes dar. Ursache können dabei eine mangelhafte Versorgung oder schlechte Resorption von Vitamin B12, Folsäure oder Eisen (Koury &

Ponka 2004, Moestrup 2006), akute und chronische Blutverluste (Clark 2008, Maganty & Smith 2008), chronische Erkrankungen mit und ohne genetischen Hintergrund sowie Infektionskrankheiten (Ghosh & Ghosh 2007, Tolentino & Friedman 2007, Steinberg 2008), Eryptosis (Foller *et al.* 2008), akutes oder chronisches Nierenversagen (Eckardt *et al.* 2005, Virani *et al.* 2008) und anderes sein.

Als Modell für eine systemische Hypoxie wurde die normozytäre normochrome Anämie gewählt, herbeigeführt durch eine arterielle Entnahme von 3 ml Blut und der darauf folgenden isovolämischen Volumensubstitution mit isotonischer Kochsalzlösung. Dadurch wurde eine Senkung des Hämatokrits von durchschnittlich 40 auf 30 % erreicht.

Nach Einleitung der Anämie konnte über den Versuchszeitraum eine vergleichbare Erhöhung der Erythropoietin-Plasmawerte gemessen werden wie nach Erzeugung einer cerebralen Hypoxie. Die Antwort der Genexpression auf die systemische Hypoxie fiel deutlich stärker aus als die auf den lokalen Reiz. Diese Antwort wurde jedoch in eine ähnlich große Menge an Protein unter beiden Bedingungen umgesetzt. Offenbar stellt die lokale Hypoxie im Gehirn einen spezifischen Reiz für die renale Synthese des Hormons dar. Es kann spekuliert werden, ob nicht unterschiedliche Sensormoleküle an dieser Antwort beteiligt sind. So könnte die Antwort auf den systemischen Reiz über HIF-2 α vermittelt sein und die durch den lokalen Reiz an der Niere ausgelöste Antwort über HIF-1 α , wobei HIF-1 α und HIF-2 α bei milder Hypoxie im gleichen Maße die Erythropoietin-Transkription an der Niere steigern sollen (Yeo *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu steht die Aussage, dass HIF2- α generell von größerer Bedeutung für die Erythropoietin-Produktion sein soll (Warnecke *et al.* 2004, Chavez *et al.* 2006), wobei die Befunde über die Verteilung auf verschiedene Gewebe und die Wertigkeit der durch Hypoxie induzierten Antwort der verschiedenen HIF-Spezies generell noch diskutiert werden (Wiesener *et al.* 2003, Bracken *et al.* 2006, Bruegge *et al.* 2007).

4.2 Bedeutung der Erythropoietin-Synthese im Gehirn

Neben der Niere als Hauptproduzenten des Hormons fällt neben den bereits erwähnten Organen wie Leber, Lunge, Herz usw. vor allem das Gehirn auf. Das im Gehirn und hier vor allem von Astrozyten und Neuronen produzierte Erythropoietin (Masuda *et al.* 1994, Marti *et al.* 1996, Bernaudin *et al.* 2000, Siren *et al.* 2001b, Weidemann *et al.* 2009) dient nicht der Stimulation der Erythropoese, sondern vielmehr der Entwicklung und auch der Protektion von neuronalem Gewebe und dem Schutz vor apoptotischen Vorgängen (Marti *et al.* 2000, Chen *et al.* 2007, Rabie & Marti 2008). Beschrieben findet man in der Literatur neben der gesteigerten Erythropoietin-Synthese von endogenen hirnspezifischem Hormon nach Traumata oder Ischämien (Marti *et al.* 2000) auch den Einsatz von gentechnisch hergestelltem Erythropoietin bei der Therapie von neuronalen Schäden und Stoffwechselerkrankungen (Ehrenreich *et al.* 2004 a/b). Zur Präkonditionierung von Neuronen vor potentiell schädigenden Situationen, wie z.B. Hypoxien und Reoxigenierungen während und nach Operationen, Belastung mit Chemikalien und Toxinen und vieles mehr (Bernaudin *et al.* 2002a/b, Dhodda *et al.* 2004, Ran *et al.* 2005, Meloni *et al.* 2006, Noguchi *et al.* 2007) wird ebenfalls rekombinantes Erythropoietin eingesetzt. Im Kontext der vorliegenden Fragestellung sollte geprüft werden, inwieweit das Gehirn und hier verschiedene Hirnareale auf die Sauerstoffmangelsituation mit endogener Erythropoietin-Produktion reagieren.

Untersucht wurde die Erythropoietin-Genexpression im cerebralen Cortex, im Cerebellum, im Stammhirn, im Hypothalamus sowie in der Hypophyse, die aufgrund der formulierten Arbeitshypothese von besonderem Interesse war.

In den untersuchten Arealen kam es nach Erzeugung einer Hypoxie, gleichgültig ob nun lokal oder systemisch, zu einer Induktion der Erythropoietin-Genexpression. Die Höhe schwankte zwischen einer 2-bis 5fachen Induktion nach dem jeweiligen Reiz und im Verlauf des Versuches und deckt sich mit Daten aus der Literatur (Marti 2004).

Die Erythropoietin-Genexpression in der Hypophyse setzte sich deutlich von den vorherigen Beobachtungen ab. Nach Erhöhung des ICP kam es zu einer Steigerung der Expression um ein Vielfaches der in den anderen Hirnarealen beobachteten Veränderungen. Im Kontrast dazu stehen die Messungen der Genexpression nach Erzeugung einer Anämie, hier kam es zu einer kompletten Herunterregulation.

Eine Erklärung für die extreme Hochregulation der Erythropoietin-Genexpression in der Hypophyse nach Erhöhung des ICP könnte das bereits beschriebene neuroprotektive Potential des Hormons sein. Das Infundieren von semi-synthetischer Cerebrospinalflüssigkeit in die Cisterna magna und die damit einhergehende cerebrale Druckerhöhung gleicht zumindest symptomatisch dem Krankheitsbild des Hydrozephalus und bedeutet neben der sich einstellenden Ischämie auch Traumata in den besonders exponierten Hirnarealen. Zum Schutz vor Apoptose und Nekrose und der Aufrechterhaltung von neuronalen Strukturen könnte die Genexpression daher heraufreguliert worden sein (Marti *et al.* 1997, Koehne *et al.* 2002, Rogatsky *et al.* 2003, Agren-Wilsson *et al.* 2005).

Ganz im Gegensatz dazu steht die in der Hypophyse nach Einleitung einer Anämie beobachtete Herunterregulation der Erythropoietin-Genexpression. Vergleicht man die Expression mit den in den anderen Bereichen nach Anämie ermittelten Werten, so nimmt die Hypophyse eine Sonderstellung ein.

Wenn man die allgemeine Aufgabe der Hypophyse als zentrale Regelinstanz der Hormonkreisläufe betrachtet, so liegt folgende Interpretation nahe. Während einer Hypoxie nimmt die Hypophyse endokrine Funktionen wahr, die der Wiedererlangung der Sauerstoffhomöostase dienen. Kommt nun ein für das Hypophysengewebe schädigender Aspekt hinzu, so wird die endokrine Funktion um parakrine Mechanismen erweitert (Ruscher *et al.* 2002, Chavez *et al.* 2006).

Insgesamt betrachtet liefern die hier durchgeführten Messungen der Erythropoietin-Genexpression in verschiedenen Hirnarealen und insbesondere in der Hypophyse interessante Hinweise auf die mögliche Funktion dieses Bereiches bei der zentralen Regelung der renalen Erythropoietin-Synthese. So zeigen Befunde aus der Literatur, dass unter hypoxischen Bedingungen eine Reihe von Hormonen heraufreguliert werden, und dass die gesamte HPA-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse) von den Veränderungen während unterschiedlicher Hypoxieformen beeinflusst wird (Nelson & Cons 1975, Fassbender *et al.* 1994, Richalet *et al.* 1994, Strijbos *et al.* 1994, Ramirez *et al.* 1995, Johansson *et al.* 1997, Savourey *et al.* 1998, Dimai *et al.* 2000, Zhang & Du 2000, Chen *et al.* 2004, Xu *et al.* 2006, Benso *et al.* 2007, Ayus *et al.* 2008, Farias *et al.* 2008).

4.3 Hypoxischer Einfluss auf die Erythropoietin-Genexpression und Proteinsynthese in der adulten Leber

Die Leber stellt nur im fötalen Organismus die Hauptquelle für die Erythropoietin-Synthese dar und leistet im Adulten nur einen kleinen Beitrag von max. 10% an der gesamten Reaktion auf einen Abfall des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe (Zanjani *et al.* 1977, Clemons *et al.* 1986, Tan *et al.* 1992, Jelkmann & Metzgen 1996, Moritz *et al.* 1997, Dame *et al.* 1998, Fisher 2003, Dame *et al.* 2004, Stockmann & Fandrey 2006, Weidemann & Johnson 2009). Dennoch sollte die Erythropoietin-Genexpression in Lebern nach Erhöhung des ICP und nach Einleitung einer Anämie betrachtet werden, um die Gewichtung des potentiellen Signales aus dem Gehirn zu beurteilen.

Die Messungen mittels quantitativer real time PCR ergaben eine signifikante Erhöhung der Erythropoietin-Genexpression nach Anämie im Vergleich zur Kontrolle und nach Erhöhung des ICP. Die lokale cerebrale Hypoxie hat demnach keinen nennenswerten Einfluss auf die Genexpression in der Leber, während eine systemische von Bedeutung zu sein scheint.

Generell würde man eine unterschiedliche Antwort von Niere und Leber auf einen hypoxischen Reiz erwarten, da einerseits unterschiedliche HREs (Hypoxie-Responsives-Element) vorliegen (Kochling *et al.* 1998) und andererseits ein Leber-spezifisches negatives Regulationselement (NRLE) vorhanden ist (Madan *et al.* 1995, Weidemann & Johnson 2009). Die Erythropoietin-Genexpression der anämisch stimulierten Leber erreichte jedoch Werte die vergleichbar mit denen der Expression in den Nieren waren, die mit erhöhtem ICP stimuliert wurden. An die Genantwort der systemisch stimulierten Nieren reichen allerdings keine der Leberantworten heran. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass der hypoxische Reiz der Anämie und des Hirnhochdruckes über verschiedene Sensormoleküle vermittelt werden. Möglicherweise kommt es nach Anämie zu einer Induktion von HIF-2 α und nach Hirnhochdruck zu einer Induktion von HIF-1 α , welche dann unterschiedlich die Erythropoietin-Genexpression in der Leber aktivieren. Bekannt ist, dass HIF-2 α zwar in allen Organen der Ratte durch Hypoxie zu aktivieren ist, dass es aber in der Leber in den parenchymalen und in der Niere nur in den nicht-parenchymalen Zellen exprimiert wird (Wiesener *et al.* 2003). Weiterhin scheint es zell- und gewebsspezifische Antworten von HIF-1 α und HIF-2 α bezüglich der Sauerstoffempfindlichkeit zu geben (Bracken *et al.* 2006).

Im Umkehrschluss könnte man daraus folgern, dass die lokale cerebrale Hypoxie einen spezifischen Reiz für die renale Erythropoietin-Synthese in diesem Modell darstellt und hauptsächlich über die Aktivierung von HIF1- α vermittelt wird.

Auf Proteinebene konnte mittels Western Blot weder nach lokaler noch nach systemischer Hypoxie in den Leberhomogenaten Erythropoietin nachgewiesen werden. Mögliche Gründe dafür sind die geringe Menge an synthetisiertem Protein, sodass die Nachweisgrenze unterschritten blieb. Oder der eingesetzte Antikörper hat nicht effizient an das in den Leberhomogenaten enthaltene Hormon gebunden. Vom Hersteller wird zwar die Möglichkeit des Einsatzes in Gewebshomogenaten geliefert (vergl. Dame *et al.* 2006), dennoch scheint ein deutlicher Nachweis nur an rekombinanten humanem Erythropoietin (wie im Blot als Positivkontrolle verwandt) und/oder in der Zellkultur überexprimiertem Erythropoietin oder in der Zellkultur an Hepatomzelllinien (Cutroneo *et al.* 2007) möglich zu sein.

4.4 Stimulation der Erythropoietin-Genexpression in der Zellkultur durch Mikrodialysate aus dem hypoxischen Hypothalamus-Hypophysenbereich

Der Arbeitshypothese nach sollen während des hypoxischen Reizes, gleichgültig ob nun ein systemischer oder ein lokaler Reiz, funktionelle Veränderungen im Hypothalamus-Hypophysenbereich stattfinden. Diese Veränderungen sollten sich auch in den in diesem Bereich sekretierten Stoffen zeigen, und daher war es von Interesse in diesem Bereich, direkt während des Reizes und unmittelbar davor und danach Einblick zu erhalten.

Eine mögliche Methode dafür stellt die Mikrodialyse dar (Anzawa *et al.* 2001, Harris & Levine 2003, Watson *et al.* 2006, McAdoo & Wu 2008). Mit dieser Methode war es möglich, interstitielle Flüssigkeit aus dem Hypothalamus-Hypophysenbereich in einstündigen Intervallen während der gesamten Versuchsdauer zu erhalten. Die so gewonnenen Mikrodialysate wurden auf ihr Potential als Stimulus für die Erythropoietin-Expression in einem geeigneten Zellkulturmodell untersucht.

Im Folgenden wurden HepG2-Zellen, die nachweislich auf eine Hypoxie mit gesteigerter Erythropoietin-Genexpression und Synthese reagieren (Semenza 1994), und auch COS7-Zellen, eine Nierenfibroblasten-Zelllinie, zur Untersuchung herangezogen.

In den HepG2-Zellen zeigte sich nach Inkubation mit den Dialysaten unter normoxischen Verhältnissen keine Induktion der Erythropoietin-Genexpression, gleichgültig unter welchen Versuchsbedingungen diese Mikrodialysate gewonnen wurden. Die hypoxische Inkubation mit den Hirnhochdruckdialysaten führte zu einer leichten und die Inkubation mit unter

anämischen Bedingungen gewonnenen Dialysaten zu signifikanter Steigerung der Erythropoietin-Genexpression in den Kontroll- und P1-Proben (direkt nach dem Reiz).

Bei der Messung der Proteinmengen im Zellkulturüberstand zeigte sich bei beiden Versuchsbedingungen eine deutliche Herunterregulation der basalen Erythropoietin-Produktion nach Zugabe des Equilibrationsdialysates unter normoxischen Inkubationsbedingungen.

Diese Supprimierung war dann unter beiden Bedingungen bis zur Probe 3 unter normoxischer Inkubation zu beobachten, bei der es zu einem leichten Anstieg kam. Ähnliches galt für die hypoxische Inkubation. Hier war eine normale hypoxische Induktion der Erythropoietin-Genexpression in der Mediumleerkontrolle zu beobachten, die wiederum durch die Zugabe der Equilibrations-Mikrodialysate herunterreguliert wurde. Die Erythropoietin-Werte im Überstand stiegen zum Ende der Versuche (Probe P3) zwar wieder an, blieben aber unter den Leerkontrollwerten.

Generell konnte man auch hier den Trend beobachten, dass der lokale hypoxische Reiz zu einer geringeren mRNA-Aktivierung führte als nach einem systemischen Reiz, die umgesetzten Proteinmengen sich jedoch die Waage hielten.

Zudem war unter beiden Ansätzen eine deutliche Inhibierung der basalen Erythropoietin-Produktion nach Zugabe der Dialysate zu beobachten. Es ist daher anzunehmen, dass sich in der interstitiellen Flüssigkeit Faktoren befinden, die einen hemmenden Einfluss auf die Erythropoietin-Produktion in diesem Modell haben.

Unter hypoxischen Bedingungen werden im Hypothalamus-Hypophysenbereich eine Reihe von Hormonen und anderer Signalstoffe vermehrt produziert und sekretiert (Chen *et al.* 2004, Feng *et al.* 2006, Farias *et al.* 2008).

Einige dieser Stoffe werden auch in der Leber synthetisiert und ebenfalls durch eine Hypoxie induziert, wie z.B. Prolaktin oder auch VEGF (Ganguly *et al.* 1997, Sandner *et al.* 1997, Struder *et al.* 1999, Bernaudin *et al.* 2002a, Xu *et al.* 2006), sodass die Zugabe dieser Faktoren einen hemmenden Effekt auf bestimmte Signalwege und damit auf die Erythropoietin-Antwort haben könnten, insbesondere nach hypoxischer Inkubation.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse muss auch der Einsatz von fetalem Kälberserum (FKS) berücksichtigt werden. Die im FKS geschätzt befindlichen eintausend Inhaltstoffe, unter anderem Wachstumsfaktoren und Hormone, die eine bessere Proliferation und Zellteilung gewährleisten sollen, beeinflussen mit großer Wahrscheinlichkeit die Expression bestimmter Gene unter normoxischen und vor allem unter hypoxischen Bedingungen (Boxberger 2006).

Die Kultivierung in FKS-freien Medien hätte dies vermeiden können. Allerdings wird nach Einsatz solcher Medien häufig von verlangsamtem Wachstum und - im vorliegenden Fall noch schwerwiegender - von Zellaggregatbildung berichtet (Jayme & Blackman 1985, Paranjape 2004, Lutz *et al.* 2007). Da die hier genutzten Hepatomzellen bereits unter normalen Kulturbedingungen die Tendenz zur Aggregatbildung zeigen, erschien der Einsatz von FKS-freien Medien nicht sinnvoll.

Das Potential der Mikrodialysate wurde nicht nur an humanen Hepatomzellen sondern auch an einer Nierenfibroblastenzelllinie getestet.

Auf Ebene der Genexpression zeigte sich auch hier eine eher geringe Induktion unter Normoxie und eine leichte Induktion unter hypoxischen Bedingungen. Ähnlich der Expression in den HepG2-Zellen war auch hier eine stärkere Genexpression nach Einsatz der unter Anämie gewonnenen Dialysate zu verzeichnen, wobei durch die hypoxische Inkubation eine signifikante Steigerung der Erythropoietin-Genexpression nach Einsatz der Probe des Intervalls P2 (60-120min nach Erhöhung des ICP oder Erzeugung einer Anämie) zu beobachten war.

Insgesamt kann man von einem hemmenden Effekt der Mikrodialysate auf die Erythropoietin-Genexpression und der Synthese des Proteins in HepG2-Zellen sprechen, während es in der Nierenzelllinie zu einer leichten Induktion kam. Der geringe Stimulus könnte hierbei auch an der starken Verdünnung der Faktoren aus den Dialysaten im Medium liegen.

Der lokale cerebrale Reiz wurde auch hier stärker umgesetzt als der systemische, wobei die Reaktion der Nierenzelllinie eindeutiger als die der Hepatomzelllinie erscheint.

Letztlich stellt sich die Frage, ob die *in vitro* gewonnenen Daten vorbehaltlos betrachtet werden können. In der Zellkultur durchgeführte Versuche spiegeln einen Teilbereich der physiologischen Funktionen der kultivierten Zellen wieder, da niemals ein kompletter funktionsfähiger Organismus nachgebildet werden kann, was insbesondere bei der Betrachtung von endokrinen Vorgängen und deren straff regulierten Rückkopplungsschleifen fraglich erscheint. Zudem durchlaufen alle Zellen, gleichgültig ob nun in Primärkultur oder aber etablierte Zelllinien nach längerer Passagierung Veränderungen ihrer Funktionsfähigkeit und genetischen Stabilität (Wolffe & Tata 1984, Parchment & Natarajan 1992, Rubin 1997, Rubin 2009).

4.5 Veränderung des Hypophysenproteoms nach lokaler cerebraler Hypoxie und Anämie

Das Proteom stellt im Gegensatz zum Genom kein statisches Gebilde dar. Vielmehr gibt es Aufschluss über aktuelle Geschehnisse im Körper, einem Gewebe, Zellverband oder nur einer einzelnen Zelle bzw. deren Komponenten. Antworten auf endogene und exogene Reize lassen sich unmittelbar am veränderten Proteom ablesen.

Im vorliegenden Fall sollte die Darstellung des Hypophysenproteoms und der Proteine aus den Mikrodialysaten mittels 2D-Gelelektrophorese Einsicht auf die Veränderungen nach einem lokalen cerebralen und einem systemischen hypoxischen Reiz gewähren. Zudem sollten mögliche Hinweise auf eine extrarenale Beeinflussung der renalen Erythropoietin-Synthese gefunden werden.

Nach Auswertung und Abgleich aller Spots in den Gelen der hypoxischen Hypophysen konnten 22 gemeinsam regulierte Spots lokalisiert werden. Von diesen 22 Spots waren dann noch 11 in der MALDI-MS auszuwerten und einem Protein zuzuordnen.

Von den 11 Spots waren 3 sowohl nach Erhöhung des ICP als auch in Folge einer Anämie hochreguliert. Signifikant hochreguliert wurde die vacuolar H^+ ATPase B2, eine Protonenpumpe, die ubiquitär exprimiert wird und der Ionenhomöostase dient. Insbesondere in der Niere und im Gehirn wird sie als durch Hypoxie reguliertes Protein beschrieben. Bei einem Abfall des pH-Wertes im Zuge der Hypoxie wird die Pumpe über den MAPK-Weg hochreguliert, um Zellschäden und Apoptose zu verhindern (Wagner *et al.* 2004, Li *et al.* 2006, de Seigneux *et al.* 2007). Als Reaktion auf die experimentell erzeugten hypoxischen Zustände erscheint die Hochregulation nachvollziehbar.

Ebenfalls signifikant heraufreguliert wurde das Methyltransferase like protein 6. Bei Hypoxie wird die Aktivität dieser Transferase über Zytokine (z.B. Interleukin 6) gesteigert und durch diese die Expression verschiedenster Gene konsekutiv gesteigert (Ramchandani *et al.* 1998, Prokhorchuk & Ruzov 2000, Hodge *et al.* 2001, Buryanov & Shevchuk 2005).

Zu den 3 heraufregulierten Proteinen gehört auch ein Regulatorprotein der Rab GTPase Aktivität. Rab GTPasen sind essentielle Proteine des Endoplasmatischen Retikulums für die Vesikelbildung, Transport und Exocytose von Proteinen in eukaryotischen Zellen (Segev 2001, Stenmark & Olkkonen 2001, Gurkan *et al.* 2007). Im Gehirn sind sie vor allem an der Entwicklung von Neuronen und Glia sowie deren Schutz und Wiederaufbau nach Verletzungen beteiligt (Ng & Tang 2008). Sie sind ebenso an der Exocytose von Hormonen

aus neuroendokrinen Zellen involviert (Tsuboi 2009), womit ihr Anstieg im vorliegenden Modell gut erklärbar ist. Hypoxische Zustände führen zu vermehrter Ausschüttung z.B. von Prolaktin (Xu *et al.* 2006), was auch in den hier durchgeführten Versuchen zu beobachten war. Die Exocytose dies und anderer Proteine wird durch die Rab GTPasen ermöglicht.

Neben der Hochregulation von Proteinen war auch die Herunterregulation einer Reihe von Proteinen zu beobachten.

Signifikant herunterreguliert im Vergleich zur normoxischen Kontrolle war die 10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase, ein Enzym des Folatmetabolismus, welches der Bereitstellung des Folates aus dem mit der Nahrung aufgenommenen Formyltetrahydrofolates dient (Smulders & Stehouwer 2005, Righetti 2008, Krupenko 2009). Folat wird während der neuronalen Entwicklung und zur Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion benötigt (Sofer *et al.* 2007). Auch für eine erfolgreiche Erythropoese ist Folat neben Cobalamin unerlässlich (Koury & Ponka 2004, Moestrup 2006). Im vorliegenden Modell einer cerebralen und auch einer systemischen Hypoxie kam es zur Herunterregulation des Enzymes. Solche Befunde findet man auch in der Literatur, wo milde Hypoxien zur Erhöhung des Homocysteinspiegels durch Senkung der Aktivität der Enzyme des Folatmetabolismus führten (Blaise *et al.* 2005), gleiches gilt für intermittierende Hypoxien beim obstruktiven Schlafapnoe-hypnoe-Syndrom (OSAHS) (Ozkan *et al.* 2008). Ein gestörter Folatzyklus und damit verbunden dauerhafte Anstiege der Homocysteinspiegel werden im Zusammenhang mit kardiovaskulären und neurodegenerative Erkrankungen gesehen (Smulders & Stehouwer 2005, Miller 2008, Redeen *et al.* 2009).

Ebenfalls signifikant herunterreguliert wurde die Aldehyddehydrogenase 2 (Aldh2). Das mitochondriale Protein gehört zur Gruppe der Aldehyddehydrogenasen, welche die Oxidation eines weiten Spektrums von endogenen und exogenen Aldehyden katalysieren. Endogene Aldehyde entstehen unter anderen während des Metabolismus einer Reihe von Alkoholen, Säuren, biogenen Aminen, Vitaminen, Steroiden und Lipiden. Aldehyddehydrogenasen werden daher als Entgiftungsenzyme bezeichnet (Alnouti & Klaassen 2008). Die Aldehyddehydrogenase 2 spielt eine besondere Rolle bei der Entsorgung von Acetaldehyd während des Ethanolmetabolismus (Thomasson *et al.* 1991), zudem wird ihr eine neuroprotektive Funktion durch die Oxidation neurotoxischer Aldehyde im Gehirn zugesprochen (Ohsawa *et al.* 2008). Es ist beschrieben, dass die Aldh2 bei oxydativem Stress, insbesondere durch eine Erhöhung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) herunterreguliert wird (Daiber *et al.* 2004, Sydow *et al.* 2004, Hink *et al.* 2007). Im Gehirn,

insbesondere von Neuronen, werden besonders viele ROS generiert. Dies liegt einmal am hohen Sauerstoffverbrauch des Gehirns im Verhältnis zu seiner Masse und daran, dass ein großer Teil des Verbrauches durch die Reduktion von O_2 zu O_2^- zustande kommt. Die so entstandenen Radikale werden durch eine der drei hirnspezifischen Superoxiddismutasen (SOD) zu H_2O_2 und O_2 umgewandelt. Das Sauerstoffsuperoxid seinerseits wird enzymatisch über Katalasen oder aber Glutathionperoxidasen abgebaut, deren Aktivität im Gehirn sehr gering ist. Zudem ist das Gehirn reich an ungesättigten Fettsäuren, die mit ROS zu weiteren Peroxid-Radikalen reagieren, die wiederum mit den umgebenden Lipiden eine Art Kettenreaktion auslösen (Sharpe *et al.* 2003). Einige Bereiche des Hirns sind besonders reich an Eisen, was die Gefahr von Fenton-Haber-Weiss-Reaktionen birgt, die in der Entstehung von OH-Radikalen resultiert (Wardman & Candeias 1996, Wiseman & Halliwell 1996, Kehrer 2000). Diese zählen zu den ROS mit dem größten biologisch schädigenden Potential.

Die Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe führt zur vermehrten Bildung von ROS (Blokhina *et al.* 2003, Cash *et al.* 2007, Kulkarni *et al.* 2007), die ihrerseits zur Aktivierung von HIFs führen (Klimova & Chandel 2008).

Die im vorliegenden Modell beobachtete Herunterregulation der Aldh2 nach systemischer und lokaler Hypoxie kann daher auf die Zunahme von ROS im Gehirn im Allgemeinen und insbesondere in der Hypophyse zurückzuführen sein.

Nach Erhöhung des ICP und auch als Antwort auf eine Anämie konnte in den 2D-Gelen eine Herunterregulation der Albuminisoform CRA_a festgestellt werden.

Albumin dient neben der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes auch als Transportprotein im Blut für eine Vielzahl hydrophober Stoffe wie Fettsäuren, Bilirubin, Spurenelemente, bestimmte Vitamine, Hormone, Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) und Arzneistoffe.

Unter bestimmten pathologischen Bedingungen wie z.B. Lebererkrankungen oder ernstzunehmender Proteinmangelernährung kann es zu einer verminderten Bildung dieses Proteins kommen. Aber auch während entzündlicher Prozesse und Verletzungen wird nach Freisetzung verschiedener Zytokine aus der Leber weniger Albumin im Serum gemessen.

In der Kultur kann an HepG2-Zellen nach hypoxischem Reiz ebenso eine Abnahme der Albuminwerte im Medium nachgewiesen werden (Wenger *et al.* 1995). Die hier nachgewiesene Abnahme einer Albuminisoform könnte somit primär durch die erzeugte Hypoxie ausgelöst worden sein, oder aber dass experimentelle Prozedere hat eine Akut-Phase-Reaktion im Tier ausgelöst.

Durch den lokalen und systemischen hypoxischen Reiz wurde das Protein CDC25A im Proteom der Hypophyse im Vergleich zur normoxischen Kontrolle herunterreguliert. CDC25A ist eine dual-spezifische Phosphatase und Schlüsselregulator der normalen Zellteilung und der Zellantwort auf DNA-Schäden (Kang *et al.* 2007). Im Speziellen bewerkstelligt die CDC25A die Initiierung der Mitose und sorgt somit für genomische Integrität. Zudem ist in der Literatur auch die Bedeutung der Phosphatase für einen funktionalen Zellzyklus und eine normale Erythropoiese beschrieben (Melkun *et al.* 2002).

Die hier beobachtete Abnahme des Enzyms nach hypoxischem Reiz deckt sich mit Befunden, in denen es nach Hypoxie zu einer Reduktion bei einigen Zellzyklus-Genen kam. Die Hypoxie führte über die Induktion des HIF-1 α -Myc-Weges zur Herunterregulation des Enzyms CDC25A, doch alleinige HIF1- α Aktivierung reichte nicht für eine Suppression aus (Hammer *et al.* 2007).

Betrachtet man die Situation im vorliegenden Modell so erscheint ein Zellzyklusarrest sinnvoll im Anbetracht der schwindenden Energieressourcen.

Als ein weiteres signifikant herunterreguliertes Protein konnte die PDI A3 (syn. Erp57) identifiziert werden. Die PDI A3 ist eine Thiol-Protein-Disulfid-Oxidoreduktase des ER-Lumens, der eine Reihe von Funktionen zugesprochen werden. Hauptaufgabe scheint die Formation von Disulfidbrücken während der Proteinfaltung insbesondere von Glycoproteinen zu sein (Khanal & Nemere 2007). Beschrieben ist auch die Regulation dieses ER-Proteins nach Gabe von Östrogenen. 48 h nach Injektion war in der 2D- Gelelektrophorese eine Zunahme des Proteins zu verzeichnen (Blake *et al.* 2005).

Die Regulation durch Hypoxie ist nicht explizit beschrieben, jedoch finden sich Berichte über die Regulation durch oxidativen Stress und im Speziellen durch ROS. Vermehrte Anhäufung von ROS führt zu verstärkter Oxidation von ER-Proteinen und initiiert ihre Degradation durch das Proteasom (van der Vlies *et al.* 2002). Für die PDIA3 wird im Einzelnen beschrieben, dass leichter oxidativer Stress zu vermehrter Degradation und ebenso zu einem erhöhtem Turnover des Enzyms führt (Grune *et al.* 2002).

Die deutliche Herunterregulation im vorliegenden Modell wurde drei Stunden nach dem hypoxischen Reiz und darauf folgender Reoxigenierung gemessen. Dies deckt sich mit den Zeiten für den in der Literatur beschriebenen verstärkten Abbau durch das Proteasom und die beginnende Neusynthese.

Der nächste herunterregulierte Proteinspot ergab in der MALDI-MS keinen signifikanten Treffer im Rattengenom, dafür einen deutliche Treffer im Genom einer Makakenart. Aufgrund

der Sequenzhomologien der Rho GAPs zwischen den Mammaliern wird das vorliegende Protein als solches betrachtet.

Es wurden bis heute 70 Rho-GAPs in Eukaryoten, von der Hefe bis zum Menschen gefunden. Rho GAPs sind Aktivatorproteine der GTPasen in dem streng regulierten GDP-GTP Zyklus. Die schwache intrinsische GTPase-Aktivität wird durch die Rho-GAPs erhöht und führt so zu deren Inaktivierung. Somit liegt mehr GDP gebundene Rho-GTPase im inaktiven Stadium. Ihre Aktivität soll durch eine Bandbreite von Mechanismen reguliert werden, so z.B. Lipidbindung, Protein-Protein-Interaktion sowie direkte Phosphorylierung und proteolytische Degradation durch Wachstumsfaktoren (Bernards & Settleman 2005, Tcherkezian & Lamarche-Vane 2007).

Eine Herunterregulation der Rho-GAP wie die hier vorliegenden Ergebnisse sie zeigen, bedeutet dann im Umkehrschluss dass die GTPase-Aktivität auf der GTP-gebundenen Seite im aktiven Stadium verbleibt. Eine gesteigerte Rho-GTPase-Aktivität ist beispielsweise bei der Entwicklung von Neuronen, generell bei der Gentranskription und apoptotischen Vorgängen dokumentiert (Govek *et al.* 2005, Tcherkezian & Lamarche-Vane 2007).

Bei dem nächsten deutlich herunterregulierten Protein handelt es sich um die Phosphoglyceratkinase 1. Die P_{gk}1 gehört zu den glycolytischen Enzymen und dient der Bereitstellung von Energie aus der Glykolyse. Während einer Hypoxie und auch der folgenden Reoxygenierung kommt es daher über die Aktivierung von HIF-1 α zu einer gesteigerten Expression der P_{gk}1 (Semenza *et al.* 1997, Haseloff *et al.* 2006). Im vorliegenden Modell war drei Stunden nach Einsetzen des Reizes eine Herunterregulation zu beobachten, die zunächst nicht zu erwarten war. In Versuchen an AtT20 Zellen, murinen adenohipophysären Zellen, konnte nach CRH-Gabe ins Medium ein zeitlicher Verlauf der P_{gk}1-Regulation beobachtet werden. Initial kam es hier zu einem leichten Anstieg der P_{gk}1, nach zwei Stunden war eine 14fache Abnahme und nach sechs Stunden war noch eine 3fache Abnahme im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (Kronsbein *et al.* 2008). Diese Werte decken sich gut mit der hier nach drei Stunden verzeichneten 15fachen Abnahme des glycolytischen Enzyms in der 2D-Gelelektrophorese. Stress, Hypoxie und Anämie führen zu einem messbaren Anstieg der CRH-Werte (Allen 2001) und könnten somit als Erklärung für die gefundene Regulation der P_{gk}1 dienen, vor allem dann, wenn man die ebenfalls beobachtete gesteigerte Sekretion von Prolaktin mit in die Überlegung einbezieht (Xu *et al.* 2006).

Das letzte in den Hypophysenhomogenaten sehr deutlich und signifikant herunterregulierte Protein wurde nach der MALDI-MS einem bereits in der Datenbank vorliegenden Protein zugeordnet, dessen Funktion bisher unbeschrieben ist.

Möglicherweise handelt es sich hier um ein Protein, das nach einsetzender Hypoxie herunterreguliert wird und damit eine Signalkaskade anstößt oder aber Faktoren frei gesetzt werden. Die weitere Untersuchung dieses Proteinspots könnte daher ebenfalls von Interesse sein.

Neben den Spots aus den Gelen der Hypophysenhomogenate wurden auch die Mikrodialysate in der 2D-Gelelektrophorese ausgewertet. Aufgrund des geringen Probenvolumens und des niedrigen Gesamtproteingehaltes im CSF konnten keine MALDI-MS der hier unterschiedlich regulierten Spots vorgenommen werden.

Von allen detektierten Spots fanden sich 23 auf allen Gelen wieder und nur sechs zeigten unter beiden hypoxischen Bedingungen gleiche Regulationsmuster.

Über den Versuchszeitraum kam es zumeist zu einem initialen Anstieg des Spotvolumens nach Setzen des Reizes, gefolgt von einer Abnahme über den Versuchszeitraum.

Da keine massenspektrometrische Auswertung der Proteine möglich war, wurden diese mittels Isoelektrischem Punkt und dem Molekulargewichtsdaten aus den Gelen in der Datenbank bestimmt.

Für vier der sechs bestimmten Spots ergaben, entsprechend der gewählten Suchkriterien, sinnvolle Treffer.

Direkt nach dem hypoxischen Reiz wurde das Hormon Prolaktin fast 100fach hochreguliert und im Verlauf der drei Stunden wieder deutlich herunterreguliert. Prolaktin konnte mit nur einem Treffer in der Datenbank eindeutig zugeordnet werden.

Die Zunahme der Prolaktinsekretion auf einen hypoxischen Reiz erfolgt höchstwahrscheinlich aufgrund des Anstiegs von CRH, wie bereits im letzten Abschnitt beschrieben. Im Allgemeinen reagiert die HPA-Achse auf Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe mit gesteigerter Sekretion einer Reihe von Stoffen (Fassbender *et al.* 1994, Struder *et al.* 1999, Feng *et al.* 2006, Xu *et al.* 2006, Benso *et al.* 2007). Umgekehrt wird aber auch die Aktivierung von CRH durch Prolaktin selbst über den ERK/MAPK-Weg beschrieben (Blume *et al.* 2009).

Vermehrte Prolaktinausschüttung wird auch mit gesteigerter Erythropoiese in Verbindung gebracht (Jepson & Lowenstein 1964), wobei Erythropoietin und Prolaktin synergistisch agieren sollen (Socolovsky *et al.* 1998). Der Prolaktinrezeptor, der mit in die Gruppe der Zytokine- und hematopoietischen Rezeptoren gehört, wird auf Lymphozyten und hematopoetischen Vorläuferzellen exprimiert. Die Bindung von Prolaktin an seinen Rezeptor führt auf frühen Vorläuferzellen (CD43⁺) zur Expression des Erythropoietin-Rezeptors (EPOR). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zahl der Vorläuferzellen mit intaktem

EPOR bei Dialysepatienten mit Hyperprolaktinämie deutlich erhöht ist. Vermutet wird ein Kompensationsmechanismus; die Sensitivität gegenüber dem unzureichend vorhandenem Erythropoietin soll erhöht werden (Woody *et al.* 1999, Bellone *et al.* 2000). Ebenso findet man, dass es nach Erythropoietin-Gaben bei Dialysepatienten zu einem Abfall der Prolaktinwerte kommt (Kokot *et al.* 1989, Kokot *et al.* 1992). Da es sich bei diesen Befunden um dauerhafte Zustände handelt, können diese kaum mit dem vorliegenden Modell verglichen werden. Der beobachtete Anstieg der Prolaktinsekretion wird im hier genutzten Modell durch einen Anstieg der Erythropoietin-Synthese begleitet. Befunde zur Regulation der Erythropoietin-Synthese nach einer kurzfristigen Steigerung der Prolaktinausschüttung liegen leider nicht vor, dennoch bestätigen die Befunde zum Höhengaufenthalt und der damit verbundenen Prolaktinerhöhung und auch der gesteigerten Erythropoietin-Synthese die Ergebnisse (Eckardt *et al.* 1989a, Zhang & Du 2000, Stockmann & Fandrey 2006, Xu *et al.* 2006, Benso *et al.* 2007).

Einen direkten Zusammenhang zwischen der Steigerung der Erythropoietin-Synthese und Prolaktin lassen die Ergebnisse und Befunde aus der Literatur nicht zu, vielmehr scheinen beide Hormone ähnlich durch die Hypoxie reguliert zu werden. So kommt es bei dauerhaften Höhengaufenthalten und chronischen Hypoxien zu Abnahmen beider Hormone.

Unmittelbar nach den hypoxischen Reizen konnte eine fast 6fache Induktion des vascular endothelial growth factors (VEGF) detektiert werden, die im Verlauf der nächsten zwei Stunden auf eine 2,5fache Induktion abfiel.

Auch das Protein VEGF konnte mit nur einem Treffer eindeutig in der Datenbankrecherche identifiziert werden.

VEGF stellt ein Schlüsselprotein der Angiogenese dar und seine Expression wird über verschiedene Wege gesteigert (Ferrara *et al.* 2003). Er wird bei hypoxischen Zuständen und auch bei Hypoglykämie vermehrt gebildet (Marti 2002). Dabei unterscheiden sich allerdings die Signalwege; während VEGF als klassisches HIF-Zielgen bei Hypoxie über HIF1- α hochreguliert wird, führt eine Hypoglykämie zum Anstieg der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration, welches die PKC aktiviert, die wiederum die VEGF-Expression steigert (Park *et al.* 2001, Marti 2005).

VEGF sorgt für Neovaskularisation in den betroffenen Geweben und stellt so eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff sicher. Es soll daher sowohl bei Hypoxie und meist damit einhergehender Hypoglykämie im Gehirn neuroprotektiv wirken. Der in *In-vitro* und *In-vivo*-Versuchen bestätigte neuroprotektive Effekt wird erweitert mit der Permeabilisierung der

Blut-Hirn-Schranke. Beide Effekte werden dann über den PI3K/Akt-Weg eingeleitet (Jin *et al.* 2000a/b, Schoch *et al.* 2002, Kilic *et al.* 2006).

Weiterhin konnte bei leichter und nur kurzfristiger Hypoxie eine Präkonditionierung des Gewebes vor einer neuerlichen ernsthaften Hypoxie nachgewiesen werden (Ran *et al.* 2005).

Im vorliegenden Model wird die Sekretion von VEGF sowohl durch die hypoxischen Zustände als höchstwahrscheinlich auch durch eine Hypoglykämie des Hirngewebes ausgelöst.

Ebenfalls direkt nach dem hypoxischen Reiz hochreguliert konnte das Transportprotein Transthyretin in den 2D-Gelen identifiziert werden. Transthyretin wurde 5,4fach unmittelbar nach dem Reiz hochreguliert, um in der zweiten Stunde nach Reiz auf eine 3fache Induktion abzufallen. Nach drei Stunden war der Ausgangswert wieder erreicht.

Die Zuordnung per Datenbank lieferte 2 Treffer, von denen nur Transthyretin die nötigen Kriterien erfüllte.

Transthyretin ist ein Plasmatransportprotein; neben TGB (thyroxine binding protein) und Albumin ist es eines der wichtigsten Transporteure für Thyroidhormone beim Menschen. Bei Nagern und insbesondere bei Ratten fehlt das TGB, so dass TTR (Transthyretin) und Albumin die einzigen Transporter sind. TTR wird konstitutiv in der Leber und vom Plexus choroideus synthetisiert. Das TTR macht 20% der vom Plexus choroideus hergestellten Proteine aus und stellt damit den wichtigsten Thyroidhormtransporter im Gehirn dar. An das TTR gebunden wird Thyroxin (T4) über die Blut-Hirn-Schranke transportiert und dient dort nach Konvertierung zu Triiodthyroxin (T3) der Hirnentwicklung und Neuroprotektion. Neben T4 wird auch RBP (retinol-binding protein) an TTR gebunden transportiert.

Abgesehen von diesen Aufgaben scheint TTR noch eine Reihe weiterer Funktionen zu erfüllen. So soll es Noradrenalin binden und zu dessen Degradation beitragen, wobei die physiologische Bedeutung dieser Aufgabe noch unklar ist. Weiterhin soll es die IL-1 Produktion in Monozyten inhibieren und so an der Immunantwort auf Inflammation und Infektionen beteiligt sein (Palha 2002, Schreiber 2002).

Klar beschrieben ist der Beitrag zur Neuroprotektion, durch Bindung des TTR an das amyloid beta (Abeta) Protein wird dessen Aggregation verhindert. Abeta steht im Zusammenhang mit der Entstehung der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer. Eine Reihe von Mechanismen sind in der Literatur dargestellt, wie TTR seinen Beitrag an der Vermeidung der Abeta-Aggregation leistet. So sollen Östrogene und auch Testosterone die TTR-

Sekretion erhöhen. Gleiches gilt für die Administration von Omega-3-Fettsäuren, Nikotin und Gingko-Extrakten. Zudem findet man Belege für den Anstieg von intrazellulärem Kalzium nach Erhöhung der TTR-Sekretion, welches wiederum andere protektive Wege anschaltet (Li *et al.* 2000, Puskas *et al.* 2003, Tang *et al.* 2004, Hou *et al.* 2007, Goncalves *et al.* 2008, Quintela *et al.* 2009).

In den hier durchgeführten Versuchen wurde TTR nach Induktion einer lokalen cerebralen und einer systemischen Hypoxie heraufreguliert. Es ergeben sich nun mehrere Erklärungsmöglichkeiten für diese Ergebnisse; einerseits könnte die durch die Hypoxie ausgelöste HPA-Achsen Verschiebung, abzulesen am Anstieg der Prolaktinwerte, zu einer Aktivierung der TTR-Sekretion geführt haben. Akute hypoxische Zustände erhöhen den CRH-Spiegel im Serum (Chen & Du 1996, Chen *et al.* 2004, Xu *et al.* 2006, Raff *et al.* 2007, Kronsbein *et al.* 2008), aber auch eine Erhöhung der Testosteronspiegel und der Östrogenwerte ist beschrieben (Bouissou *et al.* 1986, Barnholt *et al.* 2006, Boksa & Zhang 2008, Lee *et al.* 2008). Funktionell dient dann die Erhöhung des TTR der Protektion von neuronalem Gewebe auf direktem oder indirektem Weg.

In der Literatur findet man daneben noch den Anstieg der Thyroidhormonwerte nach akuten hypoxischen Reizen, welches eine Erhöhung der Transporterkapazität nach sich ziehen könnte (Dimai *et al.* 2000, Benso *et al.* 2007). Im Widerspruch dazu steht die Aussage, dass TTR nicht unbedingt nötig ist, damit Thyroidhormone in das Gehirn gelangen (Palha *et al.* 2002).

Ein Anstieg der Thyroidhormone würde den Kreis zur renalen Erythropoietin-Synthese schließen. Eine Erhöhung der Thyroidhormone führt, wie oben bereits erwähnt, zu einer Steigerung der Erythropoietin-Synthese über die Aktivierung von HIF-1 α (Das *et al.* 1975, Fandrey *et al.* 1994, Ma *et al.* 2004, Otto & Fandrey 2008).

Bei dem letzten identifizierten Protein handelt es sich höchstwahrscheinlich um Glypican 1, ein Heparansulat-Proteoglycan, welches mit der Regulation von Zell-Zellinteraktion und der Interaktion zwischen HBGFs (heparin-binding-growth-factors) und ihren Rezeptoren genannt werden und damit im Zusammenhang mit Zellproliferation und Differenzierung, Geweberegeneration und Neovaskularisation gesehen werden (Fransson 2003, Fransson *et al.* 2004, Aikawa *et al.* 2008, Filmus *et al.* 2008). Auch neuroprotektive Wirkung über das Recycling von Vitamin C wird beschrieben (Fransson & Mani 2007).

Die im vorliegenden Modell beobachtete Hochregulation direkt nach dem hypoxischen Reiz passt zu den Aussagen über die Funktion von Glypican 1 als Neuroprotektivum oder aber als Vermittler von Angiogensemechanismen.

Die von uns in der Hypophyse und Mikrodialysaten mittels 2D-Gelelektrophorese visualisierten und mit Datenbankrecherche oder MALDI-MS identifizierten Proteine stehen zumeist im direkten Zusammenhang mit den hypoxischen Ereignissen.

Die meisten der regulierten Proteine dienen sowohl der Aufrechterhaltung der Energie- und Sauerstoffhomöostase im Gewebe als auch der Neuroprotektion. Einige der hier beschriebenen Proteine erscheinen von besonderem Interesse im Bezug auf die mögliche extrarenale Beeinflussung der renale Erythropoietin-Synthese. So könnten Prolaktin, der Regulator der Rab-GTPase-Aktivität, Pgk1 und Transthyretin als Marker einer verschobenen HPA-Achsenaktivität mögliche Rückschlüsse auf eine hypophysäre Beeinflussung der Erythropoietin-Synthese an der Niere z.B. durch Thyroidhormone zulassen. Beschrieben ist eine Erhöhung der Thyroidhormone durch akute Hypoxien und ebenso die Induktion der Erythropoietin-Synthese an der Niere durch erhöhte Thyroidhormonspiegel.

5. Konklusion

Die Erythropoese stellt im gesunden Organismus die Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff und Energie sicher. Deren Anpassung an einen gesteigerten Bedarf oder sich verändernde Umweltsituationen wird hauptsächlich durch das Hormon Erythropoietin gewährleistet. Bei einem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe wird das Hormon vermehrt in der adulten Niere gebildet, um im Knochenmark befindliche Erythropoietin-sensitive, hematopoietische Vorläuferzellen zur Reife zu bringen.

Die Wahrnehmung des Sauerstoffmangels soll nach gängiger Lehrmeinung ebenfalls in der Niere stattfinden, wobei hierzu alternative Mechanismen in der Literatur diskutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte unsere These zur extrarenalen Beeinflussung der renalen Erythropoietin-Synthese manifestiert werden und im Speziellen sollte die Bedeutung des Hypothalamus-Hypophysenbereiches in dieser Regulation evaluiert werden.

Bereits publizierte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zum Anstieg der Plasma-Erythropoietin-Werte nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) zeigten eine Beteiligung des Hypothalamus-Hypophysenbereiches an der renalen Erythropoietin-Produktion auf. Die hier durchgeführten Versuche bestätigten diese Ergebnisse und erweiterten das Verständnis, wie hypoxische Reize im Organismus bewertet und in eine entsprechende Erythropoietin-Antwort umgesetzt werden.

Eine Erhöhung des ICP bei hypophysectomierten Tieren zeigte, dass die Reaktion der Hypophyse auf einen hypoxischen Reiz von erheblicher Bedeutung für die renale Erythropoietin-Synthese ist, da es unter diesen Bedingungen zu keinerlei Veränderung der Erythropoietin-Plasmawerte kam.

Die Relevanz der hypophysären Beteiligung an der renalen Erythropoietin-Antwort zeigte sich weiterhin im Vergleich der lokalen cerebralen Hypoxie mit einer systemischen Hypoxie im Tierversuchsmodell. Generell wurde der systemische Reiz an der Niere und in der Leber in eine stärkere Genexpression umgesetzt als der lokal cerebrale. Allerdings wurde die Genantwort nach beiden Reizen in der Niere in eine vergleichbare Proteinantwort umgesetzt. Der lokale cerebrale Reiz stellt daher für den Hypothalamus-Hypophysenbereich und die renale Erythropoietin-Synthese den adäquaten Reiz dar. Zudem scheinen die hypoxischen Signale über verschiedene Signalmoleküle weitergeleitet zu werden. So könnte die vermutete Antwort aus der Hypophyse über HIF-1 α vermittelt werden, während die systemische Antwort über HIF-2 α vermittelt wird.

Diese Vermutung wurde durch die in der Zellkultur gewonnenen Ergebnisse gestützt.

Nach Stimulation von Hepatomzellen und Nierenfibroblasten zeigte sich eine deutlichere Antwort auf Ebene der Genexpression und Proteinexpression durch die während systemischer Hypoxie gewonnenen Dialysate. Zudem war eine deutliche Supprimierung der Erythropoietin-Antwort nach Zugabe der Mikrodialysate zu vermerken. Es bleibt zu vermuten, dass sich in den Mikrodialysaten die Erythropoietin-Synthese hemmende Faktoren befinden. Wie in der 2D-Gelelektrophorese herausgefunden, wurden während systemischer und auch lokaler Hypoxie einige Proteine in die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) sekretiert, die zum einen auch von Leberzellen produziert werden und zum anderen generell eine hemmende Wirkung im Sinne einer Rückkopplungsregulation haben können.

Eine Hypoxie führt unserer These nach, zu einer Aktivierung des Hypothalamus-Hypophysenbereiches mit Wirkung auf die renale Erythropoietin-Produktion. Bestätigt wurde dies durch die Evaluierung der Erythropoietin-Genexpression im Gehirn. In allen untersuchten Bereichen kam es nach hypoxischen Reizen zu einer Induktion der Genantwort mit Ausnahme der Hypophyse. Diese zeigte nach Erhöhung des ICP eine extreme Genantwort und nach Anämie eine komplette Herunterregulation der Erythropoietin-Genexpression, was die These erhärtet, dass die Hypophyse während einer Hypoxie endokrinen Funktionen nachgeht. Kommt es zu einer gravierenden Unterversorgung oder Verletzung des hypophysären Gewebes, werden parakrin neuroprotektive Faktoren sezerniert, wie hier Erythropoietin.

Untersuchungen der Veränderungen im Hypophysenproteom und der in die CSF sezernierten Proteine während und nach einer Hypoxie bestätigen eine Beteiligung des Hypothalamus-Hypophysenbereiches.

Viele der identifizierten Proteine stehen unmittelbar im Zusammenhang mit der Neuroprotektion und der Sicherstellung der Energie- und Sauerstoffhomöostase. Einige der detektierten und gemeinsam regulierten Proteine machen den Stellenwert des Hypothalamus-Hypophysenbereiches für eine gut funktionierende Erythropoiese und Erythropoietin-Synthese deutlich.

Insbesondere die deutliche Erhöhung des Prolaktins, eines Regulators der Rab-GTAPase Aktivität, das glycolytische Enzym Pfkfb3 und Transthyretin bestätigen die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) und die mögliche Erhöhung von Thyroidhormonen, die ihrerseits die Erythropoietin-Synthese an der Niere steigern.

Die Relevanz einer Beteiligung des Hypothalamus-Hypophysenbereiches an der renalen Erythropoietin-Synthese kann ebenfalls durch die Betrachtung der evolutionären Entwicklung dieses Bereiches untermauert werden. Bereits vor 350 bis 50 Mio. Jahren waren endokrine

Mechanismen bei frühen Teleostern so ausgebildet, wie man sie heute konserviert durch das gesamte Tierreich findet. Betrachtet man die HPA-Achse im Zusammenhang mit der Erythropoiese, so sind auch diese bereits bei Teleostern und einer Vielzahl von Chondrichthyes so induzierbar wie bei den heutigen Mammaliern (Santos *et al.* 2002, MacKenzie *et al.* 2009). Durch exogene Stressoren, wie z.B. Hypoxie wird bei Knorpel- und Knochenfischen HIF-1 α hochreguliert und die Erythropoietin-Synthese vornehmlich in der Niere, aber auch im Herzen und der Leber induziert (Chou *et al.* 2004, Nikinmaa & Rees 2005, Chu *et al.* 2008, Geven *et al.* 2009).

Die vorliegende Arbeit stellt die eminente Bedeutung des Hypothalamus-Hypophysenbereiches für die Regulation der renalen Erythropoietin-Synthese heraus. In allen durchgeführten Versuchen stellte sich der lokale cerebrale Reiz als der mit dem meisten Gewicht heraus, wobei dieser über HIF-1 α und der systemische über HIF-2 α vermittelt werden könnte. Zudem zeigte sich eine deutliche Aktivierung der HPA-Achse durch Hypoxie, welche wiederum die Möglichkeit der Beteiligung von Thyroidhormonen an der renalen Erythropoietin-Produktion zulässt.

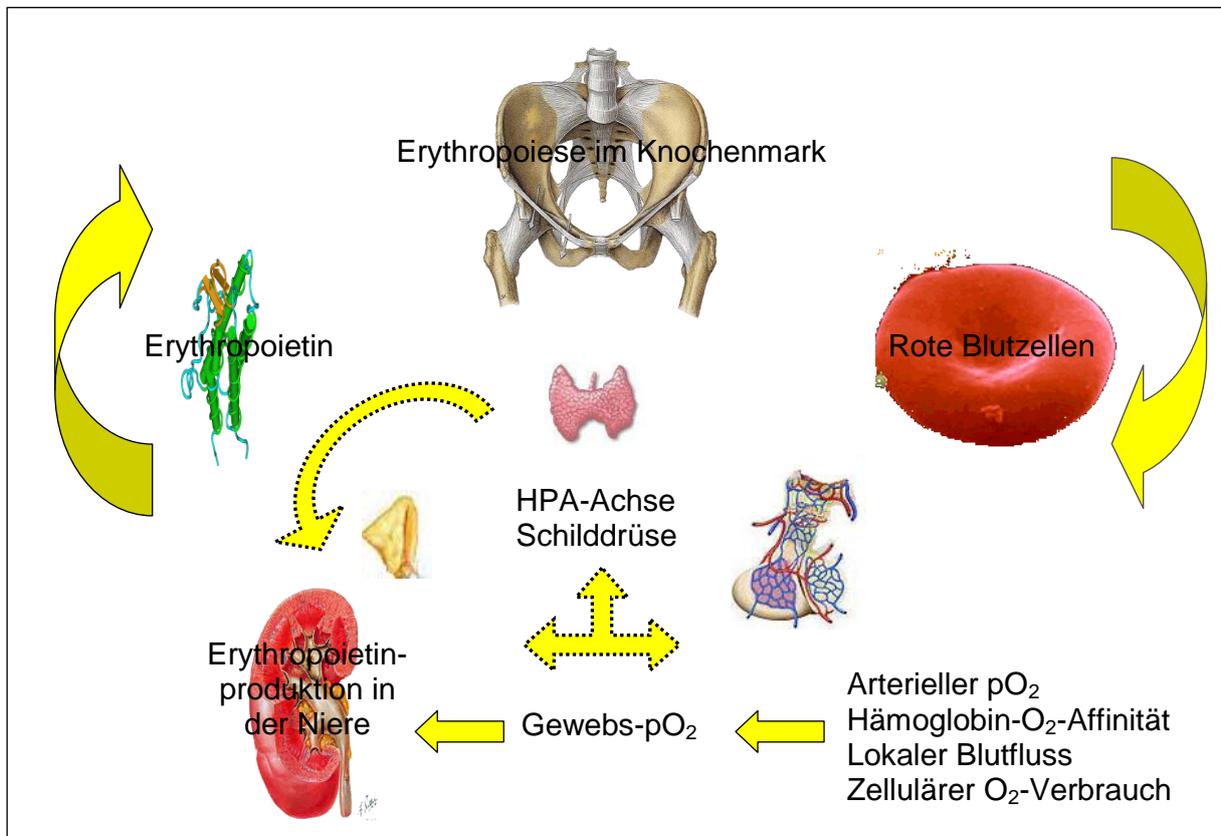


Abb. 31: Hypothetischer Regelkreis der Erythropoese

Dargestellt ist der hypothetische Regelkreis der Erythropoese mit einer Aktivierung der HPA-Achse und eventueller Beteiligung von Thyroidhormonen bei der Regulation der renalen Erythropoietin-Synthese.

Somit kann abschließend die initial formulierte These erweitert werden: Bei Hypoxie kommt es im Hypothalamus-Hypophysenbereich zur Freisetzung einer Reihe von Faktoren, die auf humoralem Weg unmittelbar oder über weitere Organbeteiligung die Erythropoietin-Synthese an der Niere steigern (Abb. 31).

Im Weiteren wäre die Beteiligung der verschiedenen HIF- α -Spezies an der Vermittlung der verschiedenen hypoxischen Reize von Interesse, da dies aktueller Forschungsgegenstand ist. Und natürlich bleibt die Frage, welches der in der Hypophyse regulierten und/oder sezernierten Proteine von unmittelbarer Relevanz für die renale Erythropoietin-Synthese ist.

6. Zusammenfassung

Kürzlich von unserer Arbeitsgruppe publizierte Daten haben gezeigt, dass die Sauerstoff- (O_2)-Versorgung der Niere nicht die einzige Determinante der renalen Synthese von Erythropoietin (EPO) ist. Vielmehr spielt in diesem Zusammenhang die Hypoxie-Antwort des Zwischenhirns, hier v. a. die der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (HHA) eine bedeutsame Rolle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte in erster Linie geklärt werden, inwieweit die EPO-Genexpression und das Proteom der HHA durch eine transiente cerebrale Hypoxie (ICP: 100 mmHg, 10 min) beeinflusst werden; die Daten wurden mit denen aus Versuchen unter einer systemischen Hypoxie (Anämie: Hkt. 30%) verglichen.

Generell wurde der systemische hypoxische Reiz in der Niere in eine stärkere EPO-Genexpression umgesetzt als der lokal cerebrale. Allerdings wurde die Genantwort nach beiden Reizen in eine vergleichbare Proteinantwort umgesetzt. Zudem scheinen die hypoxischen Signale über verschiedene Signalmoleküle weitergeleitet zu werden: Die Antwort der Hypophyse könnte über HIF-1 α vermittelt werden, während die Transduktion der systemischen Antwort über HIF-2 α erfolgt. Gestützt wurden diese Ergebnisse durch Untersuchungen an Zellkulturen, da sowohl Hepatomzellen wie auch Nierenfibroblasten eine deutlichere Antwort auf Ebene der Gen- und Proteinexpression nach Stimulation durch die während systemischer Hypoxie gewonnenen Microdialysate aus der HHA zeigten.

In allen untersuchten Gehirn-Arealen kam es nach einer hypoxischen Reizung zur Induktion der EPO-Genantwort – mit Ausnahme der Hypophyse. Diese zeigte nach ICP eine deutliche Genantwort, während nach Anämie eine Herunterregulation der EPO-Genexpression erfolgte. Durch Untersuchungen des Proteoms der HHA konnten hypoxisch regulierte Proteine identifiziert werden, die in direktem Zusammenhang mit der Neuroprotektion sowie der Sicherstellung der Energie- und O_2 -Homöostase stehen (Prolaktin, Regulator der Rab-GTAPase-Aktivität, das glycolytische Enzym Pfkfb3, Transthyretin). Zudem kam es zur Erhöhung von Schilddrüsen-Hormonen, die ihrerseits die renale EPO-Synthese steigern.

Aufgrund der vorliegenden Befunde müssen die Vorstellungen zum Mechanismus zur Regulation der Erythropoese erweitert werden: Bei Hypoxie kommt es zur Freisetzung einer Reihe von Faktoren aus der HHA, die auf humoralen Wege unmittelbar oder über weitere Organbeteiligung (Schilddrüse, Nebenniere) die renale EPO-Synthese steigern. Die Wichtigkeit der hier identifizierten hypoxisch regulierten Proteine im Zusammenhang mit der EPO-Synthese bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

7. Literatur

Abbrecht PH & Littell JK 1972 Erythrocyte life-span in mice acclimatized to different degrees of hypoxia. *J.Appl.Physiol.* **32** 443-445.

Adachi T 2008 [Anemia in the field of obstetrics and gynecology]. *Nippon Rinsho.* **66** 548-552.

Adamson JW 1996 Regulation of red blood cell production. *Am.J.Med.* **101** 4S-6S.

Agren-Wilsson A, Eklund A, Koskinen LO, Bergenheim AT & Malm J 2005 Brain energy metabolism and intracranial pressure in idiopathic adult hydrocephalus syndrome. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* **76** 1088-1093.

Aikawa T, Whipple CA, Lopez ME, Gunn J, Young A, Lander AD & Korc M 2008 Glypican-1 modulates the angiogenic and metastatic potential of human and mouse cancer cells. *J.Clin.Invest.* **118** 89-99.

Allen LH 2001 Biological mechanisms that might underlie iron's effects on fetal growth and preterm birth. *J.Nutr.* **131** 581S-589S.

Alnouti Y & Klaassen CD 2008 Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (Aldh) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. *Toxicol.Sci.* **101** 51-64.

Anderson NL & Anderson NG 1998 Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis.* **19** 1853-1861.

Annable L, Cotes PM & Mussett MV 1972 The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull.World Health Organ.* **47** 99-112.

Anzawa N, Kushikata T, Ohkawa H, Yoshida H, Kubota T & Matsuki A 2001 Increased noradrenaline release from rat preoptic area during and after sevoflurane and isoflurane anesthesia. *Can.J.Anaesth.* **48** 462-465.

Ayus JC, Achinger SG & Arieff A 2008 Brain cell volume regulation in hyponatremia: role of sex, age, vasopressin, and hypoxia. *Am.J.Physiol Renal Physiol.* **295** F619-F624.

Bachmann S, Le Hir M & Eckardt KU 1993 Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J.Histochem.Cytochem.* **41** 335-341.

Balestra C, Germonpre P, Poortmans JR & Marroni A 2006 Serum erythropoietin levels in healthy humans after a short period of normobaric and hyperbaric oxygen breathing: the "normobaric oxygen paradox". *J.Appl.Physiol.* **100** 512-518.

Barnholt KE, Hoffman AR, Rock PB, Muza SR, Fulco CS, Braun B, Holloway L, Mazzeo RS, Cymerman A & Friedlander AL 2006 Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure (4,300 meters): modulating effects of caloric restriction. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* **290** E1078-E1088.

Bauer C & Kurtz A 1989 Oxygen sensing in the kidney and its relation to erythropoietin production. *Annu.Rev.Physiol.* **51:845-56.** 845-856.

- Bauer C, Kurtz A, Eckardt KU & Tannahill L 1989 [Regulation of erythropoietin synthesis]. *Nephron*. **51 Suppl 1:3-10**. 3-10.
- Baumgartl H, Leichtweiss HP, Lubbers DW, Weiss C & Huland H 1972 The oxygen supply of the dog kidney: measurements of intrarenal pO₂. *Microvasc.Res.* **4** 247-257.
- Bellone G, Rollino C, Borsa S, Ferrero I, Martina G, Carbone A, Mareschi K, Quarello F, Piccoli G, Emanuelli G & Matera L 2000 Association between elevated Prolaktin levels and circulating erythroid precursors in dialyzed patients. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **223** 367-371.
- Benso A, Broglio F, Aimaretti G, Lucatello B, Lanfranco F, Ghigo E & Grottoli S 2007 Endocrine and metabolic responses to extreme altitude and physical exercise in climbers. *Eur.J.Endocrinol.* **157** 733-740.
- Bernards A & Settleman J 2005 GAPs in growth factor signalling. *Growth Factors.* **23** 143-149.
- Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, MacKenzie ET & Petit E 2000 Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* **30** 271-278.
- Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E & Schumann-Bard P 2002a Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **22** 393-403.
- Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E & Sharp FR 2002b Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J.Biol.Chem.* **277** 39728-39738.
- Besarab A & Soman S 2005 Anemia management in chronic heart failure: lessons learnt from chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* **28** 363-371.
- Bittorf T, Jaster R, Ludtke B, Kamper B & Brock J 1997 Requirement for JAK2 in erythropoietin-induced signalling pathways. *Cell Signal.* **9** 85-89.
- Blaise S, Alberto JM, Nedelec E, Ayav A, Pourie G, Bronowicki JP, Gueant JL & Daval JL 2005 Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr.Res.* **57** 777-782.
- Blake CA, Brown LM, Duncan MW, Hunsucker SW & Helmke SM 2005 Estrogen regulation of the rat anterior pituitary gland proteome. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* **230** 800-807.
- Blokhina O, Virolainen E & Fagerstedt KV 2003 Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann.Bot.(Lond).* **91 Spec No:179-94**. 179-194.
- Blume A, Torner L, Liu Y, Subburaju S, Aguilera G & Neumann ID 2009 Prolaktin activates mitogen-activated protein kinase signaling and corticotropin releasing hormone transcription in rat hypothalamic neurons. *Endocrinology.* **150** 1841-1849.
- Boksa P & Zhang Y 2008 Global birth hypoxia increases the neonatal testosterone surge in the rat. *Neuroendocrinology.* **88** 266-275.
- Bouissou P, Peronnet F, Brisson G, Helie R & Ledoux M 1986 Metabolic and endocrine responses to graded exercise under acute hypoxia. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol.* **55** 290-294.
- Bourgoignie JJ, Gallagher NI, Perry HM, Jr., Kurz L, Warnecke MA & Donati RM 1968 Renin and erythropoietin in normotensive and in hypertensive patients. *J.Lab Clin.Med.* **71** 523-536.

Boxberger HJ 2006 Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur. Wiley-VCH Verlag.

Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML & Peet DJ 2006 Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J.Biol.Chem.* **281** 22575-22585.

Brenner B, Fandrey J & Jelkmann W 1994 Serum immunoreactive erythropoietin in hyper- and hypothyroidism: clinical observations related to cell culture studies. *Eur.J.Haematol.* **53** 6-10.

Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM & Cerami A 2000 Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97** 10526-10531.

Bruegge K, Jelkmann W & Metzén E 2007 Hydroxylation of hypoxia-inducible transcription factors and chemical compounds targeting the HIF- α hydroxylases. *Curr.Med.Chem.* **14** 1853-1862.

Bruick RK & McKnight SL 2001 A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* **294** 1337-1340.

Budarf M, Huebner K, Emanuel B, Croce CM, Copeland NG, Jenkins NA & D'Andrea AD 1990 Assignment of the erythropoietin receptor (EPOR) gene to mouse chromosome 9 and human chromosome 19. *Genomics.* **8** 575-578.

Burlingame AL, Boyd RK & Gaskell SJ 1998 Mass spectrometry. *Anal.Chem.* **70** 647R-716R.

Buryanov YI & Shevchuk TV 2005 DNA methyltransferases and structural-functional specificity of eukaryotic DNA modification. *Biochemistry (Mosc.).* **70** 730-742.

Cahan C, Decker MJ, Arnold JL, Goldwasser E & Strohl KP 1995 Erythropoietin levels with treatment of obstructive sleep apnea. *J.Appl.Physiol.* **79** 1278-1285.

Caro J, Brown S, Miller O, Murray T & Erslev AJ 1979 Erythropoietin levels in uremic nephric and anephric patients. *J.Lab Clin.Med.* **93** 449-458.

Cash TP, Pan Y & Simon MC 2007 Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic.Biol.Med.* **43** 1219-1225.

Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A & Brines M 2002 Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99** 2258-2263.

Chakravarti B, Seshi B, Ratanaprayul W, Dalal N, Lin L, Raval A & Chakravarti DN 2009 Proteome profiling of aging in mouse models: differential expression of proteins involved in metabolism, transport, and stress response in kidney. *Proteomics.* **9** 580-597.

Charlton H 2008 Hypothalamic control of anterior pituitary function: a history. *J.Neuroendocrinol.* **20** 641-646.

Chavez JC, Baranova O, Lin J & Pichiule P 2006 The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J.Neurosci.* **26** 9471-9481.

Chen XQ, Du JZ & Wang YS 2004 Regulation of hypoxia-induced release of corticotropin-releasing factor in the rat hypothalamus by norepinephrine. *Regul.Pept.* **119** 221-228.

Chen Z & Du JZ 1996 Hypoxia effects on hypothalamic corticotropin-releasing hormone and anterior pituitary cAMP. *Zhongguo Yao Li Xue.Bao.* **17** 489-492.

- Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT & Noguchi CT 2007 Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J.Biol.Chem.* **282** 25875-25883.
- Chou CF, Tohari S, Brenner S & Venkatesh B 2004 Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Blood* **104** 1498-1503.
- Chu CY, Cheng CH, Yang CH & Huang CJ 2008 Erythropoietins from teleosts. *Cell Mol.Life Sci.* **65** 3545-3552.
- Clark SF 2008 Iron deficiency anemia. *Nutr.Clin.Pract.* **23** 128-141.
- Clemons GK, Fitzsimmons SL & DeManincor D 1986 Immunoreactive erythropoietin concentrations in fetal and neonatal rats and the effects of hypoxia. *Blood.* **68** 892-899.
- Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ & Maxwell PH 2000 Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J.Biol.Chem.* **275** 25733-25741.
- Cutroneo KR, White SL, Buttolph TR, Allison G & Ehrlich HP 2007 Phenotypic expression of human hepatoma cells in culture. *J.Cell Biochem.* **100** 1081-1085.
- D'Andrea AD & Zon LI 1990 Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J.Clin.Invest.* **86** 681-687.
- Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K, Wendt M, Kleschyov AL, Stalleicken D, Ullrich V, Mulsch A & Munzel T 2004 Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol.Pharmacol.* **66** 1372-1382.
- Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P & Fandrey J 1998 Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood.* **92** 3218-3225.
- Dame C & Juul SE 2000 The switch from fetal to adult erythropoiesis. *Clin.Perinatol.* **27** 507-526.
- Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, Wallach T, Hussels CS & Scholz H 2006 Wilms tumor suppressor, *Wt1*, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood.* **107** 4282-4290.
- Dame C, Sola MC, Lim KC, Leach KM, Fandrey J, Ma Y, Knopfle G, Engel JD & Bungert J 2004 Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J.Biol.Chem.* **279** 2955-2961.
- Das KC, Mukherjee M, Sarkar TK, Dash RJ & Rastogi GK 1975 Erythropoiesis and erythropoietin in hypo- and hyperthyroidism. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **40** 211-220.
- de Seigneux S, Malte H, Dimke H, Frokiaer J, Nielsen S & Frische S 2007 Renal compensation to chronic hypoxic hypercapnia: downregulation of pendrin and adaptation of the proximal tubule. *Am.J.Physiol Renal Physiol.* **292** F1256-F1266.
- Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, Martin F, Jacobsen F, Boone T & Elliott S 1992 Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry.* **31** 9871-9876.
- Dhodda VK, Sailor KA, Bowen KK & Vemuganti R 2004 Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J.Neurochem.* **89** 73-89.
- Digicaylioglu M & Lipton SA 2001 Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature.* **412** 641-647.

- Dimai HP, Ramschak-Schwarzer S & Leb G 2000 Altitude hypoxia: effects on selected endocrinological parameters. *Wien.Med.Wochenschr.* **150** 178-181.
- Eckardt KU, Bernhardt WM, Weidemann A, Warnecke C, Rosenberger C, Wiesener MS & Willam C 2005 Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int.Suppl.* S46-S51.
- Eckardt KU, Boutellier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA & Bauer C 1989a Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J.Appl.Physiol.* **66** 1785-1788.
- Eckardt KU, Kurtz A & Bauer C 1989b Regulation of erythropoietin production is related to proximal tubular function. *Am.J.Physiol.* **256** F942-F947.
- Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H, Jacob S, Herrmann M & Siren AL 2004a Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis.* **19** 195-206.
- Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Bruck W, Ruther E, Cerami A, Becker W & Siren AL 2004b Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol.Psychiatry.* **9** 42-54.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ & Ratcliffe PJ 2001 C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* **107** 43-54.
- Erslev AJ 1974 In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum-free solution. *Blood* **44** 77-85.
- Erslev AJ, Caro J & Besarab A 1985 Why the kidney? *Nephron.* **41** 213-216.
- Erslev AJ, Caro J, Kansu E, Miller O & Cobbs E 1979 Plasma erythropoietin in polycythemia. *Am.J.Med.* **66** 243-247.
- Erslev AJ, Caro J, Kansu E & Silver R 1980 Renal and extrarenal erythropoietin production in anaemic rats. *Br.J.Haematol.* **45** 65-72.
- Erslev AJ, Wilson J & Caro J 1987 Erythropoietin titers in anemic, nonuremic patients. *J.Lab Clin.Med.* **109** 429-433.
- Fandrey J, Pagel H, Frede S, Wolff M & Jelkmann W 1994 Thyroid hormones enhance hypoxia-induced erythropoietin production in vitro. *Exp.Hematol.* **22** 272-277.
- Farias JG, Bustos-Obregon E, Tapia PJ, Gutierrez E, Zepeda A, Juantok C, Cruz G, Soto G, Benites J & Reyes JG 2008 Time course of endocrine changes in the hypophysis-gonad axis induced by hypobaric hypoxia in male rats. *J.Reprod.Dev.* **54** 18-21.
- Farrell F & Lee A 2004 The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist.* **9 Suppl 5:18-30.** 18-30.
- Fassbender K, Schmidt R, Mossner R, Daffertshofer M & Hennerici M 1994 Pattern of activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in acute stroke. Relation to acute confusional state, extent of brain damage, and clinical outcome. *Stroke.* **25** 1105-1108.
- Feng XW, Kang J, Wang ZF, Wang QY & Yu RJ 2006 [Regulation of hypothalamus-pituitary-adrenal axis and growth hormone axis in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome patients]. *Zhonghua Jie.He.He.Hu Xi.Za Zhi.* **29** 230-232.

- Ferrag F, Pezet A, Chiarenza A, Buteau H, Nelson BH, Goffin V & Kelly PA 1998 Homodimerization of IL-2 receptor beta chain is necessary and sufficient to activate Jak2 and downstream signaling pathways. *FEBS Lett.* **421** 32-36.
- Ferrara N, Gerber HP & LeCouter J 2003 The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.* **9** 669-676.
- Filmus J, Capurro M & Rast J 2008 Glypicans. *Genome Biol.* **9** 224.
- Fisher JW 2003 Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*. **228** 1-14.
- Fisher JW & Samuels AI 1967 Relationship between renal blood flow and erythropoietin production in dogs. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **125** 482-485.
- Flohr F & Seufert J 2007 Pituitary and adrenal gland surgery. *Internist (Berl)*. **48** 578-585.
- Foller M, Huber SM & Lang F 2008 Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB.Life.* **60** 661-668.
- Fransson LA 2003 Glypicans. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **35** 125-129.
- Fransson LA, Belting M, Cheng F, Jonsson M, Mani K & Sandgren S 2004 Novel aspects of glypican glycobiology. *Cell Mol.Life Sci.* **61** 1016-1024.
- Fransson LA & Mani K 2007 Novel aspects of vitamin C: how important is glypican-1 recycling? *Trends Mol.Med.* **13** 143-149.
- Ganguly TC, O'Brien ML, Karpen SJ, Hyde JF, Suchy FJ & Vore M 1997 Regulation of the rat liver sodium-dependent bile acid cotransporter gene by Prolaktin. Mediation of transcriptional activation by Stat5. *J.Clin.Invest.* **99** 2906-2914.
- Gassmann M, Heinicke K, Soliz J, Ogunshola OO, Marti HH, Hofer T, Grimm C, Heinicke I & Egli B 2003 Non-erythroid functions of erythropoietin. *Adv.Exp.Med.Biol.* **543** 323-330.
- Genc S, Akhisaroglu M, Kuralay F & Genc K 2002 Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro. *Neurosci.Lett.* **321** 73-76.
- Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, Yorukoglu K, Fadiloglu M & Gure A 2001 Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci.Lett.* **298** 139-141.
- Geven EJ, Flik G & Klaren PH 2009 Central and peripheral integration of interrenal and thyroid axes signals in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J.Endocrinol.* **200** 117-123.
- Ghosh K & Ghosh K 2007 Pathogenesis of anemia in malaria: a concise review. *Parasitol.Res.* **101** 1463-1469.
- Glass J, Lavidor LM & Robinson SH 1975 Use of cell separation and short-term culture techniques to study erythroid cell development. *Blood.* **46** 705-711.
- Goldberg MA, Brugnara C, Dover GJ, Schapira L, Charache S & Bunn HF 1990 Treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea and erythropoietin. *N.Engl.J.Med.* **323** 366-372.
- Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM & Bunn HF 1987 The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84** 7972-7976.

Goncalves I, Alves CH, Quintela T, Baltazar G, Socorro S, Saraiva MJ, Abreu R & Santos CR 2008 Transthyretin is up-regulated by sex hormones in mice liver. *Mol.Cell Biochem.* **317** 137-142.

Gorg A, Boguth G, Obermaier C, Posch A & Weiss W 1995 Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis.* **16** 1079-1086.

Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A & Brines M 2002 Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99** 9450-9455.

Govek EE, Newey SE & Van Aelst L 2005 The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* **19** 1-49.

Grune T, Reinheckel T, Li R, North JA & Davies KJ 2002 Proteasome-dependent turnover of protein disulfide isomerase in oxidatively stressed cells. *Arch.Biochem.Biophys.* **397** 407-413.

Gurkan C, Koulov AV & Balch WE 2007 An evolutionary perspective on eukaryotic membrane trafficking. *Adv.Exp.Med.Biol.* **607:73-83.** 73-83.

Gygi SP & Aebersold R 1999 Absolute quantitation of 2-D protein spots. *Methods Mol.Biol.* **112:417-21.** 417-421.

Halvorsen S 1961 Plasma erythropoietin levels following hypothalamic stimulation in the rabbit. *Scand.J.Clin.Lab Invest.* **13:564-75.** 564-575.

Halvorsen S 1966 The central nervous system in regulation of erythropoiesis. *Acta Haematol.* **35** 65-79.

Halvorsen S 1968 Effects of hypothalamic stimulation on erythropoiesis and on the production of erythropoiesis-stimulating factors in intact and nephrectomized rabbits. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **149** 88-93.

Halvorsen S, Roh BL & Fisher JW 1968 Erythropoietin production in nephrectomized and hypophysectomized animals. *Am.J.Physiol* **215** 349-352.

Hammer S, To KK, Yoo YG, Koshiji M & Huang LE 2007 Hypoxic suppression of the cell cycle gene CDC25A in tumor cells. *Cell Cycle.* **6** 1919-1926.

Hampel DJ, Pratschke J, May G, Reinke P & Schindler R 2006 Living kidney donation: anemia and inflammation in the early postoperative period. *Transplant.Proc.* **38** 661-663.

Harris GC & Levine JE 2003 Pubertal acceleration of pulsatile gonadotropin-releasing hormone release in male rats as revealed by microdialysis. *Endocrinology.* **144** 163-171.

Haseloff RF, Krause E, Bigl M, Mikoteit K, Stanimirovic D & Blasig IE 2006 Differential protein expression in brain capillary endothelial cells induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *Proteomics.* **6** 1803-1809.

Herkens C, Wolff M, Fandrey J, Schuler F & Jelkmann W 1993 Immunocytochemical demonstration of erythropoietin in hypoxic human hepatoma cultures. *Histochemistry.* **100** 303-309.

Hink U, Daiber A, Kayhan N, Trischler J, Kraatz C, Oelze M, Mollnau H, Wenzel P, Vahl CF, Ho KK, Weiner H & Munzel T 2007 Oxidative inhibition of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes nitroglycerin tolerance in human blood vessels. *J.Am.Coll.Cardiol.* **50** 2226-2232.

- Hodge DR, Xiao W, Clausen PA, Heidecker G, Szyf M & Farrar WL 2001 Interleukin-6 regulation of the human DNA methyltransferase (HDNMT) gene in human erythroleukemia cells. *J.Biol.Chem.* **276** 39508-39511.
- Hofso D, Ulvik RJ, Segadal K, Hope A & Thorsen E 2005 Changes in erythropoietin and haemoglobin concentrations in response to saturation diving. *Eur.J.Appl.Physiol* **95** 191-196.
- Holgado R, Anaya F & Del Castillo D 2001 Angiotensin II type 1 (AT1) receptor antagonists in the treatment of hypertension after renal transplantation. *Nephrol.Dial.Transplant.* **16 Suppl 1:117-20.** 117-120.
- Horl WH & Ertl G 2005 Anaemia and the heart. *Eur.J.Clin.Invest.* **35 Suppl 3:20-5.** 20-25.
- Hou X, Parkington HC, Coleman HA, Mechler A, Martin LL, Aguilar MI & Small DH 2007 Transthyretin oligomers induce calcium influx via voltage-gated calcium channels. *J.Neurochem.* **100** 446-457.
- Hudgson P, Pearce JM & Yeates WK 1967 Renal artery stenosis with hypertension and high haematocrit. *Br.Med.J.* **1** 18-21.
- Ihle JN & Kerr IM 1995 Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* **11** 69-74.
- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K & Silvennoinen O 1995 Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu.Rev.Immunol.* **13:369-98.** 369-398.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS & Kaelin WG, Jr. 2001 HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* **292** 464-468.
- James P 1997 Of genomes and proteomes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **231** 1-6.
- Jayne DW & Blackman KE 1985 Culture media for propagation of mammalian cells, viruses, and other biologicals. *Adv.Biotechnol.Processes.* **5:1-30.** 1-30.
- Jelkmann W 1992 Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* **72** 449-489.
- Jelkmann W & Bauer C 1981 Demonstration of high levels of erythropoietin in rat kidneys following hypoxic hypoxia. *Pflugers Arch.* **392** 34-39.
- Jelkmann W & Metzen E 1996 Erythropoietin in the control of red cell production. *Ann.Anat.* **178** 391-403.
- Jelkmann W & Wagner K 2004 Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann.Hematol.* **83** 673-686.
- Jensen G, Bjorck S, Nielsen OJ, Volkmann R & Aurell M 1992 Diagnostic use of renal vein erythropoietin measurements in patients with renal artery stenosis. *Nephrol.Dial.Transplant.* **7** 400-405.
- Jepson JH & Lowenstein L 1964 Effect of Prolaktin on erythropoiesis in the mouse. *Blood* **24** 726-738.
- Jin KL, Mao XO & Greenberg DA 2000a Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97** 10242-10247.

- Jin KL, Mao XO, Nagayama T, Goldsmith PC & Greenberg DA 2000b Induction of vascular endothelial growth factor receptors and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling by global cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience*. **100** 713-717.
- Johansson A, Olsson T, Carlberg B, Karlsson K & Fagerlund M 1997 Hypercortisolism after stroke--partly cytokine-mediated? *J.Neurol.Sci.* **147** 43-47.
- John M, Hoernig S, Doehner W, Okonko DD, Witt C & Anker SD 2005 Anemia and inflammation in COPD. *Chest*. **127** 825-829.
- John M, Lange A, Hoernig S, Witt C & Anker SD 2006 Prevalence of anemia in chronic obstructive pulmonary disease: comparison to other chronic diseases. *Int.J.Cardiol.* **111** 365-370.
- Jones SS, D'Andrea AD, Haines LL & Wong GG 1990 Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. *Blood*. **76** 31-35.
- Kang TH, Bae KH, Yu MJ, Kim WK, Hwang HR, Jung H, Lee PY, Kang S, Yoon TS, Park SG, Ryu SE & Lee SC 2007 Phosphoproteomic analysis of neuronal cell death by glutamate-induced oxidative stress. *Proteomics*. **7** 2624-2635.
- Kehrer JP 2000 The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. **149** 43-50.
- Khanal RC & Nemere I 2007 The ERp57/Grp58/1,25D3-MARRS receptor: multiple functional roles in diverse cell systems. *Curr.Med.Chem.* **14** 1087-1093.
- Kilic E, Kilic U, Wang Y, Bassetti CL, Marti HH & Hermann DM 2006 The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J.* **20** 1185-1187.
- Kinoshita H, Ohishi N, Kato M, Tokura S & Okazaki A 1992 Distribution of recombinant human erythropoietin following multiple intravenous administration and effects of age on the distribution in rats. *Arzneimittelforschung*. **42** 579-584.
- Klimova T & Chandel NS 2008 Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death.Differ.* **15** 660-666.
- Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG & Lodish HF 1995 Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*. **80** 729-738.
- Klose J 1975 Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*. **26** 231-243.
- Klose J & Kobalz U 1995 Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*. **16** 1034-1059.
- Kochling J, Curtin PT & Madan A 1998 Regulation of human erythropoietin gene induction by upstream flanking sequences in transgenic mice. *Br.J.Haematol.* **103** 960-968.
- Koehne P, Hochhaus F, Felderhoff-Mueser U, Ring-Mrozik E, Obladen M & Buhner C 2002 Vascular endothelial growth factor and erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus. *Childs Nerv.Syst.* **18** 137-141.
- Kokot F, Wiecek A, Grzeszczak W, Klepacka J, Klin M & Lao M 1989 Endocrine abnormalities in patients with endstage renal failure. *Adv.Exp.Med.Biol.* **260:61-7**. 61-67.

- Kokot F, Wiecek A, Schmidt-Gayk H, Marcinkowski W, Nieszporek T, Rudka R & Trembecki J 1992 Influence of long-term erythropoietin therapy on endocrine abnormalities in haemodialyzed patients. *Przegl.Lek.* **49** 43-49.
- Kourounis GS, Michail GD & Adonakis GL 2005 Managing anemia in gynecologic surgery with postoperative administration of recombinant human epoetins. *Clin.Exp.Obstet.Gynecol.* **32** 68-70.
- Koury MJ 2005 Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hematopoietic hormone. *Exp.Hematol.* **33** 1263-1270.
- Koury MJ & Bondurant MC 1992 The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur.J.Biochem.* **210** 649-663.
- Koury MJ, Bondurant MC, Graber SE & Sawyer ST 1988a Erythropoietin messenger RNA levels in developing mice and transfer of 125I-erythropoietin by the placenta. *J.Clin.Invest.* **82** 154-159.
- Koury MJ & Ponka P 2004 New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu.Rev.Nutr.* **24:105-31**. 105-131.
- Koury ST, Bondurant MC & Koury MJ 1988b Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* **71** 524-527.
- Krantz SB 1991 Erythropoietin. *Blood.* **77** 419-434.
- Kronsbein HC, Jastorff AM, Maccarrone G, Stalla G, Wurst W, Holsboer F, Turck CW & Deussing JM 2008 CRHR1-dependent effects on protein expression and posttranslational modification in AtT-20 cells. *Mol.Cell Endocrinol.* **292** 1-10.
- Krugers HJ, Knollema S, Kemper RH, Ter Horst GJ & Korf J 1995 Down-regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis reduces brain damage and number of seizures following hypoxia/ischaemia in rats. *Brain Res.* **690** 41-47.
- Krupenko SA 2009 FDH: an aldehyde dehydrogenase fusion enzyme in folate metabolism. *Chem.Biol.Interact.* **178** 84-93.
- Kulkarni AC, Kuppusamy P & Parinandi N 2007 Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy. *Antioxid.Redox.Signal.* **9** 1717-1730.
- Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Tambourin P & Varet B 1991 Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion. *Am.J.Kidney Dis.* **18** 14-19.
- Ladas SD, Polymeros D, Pagonis T, Triantafyllou K, Paspatis G, Hatziaargiriou M & Raptis SA 2004 Does recombinant human erythropoietin accelerate correction of post-ulcer-bleeding anaemia? A pilot study. *World J.Gastroenterol.* **10** 586-589.
- Lee MY, Jung SC, Lee JH & Han HJ 2008 Estradiol-17beta protects against hypoxia-induced hepatocyte injury through ER-mediated upregulation of Bcl-2 as well as ER-independent antioxidant effects. *Cell Res.* **18** 491-499.
- Li G, Yang Q, Krishnan S, Alexander EA, Borkan SC & Schwartz JH 2006 A novel cellular survival factor--the B2 subunit of vacuolar H+-ATPase inhibits apoptosis. *Cell Death.Differ.* **13** 2109-2117.
- Li MD, Kane JK, Matta SG, Blaner WS & Sharp BM 2000 Nicotine enhances the biosynthesis and secretion of transthyretin from the choroid plexus in rats: implications for beta-amyloid formation. *J.Neurosci.* **20** 1318-1323.

- Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z & . 1985 Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **82** 7580-7584.
- Luke RG, Kennedy AC, Stirling WB & McDonald GA 1965 Renal artery stenosis, hypertension and polycythaemia. *Br.Med.J.* **1** 164-166.
- Lukowsky WA & Painter RH 1972 Studies on the role of sialic acid in the physical and biological properties of erythropoietin. *Can.J.Biochem.* **50** 909-917.
- Lutz MB, Rossner S 2007 Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum. *Immunobiol.* **212** 855-862.
- Ma Y, Freitag P, Zhou J, Brune B, Frede S & Fandrey J 2004 Thyroid hormone induces erythropoietin gene expression through augmented accumulation of hypoxia-inducible factor-1. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **287** R600-R607.
- MacKenzie DS, Jones RA & Miller TC 2009 Thyrotropin in teleost fish. *Gen.Comp Endocrinol.* **161** 83-89.
- Madan A, Lin C, Hatch SL & Curtin PT 1995 Regulated basal, inducible, and tissue-specific human erythropoietin gene expression in transgenic mice requires multiple cis DNA sequences. *Blood.* **85** 2735-2741.
- Maganty K & Smith RL 2008 Cameron lesions: unusual cause of gastrointestinal bleeding and anemia. *Digestion.* **77** 214-217.
- Marklund N, Peltonen M, Nilsson TK & Olsson T 2004 Low and high circulating cortisol levels predict mortality and cognitive dysfunction early after stroke. *J.Intern.Med.* **256** 15-21.
- Marti HH 2002 Vascular endothelial growth factor. *Adv.Exp.Med.Biol.* **513:375-94.** 375-394.
- Marti HH 2004 Erythropoietin and the hypoxic brain. *J.Exp.Biol.* **207** 3233-3242.
- Marti HH 2005 Angiogenesis--a self-adapting principle in hypoxia. *EXS.* 163-180.
- Marti HH, Bernaudin M, Petit E & Bauer C 2000 Neuroprotection and Angiogenesis: Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia. *News Physiol Sci.* **15** 225-229.
- Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O & Bauer C 1997 Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int.* **51** 416-418.
- Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C & Gassmann M 1996 Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur.J.Neurosci.* **8** 666-676.
- Masuda S, Nagao M & Sasaki R 1999 Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int.J.Hematol.* **70** 1-6.
- Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M & Sasaki R 1994 A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J.Biol.Chem.* **269** 19488-19493.
- Maxwell PH, Pugh CW & Ratcliffe PJ 1993 Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** 2423-2427.

- McAdoo DJ & Wu P 2008 Microdialysis in central nervous system disorders and their treatment. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **90** 282-296.
- McLafferty FW, Stauffer DA, Loh SY & Wesdemiotis C 1999 Unknown identification using reference mass spectra. Quality evaluation of databases. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* **10** 1229-1240.
- Melkun E, Pilione M & Paulson RF 2002 A naturally occurring point substitution in Cdc25A, and not Fv2/Stk, is associated with altered cell-cycle status of early erythroid progenitor cells. *Blood.* **100** 3804-3811.
- Meloni BP, Tilbrook PA, Boulos S, Arthur PG & Knuckey NW 2006 Erythropoietin preconditioning in neuronal cultures: signaling, protection from in vitro ischemia, and proteomic analysis. *J.Neurosci.Res.* **83** 584-593.
- Milledge JS & Cotes PM 1985 Serum erythropoietin in humans at high altitude and its relation to plasma renin. *J.Appl.Physiol.* **59** 360-364.
- Miller AL 2008 The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression. *Altern.Med.Rev.* **13** 216-226.
- Mirand EA, Prentice TC & Grace JT 1964 Ability of tamarins to produce and respond to erythropoietin. *Nature.* **204:1064-6.** 1064-1066.
- Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW, Takeuchi M, Kobata A & Takasaki S 1995 Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood.* **86** 4097-4104.
- Miura O, Nakamura N, Quelle FW, Witthuhn BA, Ihle JN & Aoki N 1994 Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood.* **84** 1501-1507.
- Moestrup SK 2006 New insights into carrier binding and epithelial uptake of the erythropoietic nutrients cobalamin and folate. *Curr.Opin.Hematol.* **13** 119-123.
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y & Sasaki R 1997 Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience.* **76** 105-116.
- Moritz KM, Lim GB & Wintour EM 1997 Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am.J.Physiol* **273** R1829-R1844.
- Murphy GP, Mirand EA, Takita H, Schoonees R & Groenewald JH 1971 The effects of hypoxia and ischemia on erythropoietin and renin release in dogs. *Invest Urol.* **8** 521-525.
- Narhi LO, Arakawa T, Aoki KH, Elmore R, Rohde MF, Boone T & Strickland TW 1991 The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *J.Biol.Chem.* **266** 23022-23026.
- Nelson ML & Cons JM 1975 Pituitary hormones and growth retardation in rats raised at simulated high altitude (3800m). *Environ.Physiol Biochem.* **5** 273-282.
- Ng EL & Tang BL 2008 Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Res.Rev.* **58** 236-246.
- Nikinmaa M & Rees BB 2005 Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol.* **288** R1079-R1090.
- Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R & Jia Y 2007 Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **64** 159-171.

- O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ & Pugh CW 1999 Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J.Biol.Chem.* **274** 2060-2071.
- Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, Suzuki Y, Ishikawa M & Ohta S 2008 Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity. *J.Neurosci.* **28** 6239-6249.
- Otto T & Fandrey J 2008 Thyroid hormone induces hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression through thyroid hormone receptor beta/retinoid x receptor alpha-dependent activation of hepatic leukemia factor. *Endocrinology* **149** 2241-2250.
- Ozkan Y, Firat H, Simsek B, Torun M & Yardim-Akaydin S 2008 Circulating nitric oxide (NO), asymmetric dimethylarginine (ADMA), homocysteine, and oxidative status in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS). *Sleep Breath.* **12** 149-154.
- Pagel H, Jelkmann W & Weiss C 1988 A comparison of the effects of renal artery constriction and anemia on the production of erythropoietin. *Pflugers Arch.* **413** 62-66.
- Pagel H, Jelkmann W & Weiss C 1989 O₂-supply to the kidneys and the production of erythropoietin. *Respir. Physiol.* **77** 111-117.
- Pagel H, Jelkmann W & Weiss C 1991 Isolated serum-free perfused rat kidneys release immunoreactive erythropoietin in response to hypoxia. *Endocrinology* **128** 2633-2638.
- Palha JA 2002 Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited. *Clin.Chem.Lab Med.* **40** 1292-1300.
- Palha JA, Nissanov J, Fernandes R, Sousa JC, Bertrand L, Dratman MB, Morreale dE, Gottesman M & Saraiva MJ 2002 Thyroid hormone distribution in the mouse brain: the role of transthyretin. *Neuroscience.* **113** 837-847.
- Paranjape S 2004 Goat serum: an alternative to fetal bovine serum in biomedical research. *Indian J.Exp.Biol.* **42** 26-35.
- Parchment RE & Natarajan K 1992 A free-radical hypothesis for the instability and evolution of genotype and phenotype in vitro. *Cytotechnology.* **10** 93-124.
- Park SH, Kim KW, Lee YS, Baek JH, Kim MS, Lee YM, Lee MS & Kim YJ 2001 Hypoglycemia-induced VEGF expression is mediated by intracellular Ca²⁺ and protein kinase C signaling pathway in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Int.J.Mol.Med.* **7** 91-96.
- Pavlovic-Kentera V, Hall DP, Bragassa C & Lange RD 1965 Unilateral renal hypoxia and production of erythropoietin. *J.Lab Clin.Med.* **65:577-88.** 577-588.
- Plant TM 2008 Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: key advances over the last two decades. *J.Neuroendocrinol.* **20** 719-726.
- Powell JS, Berkner KL, Lebo RV & Adamson JW 1986 Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **83** 6465-6469.
- Prokhorchuk AV & Ruzov AS 2000 [Genome methylation and its role in functioning of the eukaryotic organism]. *Genetika.* **36** 1475-1486.
- Puskas LG, Kitajka K, Nyakas C, Barcelo-Coblijn G & Farkas T 2003 Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100** 1580-1585.

- Quan L, Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Zhao D, Li DR, Ogawa M & Maeda H 2008 Postmortem serum erythropoietin levels in establishing the cause of death and survival time at medicolegal autopsy. *Int.J.Legal Med.* **122** 481-487.
- Quintela T, Goncalves I, Baltazar G, Alves CH, Saraiva MJ & Santos CR 2009 17beta-Estradiol Induces Transthyretin Expression in Murine Choroid Plexus via an Oestrogen Receptor Dependent Pathway. *Cell Mol.Neurobiol.*
- Rabie T & Marti HH 2008 Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology.(Bethesda).* **23:263-74.** 263-274.
- Raff H, Jacobson L & Cullinan WE 2007 Augmented hypothalamic corticotrophin-releasing hormone mRNA and corticosterone responses to stress in adult rats exposed to perinatal hypoxia. *J.Neuroendocrinol.* **19** 907-912.
- Ramchandani S, Bigey P & Szyf M 1998 Genomic structure of the human DNA methyltransferase gene. *Biol.Chem.* **379** 535-540.
- Ramirez G, Bittle PA, Rabb HA, Ballester O & Bercu BB 1995 Effect of haemoglobin and endogenous erythropoietin on hypothalamic-pituitary thyroidal and gonadal secretion: an analysis of anaemic (high EPO) and polycythaemic (low EPO) patients. *Clin.Endocrinol.(Oxf).* **43** 167-174.
- Ran R, Xu H, Lu A, Bernaudin M & Sharp FR 2005 Hypoxia preconditioning in the brain. *Dev.Neurosci.* **27** 87-92.
- Recny MA, Scoble HA & Kim Y 1987 Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J.Biol.Chem.* **262** 17156-17163.
- Redeen S, Ryberg A, Petersson F, Eriksson O, Nagga K & Borch K 2009 Homocysteine Levels in Chronic Gastritis and Other Conditions: Relations to Incident Cardiovascular Disease and Dementia. *Dig.Dis.Sci.*
- Rich IN 1991 The site of erythropoietin production: localization of erythropoietin mRNA by radioactive in situ hybridization. *Blood.* **78** 2469-2471.
- Richalet JP, Souberbielle JC, Antezana AM, Dechaux M, Le Trong JL, Bienvenu A, Daniel F, Blanchot C & Zittoun J 1994 Control of erythropoiesis in humans during prolonged exposure to the altitude of 6,542 m. *Am.J.Physiol* **266** R756-R764.
- Richmond TD, Chohan M & Barber DL 2005 Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol.* **15** 146-155.
- Righetti M 2008 [Folate metabolism dysfunction]. *G.Ital.Nefrol.* **25** 32-41.
- Rogatsky GG, Sonn J, Kamenir Y, Zarchin N & Mayevsky A 2003 Relationship between intracranial pressure and cortical spreading depression following fluid percussion brain injury in rats. *J.Neurotrauma* **20** 1315-1325.
- Rubin H 1997 Cell aging in vivo and in vitro. *Mech.Ageing Dev.* **98** 1-35.
- Rubin H 2002 The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat.Biotechnol.* **20** 675-681.
- Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U & Meisel A 2002 Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J.Neurosci.* **22** 10291-10301.

- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M & Sasaki R 1998 In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** 4635-4640.
- Sandner P, Wolf K, Bergmaier U, Gess B & Kurtz A 1997 Induction of VEGF and VEGF receptor gene expression by hypoxia: divergent regulation in vivo and in vitro. *Kidney Int.* **51** 448-453.
- Santos CR, Anjos L & Power DM 2002 Transthyretin in fish: state of the art. *Clin.Chem.Lab Med.* **40** 1244-1249.
- Savourey G, Garcia N, Caravel JP, Gharib C, Pouzeratte N, Martin S & Bittel J 1998 Pre-adaptation, adaptation and de-adaptation to high altitude in humans: hormonal and biochemical changes at sea level. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol.* **77** 37-43.
- Schafer AI 2006 Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* **107** 4214-4222.
- Schoch HJ, Fischer S & Marti HH 2002 Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain.* **125** 2549-2557.
- Schreiber G 2002 The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis. *J.Endocrinol.* **175** 61-73.
- Schurek HJ 1988 [Kidney medullary hypoxia: a key to understanding acute renal failure?]. *Klin.Wochenschr.* **66** 828-835.
- Schurek HJ & Kriz W 1985 Morphologic and functional evidence for oxygen deficiency in the isolated perfused rat kidney. *Lab Invest.* **53** 145-155.
- Schuster SJ, Wilson JH, Erslev AJ & Caro J 1987 Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood.* **70** 316-318.
- Segev N 2001 Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci.STKE.* **2001** RE11.
- Semenza GL 1994 Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* **8** 863-884.
- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C & Yu A 1997 Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.* **51** 553-555.
- Shander A, Alalawi R, Seeber P & Lui J 2004 Use of a hemoglobin-based oxygen carrier in the treatment of severe anemia. *Obstet.Gynecol.* **103** 1096-1099.
- Sharpe MA, Robb SJ & Clark JB 2003 Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J.Neurochem.* **87** 386-394.
- Shetty PS 1999 Adaptation to low energy intakes: the responses and limits to low intakes in infants, children and adults. *Eur.J.Clin.Nutr.* **53 Suppl 1:S14-33.** S14-S33.
- Silverberg DS, Wexler D, Blum M, Wollman Y, Schwartz D, Sheps D, Keren G & Iaina A 2004 The interaction between heart failure, renal failure and anemia - the cardio-renal anemia syndrome. *Blood Purif.* **22** 277-284.
- Silverberg DS, Wexler D, Iaina A & Schwartz D 2006 The interaction between heart failure and other heart diseases, renal failure, and anemia. *Semin.Nephrol.* **26** 296-306.

Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H & Ghezzi P 2001a Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 4044-4049.

Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W & Ehrenreich H 2001b Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol.(Berl)* **101** 271-276.

Smith TG, Robbins PA & Ratcliffe PJ 2008 The human side of hypoxia-inducible factor. *Br.J.Haematol.* **141** 325-334.

Smulders YM & Stehouwer CD 2005 Folate metabolism and cardiovascular disease. *Semin.Vasc.Med.* **5** 87-97.

Socolovsky M, Fallon AE & Lodish HF 1998 The Prolaktin receptor rescues EpoR^{-/-} erythroid progenitors and replaces EpoR in a synergistic interaction with c-kit. *Blood.* **92** 1491-1496.

Sofer Y, Harel L, Sharkia M, Amir J, Schoenfeld T & Straussberg R 2007 Neurological manifestations of folate transport defect: case report and review of the literature. *J.Child Neurol.* **22** 783-786.

Spivak JL 2002 The optimal management of polycythaemia vera. *Br.J.Haematol.* **116** 243-254.

Steinberg MH 2008 Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal.* **8:1295-324.** 1295-1324.

Stenmark H & Olkkonen VM 2001 The Rab GTPase family. *Genome Biol.* **2** Review S3007.

Stockmann C & Fandrey J 2006 Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **33** 968-979.

Strijbos PJ, Relton JK & Rothwell NJ 1994 Corticotrophin-releasing factor antagonist inhibits neuronal damage induced by focal cerebral ischaemia or activation of NMDA receptors in the rat brain. *Brain Res.* **656** 405-408.

Struder HK, Hollmann W, Weicker H, Schiffer T & Weber K 1999 Blood oxygen partial pressure affects plasma Prolaktin concentration in humans. *Acta Physiol Scand.* **165** 265-269.

Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, Ullrich V, Mulsch A, Schulz E, Keaney JF, Jr., Stamler JS & Munzel T 2004 Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J.Clin.Invest.* **113** 482-489.

Takaku F, Hirashima K & Nakao K 1962 Studies on the mechanism of erythropoietin production. I. Effect of unilateral constriction of the renal artery. *J.Lab Clin.Med.* **59:815-20.** 815-820.

Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, Kubota M, Wada M, Shimizu R, Hoshi S, Kozutsumi H, Takasaki S & Kobata A 1989 Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86** 7819-7822.

Takeuchi M, Takasaki S, Shimada M & Kobata A 1990 Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* **265** 12127-12130.

Tan CC, Eckardt KU, Firth JD & Ratcliffe PJ 1992 Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am.J.Physiol* **263** F474-F481.

- Taneichi K, Konno T, Shibaki H, Kubota K, Kajigaya S & Miura Y 1986 [Secondary erythrocytosis due to left renal artery stenosis--with special reference to the mechanism of elevated erythropoietin production]. *Rinsho Ketsueki*. **27** 526-529.
- Tang YP, Haslam SZ, Conrad SE & Sisk CL 2004 Estrogen increases brain expression of the mRNA encoding transthyretin, an amyloid beta scavenger protein. *J.Alzheimers.Dis*. **6** 413-420.
- Tarazi RC, Frohlich ED, Dustan HP, Gifford RW, Jr. & Page IH 1966 Hypertension and high hematocrit. Another clue to renal arterial disease. *Am.J.Cardiol*. **18** 855-858.
- Tcherkezian J & Lamarche-Vane N 2007 Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol.Cell*. **99** 67-86.
- Thomasson HR, Edenberg HJ, Crabb DW, Mai XL, Jerome RE, Li TK, Wang SP, Lin YT, Lu RB & Yin SJ 1991 Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *Am.J.Hum.Genet*. **48** 677-681.
- Tilbrook PA & Klinken SP 1999 The erythropoietin receptor. *Int.J.Biochem.Cell Biol*. **31** 1001-1005.
- Tolentino K & Friedman JF 2007 An update on anemia in less developed countries. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. **77** 44-51.
- Tringali G, Pozzoli G, Lisi L & Navarra P 2007 Erythropoietin inhibits basal and stimulated corticotropin-releasing hormone release from the rat hypothalamus via a nontranscriptional mechanism. *Endocrinology*. **148** 4711-4715.
- Tsuboi T 2009 Molecular mechanism of attachment process of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells. *Neurosci.Res*. **63** 83-88.
- Udupa KB, Crabtree HM & Lipschitz DA 1986 In vitro culture of proerythroblasts: characterization of proliferative response to erythropoietin and steroids. *Br.J.Haematol*. **62** 705-714.
- van der Vlies, Pap EH, Post JA, Celis JE & Wirtz KW 2002 Endoplasmic reticulum resident proteins of normal human dermal fibroblasts are the major targets for oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Biochem.J*. **366** 825-830.
- Varela V, Houssay AB & Lopardo MI 1982 Modifications of the pituitary-thyroid axis induced by hypobaric hypoxia. *Acta Physiol Lat.Am*. **32** 53-58.
- Vignot S & Spano JP 2005 [Anemia and colorectal cancer]. *Bull.Cancer*. **92** 432-438.
- Virani SA, Khosla A & Levin A 2008 Chronic kidney disease, heart failure and anemia. *Can.J.Cardiol*. **24 Suppl B:22B-4B**. 22B-24B.
- von Wussow U, Klaus J & Pagel H 2005 Is the renal production of erythropoietin controlled by the brain stem? *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **289** E82-E86.
- Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D & Geibel JP 2004 Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev*. **84** 1263-1314.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA & Semenza GL 1995 Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92** 5510-5514.
- Wardman P & Candeias LP 1996 Fenton chemistry: an introduction. *Radiat.Res*. **145** 523-531.
- Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M & Eckardt KU 2004 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-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J.* **18** 1462-1464.

Wasley LC, Timony G, Murtha P, Stoudemire J, Dorner AJ, Caro J, Krieger M & Kaufman RJ 1991 The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. *Blood.* **77** 2624-2632.

Watowich SS, Yoshimura A, Longmore GD, Hilton DJ, Yoshimura Y & Lodish HF 1992 Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89** 2140-2144.

Watson CJ, Venton BJ & Kennedy RT 2006 In vivo measurements of neurotransmitters by microdialysis sampling. *Anal.Chem.* **78** 1391-1399.

Weidemann A & Johnson RS 2009 Nonrenal regulation of EPO synthesis. *Kidney Int.*

Weidemann A, Kerdiles YM, Knaup KX, Rafie CA, Boutin AT, Stockmann C, Takeda N, Scadeng M, Shih AY, Haase VH, Simon MC, Kleinfeld D & Johnson RS 2009 The glial cell response is an essential component of hypoxia-induced erythropoiesis in mice. *J. Clin. Invest.* **119** 3373-3383.

Weishaupt JH, Rohde G, Polking E, Siren AL, Ehrenreich H & Bahr M 2004 Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* **45** 1514-1522.

Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu PX, Nakata K, Ma YJ, Hata R & Sakanaka M 2002 Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J.Neurosci.Res.* **67** 795-803.

Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Bauer C & Gassmann M 1995 Hypoxia, a novel inducer of acute phase gene expression in a human hepatoma cell line. *J.Biol.Chem.* **270** 27865-27870.

Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH & Eckardt KU 2003 Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* **17** 271-273.

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ & Maxwell PH 1998 Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood.* **92** 2260-2268.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF & Williams KL 1996 Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol.Genet.Eng Rev.* **13:19-50.** 19-50.

Winnicki M, Shamsuzzaman A, Lanfranchi P, Accurso V, Olson E, Davison D & Somers VK 2004 Erythropoietin and obstructive sleep apnea. *Am.J.Hypertens.* **17** 783-786.

Wiseman H & Halliwell B 1996 Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem.J.* **313** 17-29.

Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O & Ihle JN 1993 JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell.* **74** 227-236.

Wolffe AP & Tata JR 1984 Primary culture, cellular stress and differentiated function. *FEBS Lett.* **176** 8-15.

Woody MA, Welniak LA, Sun R, Tian ZG, Henry M, Richards S, Raziuddin A, Longo DL & Murphy WJ 1999 Prolaktin exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. *Exp.Hematol.* **27** 811-816.

Wu H, Liu X, Jaenisch R & Lodish HF 1995 Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83** 59-67.

Xu JF, Chen XQ & Du JZ 2006 CRH receptor type 1 mediates continual hypoxia-induced changes of immunoreactive Prolaktin and Prolaktin mRNA expression in rat pituitary. *Horm.Behav.* **49** 181-189.

Yeo EJ, Cho YS, Kim MS & Park JW 2008 Contribution of HIF-1alpha or HIF-2alpha to erythropoietin expression: in vivo evidence based on chromatin immunoprecipitation. *Ann.Hematol.* **87** 11-17.

Yoo JY, Won YJ, Lee JH, Kim JU, Sung IY, Hwang SJ, Kim MJ & Hong HN 2009 Neuroprotective effects of erythropoietin posttreatment against kainate-induced excitotoxicity in mixed spinal cultures. *J.Neurosci.Res.* **87** 150-163.

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

Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI & Wasserman LR 1977 Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J.Lab Clin.Med.* **89** 640-644.

Zhang YS & Du JZ 2000 The response of growth hormone and Prolaktin of rats to hypoxia. *Neurosci.Lett.* **279** 137-140.

Zilberman M, Silverberg DS, Bits I, Steinbruch S, Wexler D, Sheps D, Schwartz D & Oksenberg A 2007 Improvement of anemia with erythropoietin and intravenous iron reduces sleep-related breathing disorders and improves daytime sleepiness in anemic patients with congestive heart failure. *Am.Heart J.* **154** 870-876.

Zivny J, Kolc J, Malek P & Neuwirt J 1972 Renal ischaemia, hypoxia and erythropoietin production. *Scand.J.Haematol.* **9** 470-476.

8. Anhang

8.1 Verwendete Substanzen und Test-Kits

Substanz	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma- Aldrich, Steinheim
CHAPS	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma- Aldrich, Steinheim
DMEM	Gibco, Karlsruhe
dNTP	peqLab, Erlangen
donkey- anti- goat- HRP, sc- 2020	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
DTT	Sigma- Aldrich, Steinheim
ECL- Spray	Amersham Bioscience, Braunschweig
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
ELISA	Medac, Hamburg
ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Epo-goat, N- 19	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
FKS	Gibco, Karlsruhe
Gentamycin	Sigma- Aldrich, Steinheim
Glycerol	Applied Biosystems, Darmstadt
Glycine	Sigma-Aldrich, Steinheim
goat- anti- mouse –HRP	DAKO, Carpinteria, CA, USA
HAES	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Heparin, Liquimin N25000	Roche, Grenzbach, Whylen
Iodacetamid	Amersham Bioscience, Braunschweig
Isotonische NaCl- Lösung	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Nucleic Acid Purification Elution Solution	Applied Biosystems, Darmstadt

Nucleic Acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems, Darmstadt
Oligo dT	Roche, Penzberg
Penicillin	Sigma- Aldrich, Steinheim
Pharmalyte	BioRad Laboratories, München
Phosphorsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitormix	Roche, Penzberg
Proteinase K	Fluka (Sigma-Aldrich), Steinheim
Proteo Silver Plus	Sigma- Aldrich, Steinheim
RPMI	Gibco, Karlsruhe
RT Puffer	Roche, Penzberg
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Spez. Primer	MWG, Ebersberg
Streptomycin	Sigma- Aldrich, Steinheim
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
TEMED	Sigma- Aldrich, Steinheim
Thiourea	GE Healthcare Europe, Freiburg
Trapanal	Altana Pharma, Konstanz
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Urea	Sigma-Aldrich, Steinheim
α -Tubulin Mouse, AA12	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

8.2 Verwendete Materialien und Geräte

Materialien, Geräte	Hersteller
ABI 6100 Prep Station	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI Prism 7000 Real Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Beatmungspumpe	Ugo Basile, Comerio, Italien
Blutgasanalyser	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Brutschränke	Hereaus, Hanau
chirurgische Nahtmaterial (Prolene®)	Ethicon, Hamburg
CMA Mikrodialyse- Katheter	Axel Semrau, Sprockhövel
CMA Mikrodialyse- Pumpe	Axel Semrau, Sprockhövel
FEP Schläuche	Axel Semrau, Sprockhövel
Führungskanülen	Axel Semrau, Sprockhövel
Gelelektrophoresekammern	BioRad Laboratories, München
Gel Drying Kit	Promega, Mannheim
IPG Blue Streifen	Serva, Heidelberg
Multiphor	Amersham Bioscience, Braunschweig
Nitrocellulosemembran	Amersham Bioscience, Braunschweig
Nucleic Acid Collection Tray	Applied Biosystems, Darmstadt
Phoretics 2D, Nonlinear Dynamics	biostep GmbH, Jahnsdorf
Polyethylenkatheter PE-50	Schubert, München
Scanner CanoScan 8400F	Cannon, Hanau
Sterilbänke	Hereaus, Hanau
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tissue Prefilter Tray	Applied Biosystems, Darmstadt
Ultra Turrax T25	IKA Werke GmbH, Stauffen
Ultraschall Flusssonde	Transonic Systems, Ithaca, NY, USA
Zeba Desalting Spins	Pierce, Rockford, IL, USA

8.3 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
A. dest	Aqua destillata
ACTH	Adreno-Corticotropes-Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
Aldh2	Aldehyd- Dehydrogenase 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
BCA	Bicinchoninic acid
BFU	Burst Forming Unit
BSA	Bovine Serum Albumin
CDC25A	Cell Division Cycle 25 homolog A
cDNA	complementäre DNA
CFU	Colony Forming Unit
CFU-GEMM	Colony forming Unit – Granulozyten/Monozyten/Megakaryozyten/Erythrozyten
CFU-GM	Colony Forming Unit –Granulozyten/Monozyten
CFU-HL	Colony Forming Unit – Hämatopoetische/Lymphatische Vorläuferzellen
CFU-MEG	Colony Forming Unit -Megakaryozyten
CHAPS	(3-[(Cholaminopropyl) dimethyl-ammonio] -1-propansulfonat)
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CRF/CRH	Corticotropin Releasing Factor/Hormon
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamin-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPAS1	Endotheliales PAS domain Protein 1
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FKS	Fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Growth Hormon
HAES	Hydroxyethylstärke
HBGF	Heparin Binding Growth Factor
HIF	Hypoxie Induzierbarer Faktor
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HRE	Hypoxie Responsives Element
hrEPO	humanes rekombinantes Erythropoietin
i.v.	intra venös
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IL	Interleukin
iNOS	induzierbaren NO-Synthase
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IU	Internationale Unit
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
N.	Nervus
N ₂	molekularer Stickstoff
NaCl	Kochsalz
NRLE	leberspezifisches negatives Regulationselement
NS	Nervensystem
O ₂	molekularer Sauerstoff
ODD	sauerstoffabhängige Degradations Domäne
OSAHS	Obstructive Sleep Apnoea/Hypopnoea Syndrome
PBS	Phosphate Buffered Saline
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PDIA3	Protein Disulfide Isomerase Associated 3
PgK1	Phosphoglyceratkinase 1
PI	isolelektrischer Punkt
pNPP	p- Nitrophenylphosphat
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pVHL	von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein
RBP	Retinol Binding Protein

Rho GAP	Ras homologe GTPase aktivierende Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGB	Thyroxin Binding Protein
Tris	Tris - (hydroxymethyl) -aminomethan
TSH	Thyreotropin
TTR	Transthyretin
U	Unit
UPF	Uncharacterized Protein Family
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	zentrales Nervensystem

8.4 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb.1: Schematische Darstellung der Hämatopoiese	5
Abb.2: Schematische Darstellung der Erythropoiese	6
Abb.3: Regelkreis der Erythropoiese	8
Abb.4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	18
Abb.5: Darstellung des Sinus sagittalis superior	20
Abb.6: Dialysekatheter CMA 12	22
Abb.7: Proteinnachweis im Western Blot mittels indirektem Immuno-Blotting	39
Abb.8: Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes im venösen Blut des Sinus sagittalis superior	40
Abb.9: Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)	41
Abb.10: Messung der Herzfrequenz während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)	42
Abb.11: Arterieller pO_2 während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)	43
Abb.12: Arterieller pCO_2 während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)	43
Abb.13: Messung des pH-Wertes während und nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)	44
Abb.14: Renaler Blutfluss (RBF) unter Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)	45
Abb.15: Erythropoietin-Konzentration im Plasma von HX-Ratten nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP)	46
Abb.16: Erythropoietin-Konzentration im Plasma nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder Induktion einer Anämie.	47
Abb.17: Erythropoietin-Gen Induktion nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder der Erzeugung einer Anämie	48
Abb. 18: Erythropoietin-Genexpression nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder nach Induktion einer Anämie in Cortex und Cerebellum	49

Abb.20: Erythropoietin-Genexpression in der Hypophyse nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder nach Induktion einer Anämie	52
Abb. 21: Erythropoietin-Genexpression in der Leber nach Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP) oder nach Induktion einer Anämie	53
Abb. 22: Erythropoietin Western Blot der Leberhomogenate	54
Tab. 1: Zusammensetzung der Proben für Versuche in der Zellkultur	55
Abb. 23: Erythropoietin-Genexpression in HepG2–Zellen nach Inkubation mit Mikrodialysaten aus dem Bereich der Hypophyse	55
Abb. 24: Erythropoietin-Konzentrationen im Medium nach Inkubation mit hypophysären Mikrodialysaten	56
Abb. 25: Erythropoietin-Genexpression in COS7-Zellen nach Inkubation mit hypophysären Mikrodialysaten	58
Abb. 26: Unterschiede im hypophysären Proteom nach Induktion einer cerebralen Hypoxie oder Anämie	59
Abb. 27: Vergleichsdarstellung der gemeinsam regulierten Proteinspots aller Gele	61
Abb. 28: Vergleichsdarstellung der gemeinsam regulierten und in der MS ausgewerteten Proteine	62
Tab. 2: Proteine der Rattenhypophyse unterschiedlich reguliert nach cerebraler und anämischer Hypoxie im Vergleich zur Normoxie	64
Abb. 29: Regulation verschiedener Protein-spots nach Hypoxie im CSF von Ratten	66
Abb. 30: Darstellung der durch Hypoxie regulierten Proteinspots aus Mikrodialysaten des CSF	67
Tab. 3: Regulation von Proteinen im CSF nach einer Hypoxie	68
Tab. 4: Darstellung der Suchergebnisse aus TagIdent in der Datenbank UniprotK/SwissProt	69
Abb. 31: Hypothetischer Regelkreis der Erythropoiese	95

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ursula von Wussow, geb. Brockmann
Geburtsdaten: 03.11.1973 in Rio de Janeiro, Brasilien
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch



Schulbildung

1980 – 1984 Grundschole in Oberhausen Sterkrade
1984 – 1989 Gymnasium in Oberhausen Sterkrade
1989 – 1993 Gymnasium in Lübeck

Berufsausbildung

1993 – Januar 1996 Ausbildung zur Tierarzthelferin
Abschluss vor der Tierärztekammer Schleswig –
Holstein

Studium

Okt. 1996 – Nov.2002: Studium der Biologie an der
Christian – Albrechts – Universität zu Kiel
Nov. 2003 –2010 Dissertation am Institut für Physiologie der Universität zu
Lübeck zum Thema der extrarenalen Regulation der
renalen Erythropoietin Synthese

Berufliche Tätigkeiten

Januar – September 1996	Vollzeittätigkeit als Tierarzthelferin
Februar 2003- z.Z.	Dozentin für die Grone-Schule Lübeck im Bereich Erwachsenenbildung
November 2003- Ende 2008	wissenschaftliche Angestellte im Instiut für Physiologie der Universität zu Lübeck
April 2009- Ende 2009	freie wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des UKSH Campus Lübeck (AG: Endometriose)
August 2010-z.Z	Lehrkraft in einer Sozialpädagogischen Jugendhilfeeinrichtung

Fortbildungen

Januar 2001	EU Course: Design and Operation of Recirculation Systems, Wageningen University, Niederlande
September/Oktober 2008	Fortbildungsveranstaltung der Universität zu Lübeck für Projektleiter und Beauftragte für die biologische Sicherheit nach § 15 Gentechnik-sicherheitsverordnung

Schriften und Vortragsverzeichnis

I. Original-Beiträge

1. von Wussow U, Klaus J & Pagel H (2005) Is the renal production of erythropoietin controlled by the brain stem? *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **289** E82-E86.
2. Letkeman S, Agic A, von Wussow U, Hornung D (2009) Myome und Endometriose. *Gyn* (**14**)
3. Agic A, von Wussow U, Starzinski-Powotz, Diedrich K, Altevogt P, Hornung D (2010) Inhibition of cell proliferation, adhesion and invasion with an anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody (anti L1CAM-mAb) in an in vitro endometriosis model. *Fertil. Steril.* Feb 3 (epub ahead of print)
4. von Wussow U, Depping R, Pagel H (2010) Extrarenal Regulation of the renal synthesis of erythropoietin. *Horm. Metab. Res.* z.Dr..einger.

II. Kongressmitteilungen mit publiziertem Abstract

1. Von Wussow U, Klaus J, Frackowski U, Pagel H (2005) Extrarenal control of renal Epo production. 84. Jahrestagung der Dt. Physiolog. Ges., Göttingen (Abstract in : *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* 499 (Suppl 1): S112)
2. Von Wussow U, Klaus J, Frakowski U, Pagel H (2005) Does the brainstem control renal Epo synthesis? 34th Ann. Sci. Meeting of the Int. Soc. Exp. Hematol. (ISEH), Glasgow, Scotland (Abstract in: *Exp Hematol.* 33, 7 (Suppl.1): 88)
3. Von Wussow U, Frackowski U, Dürkop S, Pagel H (2006) Is a brainstem factor the regulator of the renal Epo synthesis? 85. Jahrestagung der Dt. Physiolog. Ges., München (Abstract in: *Acta Physiol.* 186 (Suppl. 1): 143)
4. Von Wussow U, Frackowski U, Dürkop S, Pagel H (2006) Evidence for the regulation of the renal erythropoietin synthesis by a brainstem factor. 7th Int. Lübeck conf. On the Pathophysiol and Pharmacol. of Erythropoietin, Lübeck (Abstract in: *Ann. Hematol.* 85: 657)

5. Von Wussow U, Frackowski U, Dürkop S, Pagel H (2007) Evidence for extrarenal regulation of the renal Erythropoietin-(Epo)-production. 86. Jahrestagung der Dt. Physiol. Ges., Hannover (Abstract in: *Acta Physiol* 189 (Suppl.653): 132)
6. Von Wussow U, Pagel H (2007) Indications for extrarenal regulation of the renal erythropoietin synthesis by brainstem factors. 36th Ann. Sci. Meeting of the Int. Soc. of Hematol. and Stem cells (ISEH), Hamburg (Abstract in: *Exp Hematol* 35, 9 (Suppl. 2): 107)
7. Von Wussow U, Pagel H (2008) Changes in the hypophyseal proteome during hypoxia point to extrarenal regulation of the renal erythropoietin production. 87. Jahrestagung der Dt. Physiol. Ges., Köln (Abstract in: *Acta Physiol* 192 (Suppl. 663): 14)

III. Kongressmitteilungen ohne publiziertem Abstract

1. Klaus J, von Wussow U, Frackowski U, Pagel H (2004) Regelung der renalen Synthese von Erythropoietin durch einen Hirnstammfaktor? 38. Atmungsphysiologische Arbeitstagung, Dabringhausen/Bochum
2. Von Wussow U, Klaus J, Frackowski U, Pagel H (2004) Zerebrale Kontrolle der renalen Synthese von Erythropoietin. 13. Westerländer Gespräch, Westerland /Sylt
3. Von Wussow U, Frackowski U, Pagel H (2005) Extrarenale Regelung der renalen Epo-Produktion. 10. Kongress der Physiologen des Ostseeraumes, Hamburg
4. Von Wussow U, Frackowski U, Pagel H (2006) Die renale Synthese von Erythropoietin (Epo) wird durch einen Hirnstamm-Faktor reguliert. 40. Atmungsphysiologische Arbeitstagung, Hannover
5. Von Wussow U, Frackowski U, Pagel H (2006) Regulation der renalen Erythropoietin-Synthese. 14. Westerländer Gespräch, Westerland/Sylt
6. Von Wussow U, Frackowski U, Pagel H (2007) Hinweise auf extrarenale Beeinflussung der renalen Epo-Synthese. 12. Kongress der Physiologen des Ostseeraumes, Salzac/Kiel

7. Von Wussow U, Pagel H (2007) Kontrolle der Blutbildung im Gehirn? 1. Doktorandentag, Lübeck
8. Von Wussow U, Pagel H (2008) Das beschwerliche Leben von Nöpfli, dem Erythrozyten. 2. Doktorandentag, Lübeck

Auszeichnungen

Preis des 2. Lübecker Doktorandentages am 04.Juni 2008 für das Poster „ Das beschwerliche Leben von Nöpfli, dem Erythrozyten“ im Sinne des „public understanding of science“

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Horst Pagel für die Überlassung eines so spannenden und herausfordernden Themas und für die intensive Einarbeitung und Betreuung in diesen Themenbereich sowie seine stete Ansprechbarkeit, auch auf nicht fachlicher Ebene. Die Möglichkeit der wissenschaftlichen Weiterbildung bei Vorträgen und internationalen Kongressen hat in großem Maß zu meiner beruflichen Weiterentwicklung beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann danke ich für die herzliche Aufnahme im Institut. Des Weiteren möchte ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen und die zur Verfügung gestellten Mittel und Materialien sowie seine kontinuierliche Unterstützung bedanken.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie danke ich für die freundliche Aufnahme, die positive Stimmung und die Hilfe bei allen nur erdenklichen Problemen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Urszula Frackowski für ihre großartige und unglaubliche fachkundige Betreuung in allen präparativen und versuchstechnischen Fragen bedanken. Sie und Frau Sylva Dürkop haben in umfangreichem Maße mit ihrer Motivation und ihrem Eifer und letztlich auch mit ihrer Freundschaft zum Erstellen dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Reinhard Depping danke ich für seine andauernde Hilfe und konstruktive Kritik sowie für die Einführung in die Welt der Molekularbiologie. Ohne seine Betreuung wäre ein Großteil dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen, danke!

Susann Schindler, Thomas Schillinger und Susann Mathie danke ich für die Hilfe bei diversen Laborproblemen und die gute Stimmung.

Ferdinand Greitschuss und Martin Gehrman möchte ich für ihre Unterstützung bei meinen „Computer- Problemen“ danken.

Meinen „Mitsitzerinnen“ Steffi und Amrei danke ich für ihre Anteilnahme und ihr Verständnis, ihre konstruktive Kritik, den vielen Spaß und die aus der Arbeit erwachsene Freundschaft.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern und meiner Familie, die mich immer unterstützt haben. Insbesondere bedanke ich mich bei meinem Mann Thomas für seine Ruhe und Geduld, die „Aufbauarbeit“ und seine bedingungslose Unterstützung, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §8 Abs.1, Nr.8 der Promotionsordnung der technisch – naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Lübeck zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Weiterhin erkläre ich gemäß §6 Abs.1, Nr. 9 – 10 der Promotionsordnung zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Lübeck, den