

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. J. Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

DIE WIRKUNG VON ERYTHROPOIETIN AUF DIE AXONALE
REGENERATION IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM DER RATTE IN
VITRO UND IN VIVO

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
NILS WARNEKE
aus Göttingen

Kiel 2009

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Lucius

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Deuschl

Tag der mündlichen Prüfung:

1. Juli 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

1. Juli 2009

gez.: Prof. Dr. Stick

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

o

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung	1
2. Material	
2.1 Biochemikalien	7
2.2 Gewebekulturmaterialeien	7
2.3 Antikörper	8
2.4 Zytokine	8
2.5 Primer für die EPO-Rezeptor-PCR	8
2.6 Enzyme	9
3. Methoden	
<u>3.1 Molekulargenetische Untersuchung der EPO-Rezeptor-Expression</u>	
3.1.1 RNA-Isolierung	10
3.1.2 Durchführung der Reversen-Transkriptions-Reaktion	11
3.1.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	12
3.1.4 DNA-Gelelektrophorese	12
<u>3.2 Immunhistochemie</u>	13
<u>3.3 Retinastanzen-Assay</u>	
3.3.1 Auswahl der Tiere	14
3.3.2 Präparation der Netzhautexplantate und Zellkultur	14
3.3.3 Zytokinapplikation	15
3.3.4 Aufarbeitung und Auswertung des Assays	15
<u>3.4 Läsion des Nervus opticus</u>	
3.4.1 Auswahl des Tiermodells	16
3.4.2 Operationstechnik	17
3.4.3 Perfusion und Aufarbeitung	19
3.4.4 Auswertung der axonalen Regeneration im Nervus opticus	19

<u>3.5 Berechnung, Auswahl und Statistiken</u>	20
4. Ergebnisse	
4.1 Die Wirkung von Erythropoietin auf die axonale Regeneration <i>in vitro</i>	21
4.2 Die Effekte des Anti-EPO-Rezeptor-Antikörpers und des T-Typ-Kalziumkanalblockers Ethosuximid auf die axonale Regeneration <i>in vitro</i>	22
4.3 Transkription des EPO-Rezeptors in der Retina der Ratte	23
4.4 Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation des EPO-Rezeptors in der Retina der Ratte	24
4.5 Einfluss von Erythropoietin auf die axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen der Ratte <i>in vivo</i>	25
5. Diskussion	
5.1 Einfluss von Erythropoietin auf die axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen <i>in vitro</i>	30
5.2 Nachweis des Erythropoietin-Rezeptors in der Retina und intrazelluläre Signalkaskade des Rezeptors	31
5.3 Einfluss von Erythropoietin auf die axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen <i>in vivo</i>	36
6. Zusammenfassung	39
7. Literaturverzeichnis	40
8. Danksagung	58
9. Lebenslauf	59

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AK	Antikörper
al.	alteri
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
bp	Basenpaare
BDNF	Brain derived growth factor
BFU	Burst forming unit
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytidin
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonucleotid-5-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietinrezeptor
Erk	extracellular signal related kinase, Proteinkinase
ESX	Ethosuximid
G	Guanosin
GAP	Growth associated protein
GCL	Ganglienzellschicht
GFAP	Glial fibrillar acidic protein
GTP	Guanosintriphosphat
IgG	Immunglobulin G
IIS	Schicht der Innensegmente der Sehzellen

IPL	Innere plexiforme Schicht
M.	Musculus
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MAP-Kinase	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MPS	Monozytäres phagozytierendes System
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
N.	Nervus
NGF	Nerve growth factor
NT-3	Neurotrophin 3
Oligo-dT	Oligodesoxythymidinsäure
OMgp	Oligodendrocyte myelin glycoprotein
OPL	Äußere plexiforme Schicht
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus hydrogenii
PNS	Peripheres Nervensystem
RGC	Retinale Ganglienzelle
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkription
SHIP	SH2- enthaltende Inositol-5-Phosphatase
SHP-1	Src-homology-domain phosphatase-1, Tyrosinphosphatase
STAT	Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator
T	Thymidin
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
ZNS	Zentrales Nervensystem

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Böcker-Meffert S., Rosenstiel P., Röhl C., Warneke N., Held-Feindt J., Sievers J., Lucius R. Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43: 2021-6

1. Einleitung

Im zentralen Nervensystem (ZNS) adulter Säuger, Vögel und Reptilien kommt es nach traumatischer oder degenerativer Zerstörung zentraler Nervenfasern bis auf wenige Ausnahmen nicht mehr zur Regeneration, da die Axone nicht in der Lage sind, ihre vormals bestehenden Verbindungen wieder herzustellen. Diese Ausnahmen bilden Fasern im hypothalamisch-hypophysären System (Dellmann 1973; Kiernan 1978), in einigen monoaminergen Systemen (Björklund und Stenevi 1979), in Teilen des olfaktorischen Systems (Barber 1981) sowie im zentralen Anteil des N. trochlearis (Mc Connel 1984). Ferner ist eine Regeneration zentraler Axone bei Fischen und Amphibien sowie embryonalen und fetalen Säugern möglich.

Von diesen Ausnahmen abgesehen kommt es nach einer Läsion im ZNS zunächst zum Absterben der unmittelbar betroffenen Neurone. Nervenzellen, deren Axone nicht, deren Perikaryen aber verletzt sind, gehen nach wenigen Tagen bis Wochen im Rahmen der retrograden Degeneration zugrunde (Axon dieback). Die Dauer dieser retrograden Degeneration hängt hierbei vom Abstand zwischen axonaler Läsion und Perikaryon und von der Qualität der geschädigten Faser ab (Pallini R. et al. 1988).

Einmal abgestorbene Neurone können nicht mehr ersetzt werden, da sie postmitotische Zellen darstellen, das heißt Zellen, die ihre regenerative Potenz mit Erreichen ihres endgültigen Differenzierungsgrades verloren haben.

Im peripheren Nervensystem sind Fasern grundsätzlich in der Lage zu regenerieren, selbst wenn ihre Perikaryen im zentralen Nervensystem zu finden sind. So sind die Perikaryen der peripheren motorischen Fasern unter anderem im Vorderhorn der grauen Substanz im Rückenmark oder in motorischen Kerngebieten der Hirnnerven, im ZNS also, zu finden.

Als Ursache der unterschiedlichen Potenz axonaler Regeneration wurden zwei allgemeine Hypothesen aufgestellt. Zum einen wird davon ausgegangen, dass im peripheren sowie im unreifen ZNS regenerationsstimulierende Faktoren vorhanden sind, die es im ausgereiften ZNS nicht mehr oder in nur ungenügender Menge gibt (David und Aguayo 1981; Björklund und Stenevi 1984; Müller et al. 1984; Varon et al. 1984; Friedmann und Aguayo 1985; Berry et al. 1986 a,b; 1987; 1988; Kesslak et al. 1986; Smith et al. 1986; Beckh et al. 1987; Sievers et al. 1987; Hausmann et al. 1989; Hagg et al. 1990; Cassel et al. 1991; Vahlsing et al. 1991; Xu und Martin 1991;

Bähr et al. 1992), zum anderen davon, dass es im adulten ZNS regenerationsinhibierende Faktoren wie Nogo, OMgp (Oligodendrocyte myelin glycoprotein) und MAG (Myelin associated glycoprotein) gibt, die im unreifen ZNS fehlen und sich dort erst im Laufe der Ontogenese und Hirnreifung entwickeln (Caroni und Schwab 1988; Schnell und Schwab 1990; Shewan et al. 1993; Mc Kerracher et al. 1994; Cartel und Roder 1996; Chen et al. 2000; GrandPre et al. 2000; Prinjha et al. 2000; Kottis et al. 2002, Übersicht bei Cafferty et al., 2008).

Läsionen im zentralen Nervensystem sowohl traumatischer als auch degenerativer Genese (Querschnittssyndrome, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose und viele andere) bedeuten für die betroffenen Patienten häufig eine erhebliche Einschränkung ihrer Lebensqualität und -erwartung. Somit ist es besonders wichtig, neue Behandlungsstrategien zu finden und/oder bereits vorhandene Therapiekonzepte zu optimieren. Grundvoraussetzung dafür ist eine möglichst detaillierte Kenntnis der zellulären Reaktionsmechanismen nach einer Schädigung des ZNS.

Schon Ende der zwanziger Jahre des vorherigen Jahrhunderts erkannte Ramon y Cajal, dass die geringe regenerative Potenz des adulten ZNS nicht nur Eigenschaften der Nervenzellen zuzuschreiben ist, sondern vor allem im umliegenden Gewebe, der Glia, begründet ist. Die erfolglose axonale Regeneration und damit der Verlust der funktionellen Integrität nach einer Läsion beruht also auf einem sehr komplexen und vielschichtigen Vorgang. Außer den Neuriten, die auf stimulierende und inhibierende Faktoren aus der Umgebung reagieren (s.o.), sind ortständige und hämatogene Zellen an dem Versuch des ZNS beteiligt, seine ursprüngliche Funktion und Morphologie wiederherzustellen. Insbesondere Zellen des monozytären phagozytierenden Systems (MPS) wie Makrophagen, die in der frühen posttraumatischen Phase aus dem Blutstrom einwandern, oder residente Mikrogliazellen bilden den Großteil der Zellpopulation am Läsionsort (Giulian et al. 1989; Giulian 1992). Zum einen phagozytieren diese Zellen den durch die Läsion entstandenen Detritus, zum anderen setzen sie auch zytotoxische Stoffe frei, die eine weitere Schädigung des Gewebes bewirken. Zu diesen gehören exzitatorische Aminosäuren (Banati et al. 1993) wie Glutamat aber auch Stickstoffmonoxyd (NO) (Marletta et al. 1989; Dawson et al. 1991; Green et al. 1991; Zielasek et al. 1992;

Chao et al. 1993), proteolytische Enzyme, freie Radikale sowie Arachidonsäurederivate (Banati et al. 1993). Astrozyten und Oligodendrozyten bilden vermehrt Chondroitinsulfat-Proteoglykane, die in der Extrazellulärmatrix auf molekularer Ebene ein für axonale Wachstumskegel undurchdringliches Netzwerk darstellen (Properzi und Fawcett 2004; Carulli et al. 2005; Laabs et al. 2007). Zeitgleich werden Astrozyten zur Proliferation und Transformation in die ‚reaktive‘ Form angeregt und Kapillaren sprossen, gefolgt von einer Invasion von Fibroblasten, in das Wundgebiet ein. Diese in der späten posttraumatischen Phase gebildete astrogliale Narbe stellt nun auf zellulärer Ebene eine undurchdringliche Barriere für die neu aussprossenden Neuriten dar (Liuzzi und Lasek 1987; Spring et al. 1989; Mansour et al. 1990; Snow et al. 1990; Lochter et al. 1991).

Ein wesentlicher Fortschritt in der Erforschung der zentralen Regeneration wurde mit Transplantationsexperimenten erreicht. Gewebe aus dem ZNS pränataler Säuger ist im adulten ZNS lebensfähig und ist dazu in der Lage, mit dem Wirts-ZNS funktionsfähige Verbindungen zu bilden (Björklund et al. 1976, 1979). Darüber hinaus erhöht in adultes ZNS eingebrachtes fetales ZNS-Gewebe die Regenerationsfähigkeit im Wirtsorgan (Kromer et al. 1981; Hausmann et al. 1989). So wachsen adulte zentrale Fasern ungehindert in das transplantierte fetale Gewebe ein, und die Axone der transplantierten fetalen Neurone regenerieren ungehindert im Empfängergewebe.

Axone zentraler Neurone sind genauso in der Lage, in Transplantate aus dem peripheren Nervensystem (z.B. Nervus ischiadicus) einzuwachsen, durch diese hindurch zu wachsen und ihr korrektes Zielgebiet wieder zu innervieren (Richardson et al. 1980; David et Aguayo 1981; Berry et al. 1986, 1987). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit der alleinigen Transplantation von SCHWANNschen Zellen, die im PNS wesentlich für dessen Regenerationsvermögen verantwortlich sind, erzielt (Kromer und Cornbrooks 1985; Bähr et al. 1991).

Durch Transplantationsexperimente fand man heraus, dass Zielstrukturen im Auge selbst (M. sphincter pupillae, Corpus ciliare, Lamina chorioidea) Quelle eines neurotrophen Moleküls sind, das das Überleben der sie innervierenden cholinergen Motoneurone des Ganglion ciliare bedingt (Sendtner et al. 1994). Dieses Molekül erhielt den Namen „Ciliary neurotrophic factor“ – CNTF. Die Hauptquelle von CNTF sind aller Wahrscheinlichkeit nach die Hüllzellen (Ensheathing cells) im Bulbus

olfactorius und Bulbus olfactorius accessorius. Sie repräsentieren eine Population zentraler Gliazellen, die Eigenschaften von Astrozyten und Schwannzellen in sich vereinen (Gudino-Cabrera und Nieto-Sampedro 2000). Ensheathingzellen sind GFAP-positiv wie Astrozyten, sie besitzen aber auch Charakteristika von Schwannzellen, denn sie unterstützen das Wachstum von Axonen und können myelinisieren (Ramon-Cueto und Valverde 1995; Ramon-Cueto und Avila 1998; Kafitz und Greer 1999).

Im Falle eines Chorea-Huntington-Modells konnte gezeigt werden, dass experimentell geschädigte striatale Neurone durch die Administration von CNTF effektiv gegen Degeneration geschützt werden (Emerich et al. 1998; Mittoux et al. 2000). Es existieren ebenfalls bereits klinische Studien, bei denen die Wirksamkeit von CNTF als Therapeutikum für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen am Menschen getestet wurde (Thoenen und Sendtner 2002).

Aufgrund der bereits geschilderten experimentellen Befunde wurden verschiedene Funktionen für CNTF im erwachsenen ZNS vorgeschlagen: Beteiligung an Protektion und Reparatur verletzter Nervenzellen (Weisenhorn et al. 1999), Unterstützung der axonalen Regeneration nach Verletzungen (Ip und Yancopoulos, 1996), Aufrechterhaltung der Funktion von Neuronen mit langen Projektionen, die unter mechanischer Belastung stehen (periphere Motoneurone, N. opticus), Förderung kontinuierlicher Regeneration (im olfaktorischen System) und intensiver Neuroplastizität (septohippocampales System; Stöckli et al. 1991; Winter et al. 1995; Dallner et al. 2002).

Analog dazu scheint im ZNS das Schicksal regenerierender Axone auch von Zellen der zentralen Glia, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen, abzuhängen. Wie schon geschildert, kann die Transplantation embryonalen Hirngewebes die Regeneration zentraler Axone im adulten Empfängerorgan stimulieren (Hausmann et al. 1989). Beim Vergleich von Transplantaten embryonaler Hirnregionen, die sowohl Nerven- wie Gliazellen enthalten, mit solchen, die ausschließlich gliale Zellen enthalten (z.B. Gewebe aus dem embryonalen N. opticus), fiel auf, dass das Regenerationsvermögen im Akzeptororgan um so größer ist, je höher der Anteil an Glia im Donororgan ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass der regenerationsstimulierende Effekt der gliareichen Transplantate mit zunehmendem Alter der Spendertiere geringer wird und schließlich ganz verschwindet (Sievers et al.

1995). Die „kritische Periode“ der Regenerationsstimulation durch die Transplantate entspricht dabei der sich verringernden regenerativen Potenz im ZNS (Schmidt et al. 1981).

Um festzustellen, welche Gliazellen in den Transplantaten die axonale Regeneration stimulieren, transplantierten Sievers et al. (1995) in Zellkultur gezüchtete Astrozyten in den Sehnerv adulter Ratten und fanden, dass diese Zellen einen noch größeren Effekt auf die axonale Regeneration haben, als zuvor getestete N. opticus-Transplantate. Astrozyten spielen eine entscheidende Rolle bei den beobachteten Regenerationsvorgängen. Sie unterstützen das Überleben von Neuronen *in vitro* (Lindsay 1979; Müller et al. 1984; Bauer und Tontsch 1990) und produzieren Wachstums- und Substratfaktoren, die für das Überleben und Auswachsen von Nervenfasern notwendig sind (Banker 1980; Liesi et al. 1983; Varon et al. 1984). Ein Nachteil dieser früheren Studien besteht darin, dass entweder embryonale oder periphere Neurone eingesetzt wurden, deren Regenerationsvermögen nicht mit dem im ausgereiften ZNS vergleichbar ist.

Um weiter zu erforschen, welche Faktoren speziell für die regenerationsfördernde Wirkung von den oben geschilderten Transplantationsexperimenten verantwortlich sind, ist man in letzter Zeit dazu übergegangen, mit Einzelsubstanzen zu experimentieren, sei es mit Faktoren, von denen man sich direkt eine neurotrophe Wirkung erhofft oder aber mit Stoffen, die Neuroregenerationsinhibitoren blockieren und neutralisieren.

Seit Masuda et al. 1994 die sauerstoffabhängige Produktion von Erythropoietin (EPO), das zur Wachstumshormon/Prolaktin-Zytokinfamilie gehört (Zhu Y et al. 1994), von Rattenastrozyten in Kultur nachweisen konnten und Digicaylioglu et al. 1995 EPO im Liquor cerebrospinalis nachwies, wird auch die Wirkung von EPO vor diesem Hintergrund untersucht. Bis dahin war man davon ausgegangen, dass EPO nur in der Niere und der fetalen Leber gebildet wird und nur auf die Zellen der Erythropoese einen Effekt habe.

Gorio et al. zeigten 2002, dass EPO nach experimenteller Läsion des Rückenmarks das neuronale Überleben signifikant verbessert. Die neuroprotektive Wirkung von EPO konnte auch in verschiedenen ZNS-Ischämie- und -Traumamodellen nachgewiesen werden (Sakanaka et al. 1998; Marti et al. 2000; Sirén et al. 2000;

Juul 2002; Xiong et al. 2008) und zeigte im klinischen Einsatz im Rahmen von Studien ein verbessertes Outcome bei Patienten mit Schlaganfall und Multipler Sklerose sowie eine verminderte Demenzentwicklung bei Schizophreniepatienten (Ehrenreich et al. 2002, 2004, 2007; Liu et al. 2008).

Ausgehend von diesen Befunden einer protektiven Wirkung von EPO auf die Neurone im zentralen Nervensystem, galt es nun, den Effekt von Erythropoietin auf die axonale Regeneration im ZNS zu untersuchen und ein geeignetes Modell zu diesem Zweck zu entwickeln. Ein solches Modell sollte ermöglichen, *in vitro* gewonnene Befunde auf eine *in vivo*-Situation zu übertragen und so gewählt sein, dass Manipulationen in zukünftigen Studien *in vivo* durchführbar sind. Außerdem sollte das entsprechende zu untersuchende Gewebe in seiner Regenerationsfähigkeit mit adultem zentralen Nervensystem vergleichbar sein. Das hier beschriebene *in vitro*-Regenerationsmodell erfüllt diese Voraussetzungen hervorragend. Die kultivierten Explantate von Retinae postnataler Ratten mit den darin enthaltenen retinalen Ganglienzellen (RGCs) sind zum Zeitpunkt der Präparation nicht mehr dazu in der Lage, ihre Neuriten, welche den Sehnerven (Nervus opticus) bilden, zu regenerieren (Alcutt et al. 1984 a, b). Gleiches gilt auch für das hier verwendete *in vivo*-Regenerationsmodell. Der Sehnerv stellt einen Trakt zentraler Fasern dar, der aufgrund seiner Lage außerhalb des Neurocraniums oder knöchernen Spinalkanals einer experimentellen Manipulation sehr gut zugänglich ist.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Erythropoietin in der Lage ist, die axonale Regeneration *in vitro* (Retinaexplantate) und *in vivo* (Nervus opticus-Läsion) zu steigern.

Dazu wurden folgende Fragestellungen erarbeitet:

1. Lässt sich der EPO-Rezeptor in der Retina auf RNA-Ebene mittels RT-PCR sowie auf Proteinebene mittels Immunhistochemie nachweisen?
2. Steigert die Gabe von EPO die axonale Regeneration *in vitro*?
3. Steigert die Gabe von EPO die axonale Regeneration im Tiermodell *in vivo*?

2. Material

2.1 Biochemikalien

Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Carl Roth, Darmstadt
DNA-Längenstandard, 100bp-ladder	Gibco BRL, Eggenstein
dNTP (Desoxy-Nukleotidtriphosphat)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DTT (Dithiothreitol)	Carl Roth, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Carl Roth, Darmstadt
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Carl Roth, Darmstadt
HEPES (Hydroxyethylpiperazin- ethansulfonsäure)	Biomol, Hamburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Darmstadt
Natronlauge	Carl Roth, Darmstadt
PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	Biochrom, Berlin
Tris (Trihydroxymethylaminomethan)	Sigma, Deisenhofen
Trizol-Reagenz	Gibco BRL, Eggenstein

2.2 Gewebekulturmaterialeien

Amino-n-Capronsäure	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
Ethosuximid	Sigma, München
Fibrinogen	Sigma, Deisenhofen
Hydrocortison	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Sigma, Deisenhofen

Kaiser's Glycerolgelatine	Merck, Darmstadt
Kulturschalen, 100mm Durchmesser	Sarstedt, Nürnberg
24well-Kulturschalen	Costar, Bodenheim
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Leibowitz-15-Medium	Biochrom, Berlin
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Thrombin	Hoffmann La Roche, Schweiz
TMX400-Film, TMAX100-Film	Eastman Kodak, Rochester, NY, US
Transferrin	Sigma, Deisenhofen
L-3-3-5-Triiodthyronin	Sigma, Deisenhofen

2.3 Antikörper

Growth-associated-protein(GAP)-43	Sigma, Deisenhofen
GFAP (Glial fibrillary acidic protein)	Boehringer, Mannheim
ED-1	Serotec, Oxford, UK
Kaninchen-anti-Maus-IgG	Sigma, Deisenhofen
Maus-anti-Kaninchen-IgG	Sigma, Deisenhofen
Polyklonaler EPO-Rezeptor-AK	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, US

2.4 Zytokine

Erythropoietin, human, rekombinant	Janssen-Cilag, Neuss
------------------------------------	----------------------

2.5 Primer für die EPO-Rezeptor-PCR

EPO- <i>sense</i> -Primer	5'-CTATGGCTGTTGCAACGCGA-3'
EPO- <i>antisense</i> -Primer	5'-CCGAGGGCACAGGAGCTTAG-3'

2.6 Enzyme

RNase freie DNase (10U/ μ l)

Promega, Göttingen

SuperScript Reverse Transkriptase (200U/ μ l)

Gibco BRL, Eggenstein

Taq-Polymerase (5U/ μ l)

Promega, Göttingen

3. Methoden

3.1 Molekulargenetische Untersuchung der EPO-R Expression

3.1.1 RNA-Isolierung

Die kompletten Retinae von postnatalen Ratten (11 Tage alt) werden entfernt und in Trizolreagenz überführt (RNA-Isolierung nach der Trizolmethode von Chomcynski und Sacchi 1987), hierbei werden 50 mg Gewebe mit 1 ml Trizol versetzt. Unmittelbar danach wird die Gewebe-Trizol-Suspension mit einem Ultra-Thoraxx homogenisiert, in Eppendorff-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 30° C inkubiert. Nach Zugabe von Chloroform (0,2 ml pro eingesetztem 1 ml Trizol) wird geschüttelt und erneut für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Aufspaltung des Gemisches in eine untere Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere farblose Phase durch 15 min Zentrifugation (8000xg bei 2-8° C). Die obere wässrige Phase wird abpipettiert, in ein neues Eppendorff-Röhrchen überführt und mit Isopropylalkohol versetzt (0,5 ml pro eingesetztem 1 ml Trizol), gut vermischt, für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zehn Minuten zentrifugiert (8000xg bei 2-8° C). Die RNA präzipitiert als gelartiges Kissen am Grund des Eppendorff-Röhrchens. Durch Absaugen des Überstandes und anschließendes Versetzen mit Ethanol (75%, mindestens 1 ml Ethanol pro eingesetztem 1 ml Trizol) wird die RNA gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für fünf Minuten bei 7500xg bei 2-8° C wird das Ethanol wieder abpipettiert und das RNA-Pellet für zehn Minuten an der Raumluft getrocknet. Die Ausbeute an RNA wird photometrisch bestimmt. Hierzu wird das RNA-Pellet in RNA-Aufnahmepuffer relysiert und das Absorptionsspektrum zwischen 240 nm und 300 nm durch Durchleuchtung mit einer Deuteriumlampe gemessen. Das Absorptionsmaximum (A) der RNA liegt bei 260 nm, das der evtl. noch vorhandenen verunreinigenden Proteine bei 280 nm. Das Verhältnis A260 nm zu A280 nm sollte möglichst nahe 2,0 liegen und 1,7 nicht unterschreiten (Demidov et al., 1993). Eine Absorption von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook et al., 1989).

Aus dem maximalen Absorptionswert des Spektrums ließ sich mit dieser Angabe die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe errechnen. Zur Lagerung wird die RNA mit einer Mischung aus einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und reinem Ethanol bei minus 80° C aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen fällt die RNA aus und kann jederzeit durch Zentrifugieren gewonnen werden.

3.1.2 Durchführung der Reversen-Transkriptions Reaktion

Um zu überprüfen, ob eine bestimmte genetische Information innerhalb einer Zelle zunächst in eine mRNA-Sequenz und somit auch in den meisten Fällen in eine Proteinsequenz umgeschrieben wird, bedient man sich der reversen Transkriptionsreaktion (RT-Reaktion). Hierbei wird eine RNA-Sequenz in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben (Kawasaki, 1989), die im Folgenden dann als Matritze für die Synthese komplementärer DNA-Stränge durch die Polymerase-Ketten-Reaktion dienen kann.

Die bei der Isolation gewonnene RNA-Lösung wird gut gemischt und ein Volumen entnommen, das einer RNA-Masse von 5 µg entspricht. Anschließend wird für 20 Minuten bei 13 000 U/min bei 4° C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das RNA-Pellet an der Raumluft getrocknet. Das Pellet wird in 10 µl Bidest resolviert, mit 1 µl Oligo-dT versetzt und fünf Minuten bei 65° C inkubiert. Jetzt lagern sich die Oligo-dT-Fragmente an die Poly-A-Abschnitte der mRNA an. Diese Reaktion wird durch fünfminütige Inkubation auf Eis abgebrochen. Dieser Schritt dient dazu, eventuell vorhandene Sekundärstrukturen der mRNA-Sequenzen zu zerstören und somit eine gute Effizienz der RT-Reaktion zu gewährleisten.

Nach Zugabe von 4 µl PCR-Puffer (10x), 2 µl dNTP-Lösung (10 mM), 2 µl DTT (0,1 M), 2 µl Magnesiumchlorid (25 mM) pro Probe wird die RT-Reaktion durch Hinzupipettieren von 1 µl Reverser Transkriptase gestartet und für 75 Minuten bei 37° C durchgeführt. Zum Abschluss der Reaktion erfolgt das Erhitzen der Proben auf 95° C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Die so entstandene cDNA kann nun entweder sofort zur Durchführung einer PCR eingesetzt oder im Kühlschrank gelagert werden.

3.1.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR= Polymerase Chain Reaction) stellt mittlerweile ein weiträumig eingesetztes Verfahren zur Synthese spezifischer DNA-Sequenzen dar. Außer der DNA-Matrize muss der gepufferte Reaktionsansatz die vier Desoxyribonucleotide, zwei spezifische Primer und die *Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) enthalten (Mullis und Faloona 1987; Saiki et al. 1988). Das Prinzip besteht darin, dass das eingesetzte spezifische Primerpaar einen bestimmten cDNA- oder DNA-Abschnitt erkennt, mit diesem hybridisiert und somit der Taq-Polymerase als Startpunkt dient. Diese wird nun unter Verwendung der Desoxyribonucleotide von dem jeweiligen Startpunkt ausgehend einen zu der cDNA- oder DNA-Sequenz komplementären Strang bilden. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Vorgangs wird schließlich ein ganz spezifischer cDNA- oder DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt und kann als PCR-Fragment distinkter Länge zum Beispiel durch eine Argarosegel-Elektrophorese isoliert und sichtbar gemacht werden.

3.1.4 DNA-Gelelektrophorese

Gelelektrophoresen zur Auftrennung von DNA wurden nach Sharp und Mitarbeitern (1973) durchgeführt. Dazu werden die Proben mit Probenpuffer (1:10) versetzt und bei 100 V in einem mit Laufpuffer bedecktem Argarosegel (1,5 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenzgen (housekeeping gene) dient das β -Actin-Gen der Ratte, das für ein ubiquitär verbreitetes Filamentprotein codiert. Parallel läuft eine Probe, die ein Gemisch aus DNA-Fragmenten enthält, die sich in ihrer Größe um 100 Basenpaare unterscheiden und eine Art Skala (Basenleiter) zur Größenbestimmung der zu untersuchenden aufgetrennten DNA-Fragmente darstellt. Anschließend wird das Gel in ein Ethidiumbromidbad (5 $\mu\text{g/ml}$) eingelegt. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen Basen der DNA und wird durch UV-Strahlung zu einer gut messbaren Eigenfluoreszenz bei 302 nm angeregt. Die gemessene Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA-Menge. Die so dargestellten Banden werden dann mit einer Spezialkamera fotografiert und ausgewertet.

3.2. Immunhistochemie

Die Darstellung der jeweiligen Antigene erfolgt nach der verstärkten Immunperoxidase-methode. Zur Darstellung kommen: (i) regenerierende Axone mit einem Antikörper gegen ein phosphorylierendes Protein des Axonwachstumskegels, GAP-(growth associated protein-)43, (Aigner et al., 1995a, Aigner et al., 1995b; Doster et al., 1991), (ii) der Erythropoietinrezeptor (EPO-R) mit einem polyklonalen Kaninchen-IgG-Antikörper, Klon M20 , (iii) phagozytisch aktivierte Mikrogliazellen mit dem ED-1-Marker, der einen Antikörper gegen ein phagolysosomales Antigen darstellt (Dijkstra et al., 1985) und (iiii) die gliale Narbe mittels eines Antikörpers gegen saures gliales fibrilläres Protein, GFAP (glial filament acidic protein), um die Vollständigkeit der gesetzten Läsion zu überprüfen. Nach Entfernung des Einbettmediums werden die Schnitte ausgiebig in Tris-Puffer gespült und für drei Minuten mit 0,05 % Trypsin in PBS behandelt, dann erneut in Tris-Puffer ausgiebig gespült und für fünf Minuten in 10 mM Citratpuffer in der Mikrowelle behandelt.

Nach Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 0,75 % BSA in PBS für 20 Minuten erfolgt die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern gegen GAP-43 (1:400), den Erythropoietinrezeptor (1:100), ED-1 (1:1000) oder GFAP (1:50) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in Tris-Puffer werden die Schnitte mit einem Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-IgG, 1:100; Maus-Anti-Kaninchen-IgG, 1:100) in Tris-Puffer unter Zugabe von 10 % Rattenserum inkubiert, an den dann als Tertiärantikörper ein an Peroxidase gebundener Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper/Ziege-anti-Maus-Antikörper gebunden wird. Die Inkubation des Sekundär- und Tertiärantikörpers erfolgt für jeweils 30 Minuten. Zwischen diesen Inkubationsschritten werden die Objektträger gründlich mit Tris-Puffer gespült. Die Entwicklung erfolgt in einem Standardsatz aus Wasserstoffperoxid-3,3-Diaminobenzidinhydrochlorid (DAB).

3.3 Retinastanzen-Assay

3.3.1 Auswahl der Tiere

Fisher-Ratten (F344) werden im Retinastanzen-Assay verwendet. Im Tierhaus der Universität Kiel werden die Tiere unter konstanten Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen gehalten und einem zwölfstündigem Wechsel von hell und dunkel ausgesetzt. Die Tiere werden in der Nacht verpaart und der Tag darauf als erster der Embryonalphase gezählt (E1). Nach 22-tägiger Tragzeit werden die Jungen geboren und der Tag der Geburt als postnataler Tag (P) „0“ bezeichnet.

3.3.2. Präparation der Netzhautexplantate und Zellkultur

Die Augen von elf Tage (P11) alten Ratten werden unter halbsterilen Bedingungen gewonnen. Die Netzhäute werden in HEPES-gepuffertem Leibowitz-15-Medium aus den Augen entnommen und ausgebreitet. Mit einer Edelstahlkanüle (Innendurchmesser 400 µm) werden runde Explantate aus dem retinalen Gewebeverband ausgestanzt und in Fibrin gel kultiviert. Das Kulturmedium setzt sich aus DMEM, Insulin (5 mg/ml), Transferrin (1 µg/ml), Hydrocortison (7 ng/ml), Triiodthyronin (0,2 ng/ml), Natriumpyruvat (110 µg/ml), Glutamin (292 µg/ml), und 5-Amino-n-capronat (0,5 mg/ml) zusammen. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank in mit Wasserdampf gesättigter und mit 7,5 % Kohlendioxid angereicherter Atmosphäre bei 37°C.

Die Kultivierung in Fibrin gel ermöglicht ein dreidimensionales Wachstum. Jeweils drei Retinastanzen werden in einen Tropfen (20 µl) Fibrinogenlösung aufgenommen und auf ein Deckglas gesetzt, das mit drei NIH-Einheiten ($\approx 1 \mu\text{g}$, 1 NIH-Einheit = 0.324 µg) Thrombin beschichtet ist. Zur Herstellung der Fibrinogenlösung werden 1,2 g Fibrinogen in 10 ml destilliertem Wasser über Nacht bei 4°C gegen eine 8 %ige NaCl-Lösung dialysiert und anschließend bei 5000xg für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Lösung mit Kulturmedium bis zum Erhalt der gewünschten Arbeitskonzentration von 3 mg/ml verdünnt.

Nach Koagulation der Fibrin tropfen werden die Deckgläser in 24-Loch Platten gegeben und in 2ml Kulturmedium unter den jeweiligen Versuchsbedingungen kultiviert.

3.3.3 Zytokinapplikation

Eine Erythropoietinlösung wird durch Lösen von 84 µg (entsprechend 10000 U) in 1 ml destilliertem Wasser hergestellt. Das Succinimid Ethosuximid (ESX), ein Blocker von T-Typ-Calciumkanälen, wird bis zum Erhalt einer 10 mM-Lösung in Ethanol gelöst. Der polyklonale EPO-Rezeptor-Antikörper wird 1:80 verdünnt und anschließend den entsprechenden Kulturen hinzugegeben.

3.3.4 Aufarbeitung und Auswertung des Assays

Nach drei Tagen in Kultur werden die Netzhautexplantate in Glutardialdehyd (2,5 %) für zehn Sekunden bei 50° C in der Mikrowelle fixiert, in Ethanol dehydriert und bei 50° C eine Minute lang mit Sudanschwarz gefärbt und in Kaiser's Glycerolgelatine eingebettet. Die Auswertung des axonalen Wachstums erfolgt mit Hilfe eines computergestützten Bildanalyse-Systems (Analysis, SIS, Münster). Im digitalisierten Bild werden die Spitzen der ausgewachsenen Nervenfasern durch eine Linie miteinander verbunden, die die äußere Begrenzung einer von ihr eingeschlossenen Fläche bildet. Von dieser Gesamtfläche wird die Fläche des soliden Explantats abgezogen. Die so berechnete Fläche bildet die sogenannte axonale Domäne und ist weitgehend unabhängig von Größendifferenzen oder Form der Retinastanzen. Sie ist so dazu geeignet, Unterschiede im Wachstum der Axone unter den jeweiligen Kulturbedingungen zu vergleichen. Die axonale Domäne unter Kontrollbedingungen im serumfreien Medium wird gleich 100 % gesetzt.

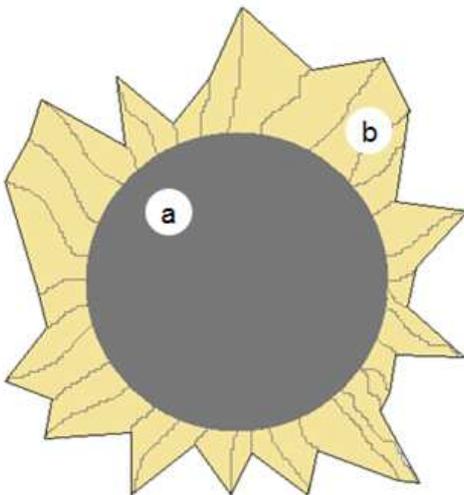


Abb. 1 Schema zur Assay-Auswertung

Es werden die Spitzen der ausgewachsenen Nervenfasern durch eine Linie miteinander verbunden, die die äußere Begrenzung einer von ihr eingeschlossenen Fläche bildet (b). Von dieser Gesamtfläche wird die Fläche des soliden Explantats (a) abgezogen. Die so berechnete Fläche bildet die sogenannte axonale Domäne und ist weitgehend unabhängig von Größendifferenzen oder Form der Retinastanzen.

3.4 Läsion des Nervus opticus

3.4.1. Auswahl des Tiermodells

Die Quetschläsion des Nervus opticus der Ratte stellt ein anerkanntes *in vivo*-Modell dar, um Regenerationsvorgänge im Zentralen Nervensystem adulter Mammalier zu untersuchen.

- Der Nervus opticus besteht aus einem isolierten Bündel myelinisierter Axone, die ausschließlich der retinalen Ganglienzellschicht entstammen (Berry 1981)
- Alle Axone dieses Fasertraktes verlaufen in der gleichen Richtung
- Der Nervus opticus ist operativ gut zugänglich. Durch eine standardisierte Quetschläsion werden alle Neuriten reproduzierbar beschädigt, ohne die Kontinuität der Gewebeformation an sich zu unterbrechen
- Das Auswachsen der Ganglienzellaxone bleibt unbehandelt abortiv (Sievers et al. 1984)
- Der Glaskörper kann als natürliches Reservoir für eine Applikation von potentiell neurotrophen Substanzen direkt am Perikaryon der retinalen Ganglienzellen dienen. So behandelte Ganglienzellen zeigen eine regenerative Potenz und ihr Wachstum kann einige Millimeter betragen (Berry et al. 1996, 1999)

3.4.2. Operationstechnik

Die Versuchstiere (weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200-250 g) werden mit Chloralhydrat (40 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal appliziert) anästhesiert. Die Kopfhaut wird rasiert und mit Kodan-Lösung desinfiziert. Der Kopf wird in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Es erfolgt eine mediosagittale Hautinzision von der Glabella bis zur Protuberantia occipitalis. Der linke Hautlappen wird mobilisiert und es werden zwei kleine Wundhaken eingebracht. Die supraorbitalen Leitungsbahnen werden dargestellt und unter Schonung derselben wird das Septum orbitale parallel zum Margo orbitalis auf einer Länge von drei bis fünf Millimetern inzidiert. Die dem Septum orbitale innen anliegende blutgefässführende Kapsel der HARDERschen Drüse wird gespalten, die Drüsenlappen mobilisiert und nach rostral aus der Orbita geschlagen. Als Tamponade werden kleine Würfel aus Lysostypt (gefriergetrocknetes Kollagen) in den vorderen und hinteren Teil der orbitalen Wundhöhle eingebracht. Der Bulbus oculi wird nun unter vorsichtigem Zug mit einer gebogenen Pinzette aus der Orbita luxiert. Der Nervus opticus wird mittels stumpfer Präparation zwischen zwei gebogenen anatomischen Pinzetten dargestellt, der M. retractor bulbi sowie die äußere Nervenscheide scharf gespalten und der Fasertrakt unter vorsichtigem Schluss mit einer spitzen Uhrmacherpinzette (5 Dumont) für zehn Sekunden gequetscht.

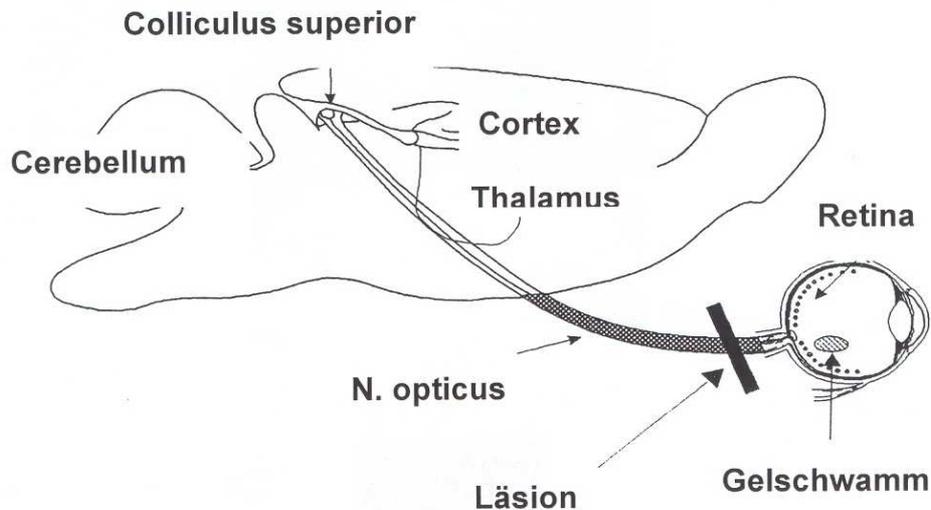


Abb. 2 Experimenteller Ansatz zur Durchführung der N. opticus-Läsion

Die Quetschung erfolgt intraorbital, die Implantation des Gelschwammes (oder eines Zellpellets) in den Glaskörper während des gleichen Eingriffes. Die zu untersuchenden Substanzen erreichen direkt die retinalen Ganglienzellen.

Das Auge wird vorsichtig zurück in die Orbita reponiert und der M. levator palpebrae sowie der M. rectus superior dargestellt. Unter Schonung der mit den Muskeln in das Auge ziehenden Gefäße wird der M. rectus superior am Ansatz durchtrennt und durch scharfes Spalten der TENONSchen Kapsel die Sklera freigelegt. Nach erneutem Austamponieren der Wundhöhle und Blutstillung mit Lysostypt wird die Sklera bei Bluttrockenheit mit der Spitze einer Subkutankanüle auf einer Länge von einem Millimeter inzidiert. Durch diese Inzision erfolgt das Einbringen des jeweiligen Implantats. Nach Überprüfen der retinalen Blutversorgung sowie der korrekten Lage des Implantats durch indirekte Ophthalmoskopie und anschließender Entfernung der Tamponaden, wird das Septum orbitale mit Einzelknopfnähten atraumatischen Nahtmaterials (Ethilon 7-0, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Die Wundränder der Kopfhaut werden mit Klammern (Sarstedt, Nürnbergrecht) adaptiert. Anschließend werden die Tiere wieder im Tierhaus für 7 und 21 Tage bei normalem Tag-Nacht-Rhythmus und artgerechter Wasser- und Futtermenge gehalten.

3.4.3. Perfusion und Aufarbeitung

Direkt vor der Perfusion werden die Tiere mit einer Überdosis Chloralhydrat (60 mg/kg Körpergewicht) getötet. Die Vv. iugulares werden eröffnet, um ein Abfließen von Blut und der Perfusionslösung gewährleisten zu können. Nach Eröffnung des Thorax wird die Aorta descendens unterhalb des Aortenbogens mit einer Gefäßklemme abgeklemmt, der Perikardbeutel eröffnet und die Perfusionskanüle durch die linke Herzkammer bis zum Bulbus aortae vorgeschoben. Als Perfusionslösung dient eine eiskalte 4 %ige Lösung Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer, die Perfusionszeit beträgt zehn Minuten.

Das linke Auge und der linke Nervus opticus werden entnommen und 24 Stunden in 4 % PFA in Phosphatpuffer bei 4°C aufbewahrt. Dann werden die Präparate in 1 % PFA in Phosphatpuffer überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4° C aufbewahrt.

Die Nervi optici und Retinae werden nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkohol/Xylol-Reihe in Paraplast eingebettet, der Länge nach 7 µm dick geschnitten und auf mit Biobond beschichtete Objektträger aufgebracht.

3.4.4 Auswertung der axonalen Regeneration im N. opticus

Die Dokumentation und Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit einem Photomikroskop der Firma Zeiss auf Kodak TMAX100-Filmen oder mittels einer digitalen Kamera (AxioCam, Zeiss) und einem computergestützten Videobildverarbeitungsprogramm (Analysis, SIS, Göttingen). Es wird in digitalisierten Bildern vom distalen Ende der Läsionsstelle die Länge des jeweils am weitesten gewachsenen Axons jedes Schnittes bestimmt. Es werden nur Schnitte in die Auswertung aufgenommen, die GAP-43 positive Axone proximal und distal der Quetschläsion enthalten und die in der parallelen GFAP-Färbung eine vollständige Läsion aufweisen (Berry et al. 1996, 1999). Der Absolutwert der Länge des am weitesten gewachsenen Axons eines Tieres geht in die statistische Auswertung ein. Aus technischen Gründen kann nur diese vereinfachte Auswertung des Längenwachstums der regenerierenden Neuriten erfolgen, die von Schnell et al. 1990 entwickelt wurde. Da die regenerierenden Axone durch die Schnitte wandern, bleibt auch nach dreidimensionaler Rekonstruktion sowohl die genaue Anzahl der

Axone als auch die genaue Länge eines Neuriten nur unsicher messbar und kann nicht quantitativ ausgewertet werden. Die qualitative Darstellung der Axondichte erfolgt mit Hilfe einer Camera-lucida-Zeichnung, bei der jeweils drei Serienschnitte eines Präparates übereinander projiziert werden.

3.5 Berechnungen, Statistiken, Graphik und Ausarbeitung

Alle Berechnungen und graphischen Darstellungen werden mit einem kommerziellen Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft, München) durchgeführt.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) dargestellt. Die Auswertung der Daten erfolgt, wenn nicht anders angegeben, bei den *in vitro*-Experimenten bezogen auf die unstimulierten Kontrollen, bei den *in vivo*-Experimenten bezogen auf Werte unbehandelter Tiere. Zur statistischen Auswertung werden Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt, denen sich ein multipler, paarweiser Vergleich mit Hilfe eines post-hoc Testes (Bonferoni) anschließt. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wird als signifikant angenommen.

Die Bearbeitung des mit Hilfe handelsüblicher Scanner eingelesenen Bildmaterials erfolgte mit Corel Paint Shop Pro (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) und PowerPoint, die Ausarbeitung der Dissertation mit Word für Windows (Microsoft, München).

4. Ergebnisse

4.1 Die Wirkung von Erythropoietin auf das Axonwachstum retinaler Ganglienzellen *in vitro*

Es wird untersucht, ob das Neuritenwachstum zentraler Nervenzellen durch Erythropoietin stimuliert wird. Es werden Retinaexplantate postnataler Ratten in einem dreidimensionalen Fibringel unter serumfreien Bedingungen kultiviert. In der Kontrollkultur sind nach drei Tagen kurze Axonfortsätze an der gesamten Zirkumferenz des Explantats sichtbar und erreichen dabei eine Länge von bis zu 180 μm (Abb. 3A). Kontrollexplantate werden mit BDNF (brain derived growth factor) in einer für retinale Ganglienzellen sicher neurotrophen und neuritogenen Konzentration von 10 ng/ml behandelt. Im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen (=100 %) wird ein Wachstum der Axone bis auf 160 % \pm 3 % erreicht. Der Wert entspricht der sogenannten axonalen Domäne des Explantats (s. Methoden 3.1.4), einzelne Axone erreichen hierbei über 500 μm Länge. Eine Antikörperfärbung gegen das Markerprotein Thy 1.1 bestätigt, dass es sich bei den regenerierenden Axonen um Fortsätze retinaler Ganglienzellen handelt (Lucius et al. 1998b).

Die Zugabe von Erythropoietin in einer Konzentration von 5×10^{-13} M vergrößert die axonale Domäne um 169 % \pm 18 % (n=18, Abb. 3B, Abb. 4). Die meisten retinalen Ganglienzellen regenerieren Axone über 400 μm Länge, einige sogar bis 650 μm Länge. Auch in halbmaximaler Konzentration von $7,8 \times 10^{-15}$ M sowie einer Konzentration von 5×10^{-14} M zeigt sich eine deutliche Regenerationssteigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4).

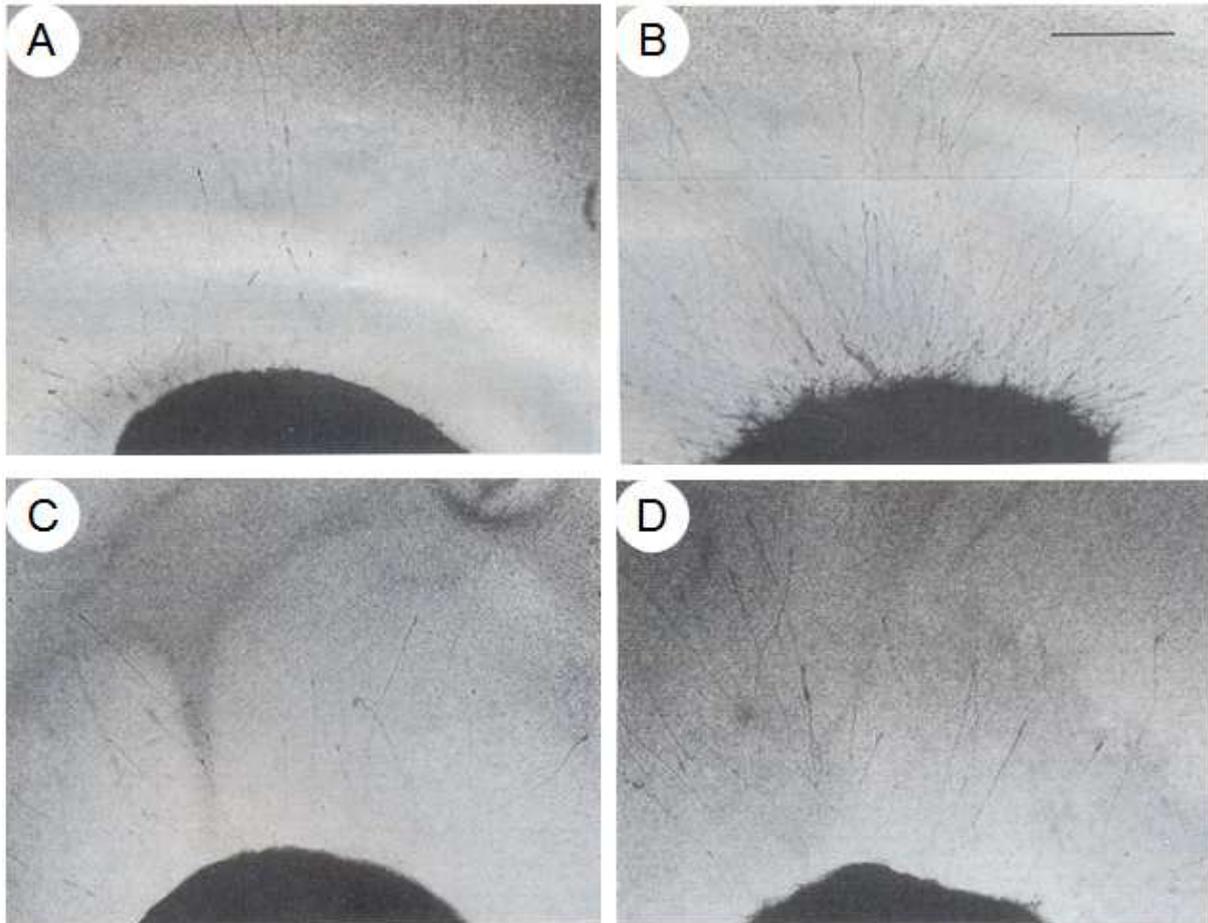


Abb. 3 Lichtmikroskopische Darstellung des EPO-vermittelten Axonwachstums retinaler Stanzen in Kultur

(A) In serumfreiem Medium kultivierte Retinaexplantate weisen nach drei Tagen in Kultur wenige, kurze regenerierende Axone auf. (B) Nach Gabe von EPO nahm die Anzahl und Länge der regenerierenden Neuriten deutlich zu. Die Koinkubation von EPO mit dem EPO-Rezeptor-AK (C) oder dem T-Typ-Calciumkanalblocker Ethosuximid (D) verhinderte das EPO-induzierte Axonwachstum vollständig (Balken=100 μ m).

4.2 Die Effekte des Anti-EPO-Rezeptor-Antikörpers und des T-Typ-Kalziumkanalblockers Ethosuximid auf die axonale Regeneration *in vitro*

Bei Koinkubation mit dem EPO-Rezeptor-Antikörper ist der durch Erythropoietin induzierte positive Effekt auf die axonale Regeneration nicht mehr nachweisbar (102 % \pm 8 %, n=18, Abb 3C, Abb. 4). Bei Koinkubation von Erythropoietin und dem T-Typ Kalziumkanalblocker Ethosuximid (ESX 5 μ M) ist ebenfalls keine deutlich gesteigerte Regeneration der Neuriten messbar (101 % \pm 11 %, n=18, Abb. 3D, Abb. 4).

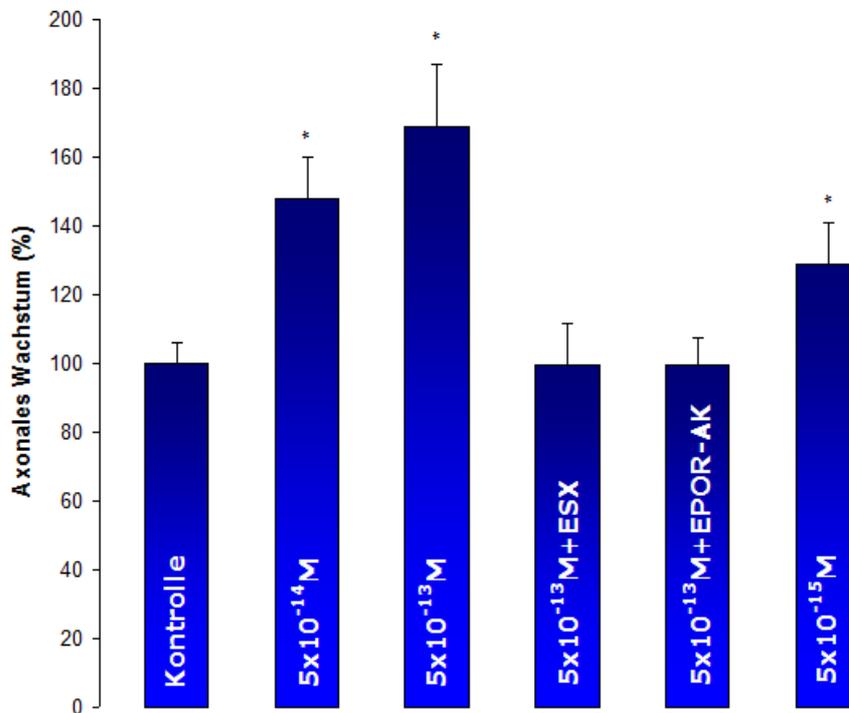


Abb. 4 Erythropoietin und das Neuritenwachstum retinaler Ganglienzellen in Explantatkulturen postnataler Ratten.

Erythropoietin bewirkt dosisabhängig eine signifikante Steigerung des Axonwachstums. Koinkubation mit Etosuximid (ESX) oder einem EPO-R-Antikörper heben den wachstumsfördernden Effekt des Erythropoietins vollständig auf (n=36, *p<0,05).

4.3 Transkription des EPO-Rezeptors in der Retina der Ratte

Der Nachweis des Erythropoietinrezeptors in der Retina der Ratte erfolgt durch RT-PCR. Abb. 5 zeigt ein Agarosegel, in dem die DNA-Banden durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht sind. Linie 1 zeigt die DNA-Leiter mit Banden, die sich in ihrer Größe um 100 Basenpaare (bp) unterscheiden. Linie 2 zeigt das erwartete PCR-Produkt der EPO-Rezeptor-cDNA mit einer Größe von 402 bp. Linie 3 zeigt das ‚housekeeping gene‘ β -Aktin bei 279 bp.

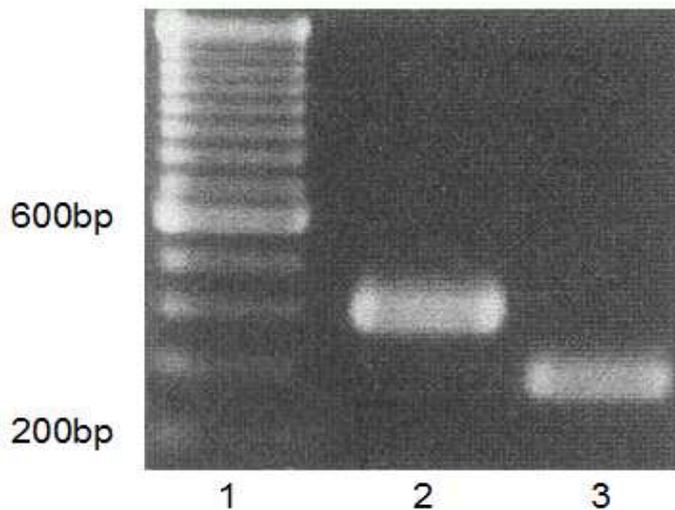


Abb. 5 Agarosegel

Linie 1 zeigt die DNA-Leiter mit Banden, die sich in ihrer Größe um 100 Basenpaare (bp) unterscheiden. Linie 2 zeigt das erwartete PCR-Produkt der EPO-Rezeptor-cDNA mit einer Größe von 402 bp. Linie 3 zeigt das ‚housekeeping gene‘ β -Aktin bei 279 bp.

4.4 Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation des EPO-Rezeptors in der Retina der Ratte

Um den EPO-Rezeptor auf Proteinebene in der Rattenretina zu lokalisieren, werden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Ein positiver Nachweis kann in verschiedenen Schichten der Netzhaut gezeigt werden. Die Intensität der Färbung ist in der Schicht der retinalen Ganglienzellen (GCL) am größten, es gelingt aber auch der Nachweis des Rezeptors in der inneren (IPL) und äußeren plexiformen Schicht (OPL) sowie an den Innensegmenten der Sehzellen (IIS, Abb. 6A). Durch Koinkubation mit dem EPO-R-blockierenden Peptid zeigt sich keine positive Reaktion mehr (Abb. 6B).

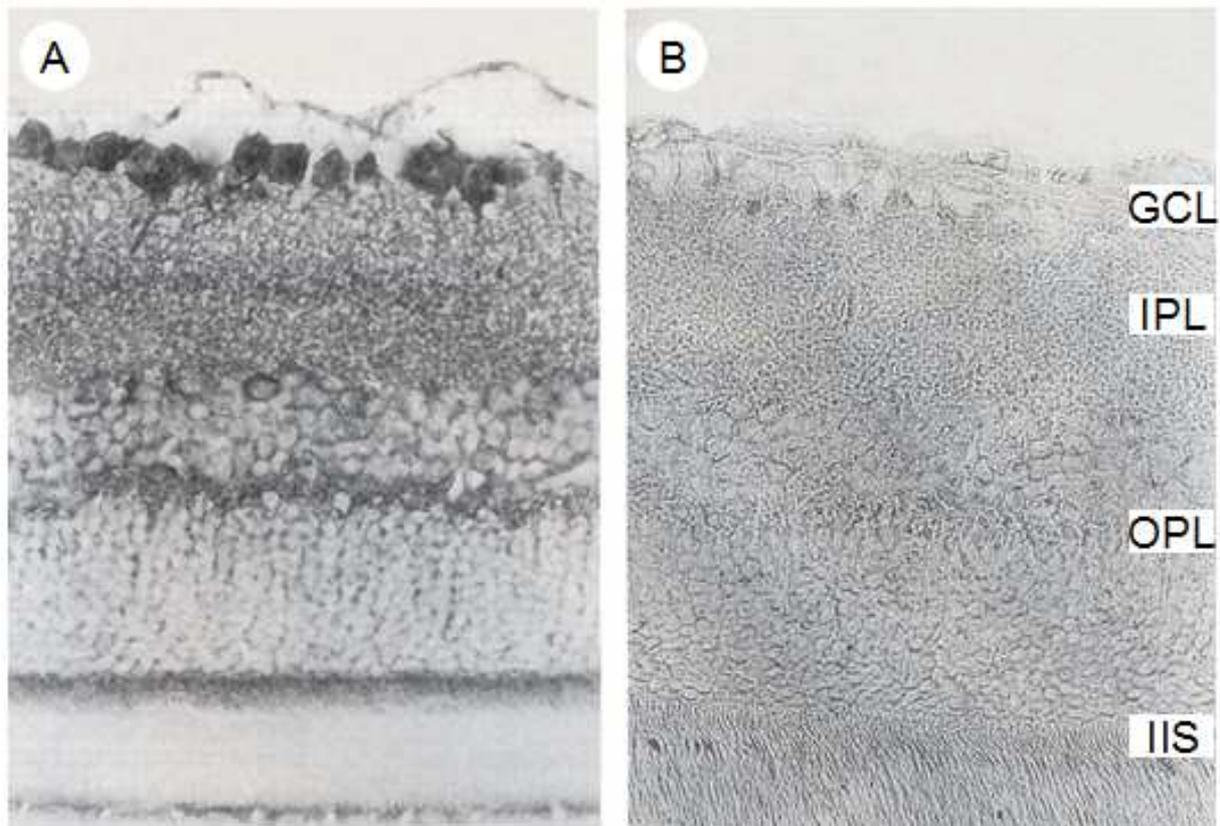


Abb. 6 Immunhistochemischer Nachweis des Erythropoietinrezeptors in der Retina

(A) Die intensivste Färbung wird in der Ganglienzellschicht (GCL) beobachtet. Die äußere (OPL) und innere (IPL) plexiforme Schicht sowie die Innensegmente (IIS) der Sehzellen zeigen nur eine leichte Anfärbung. Wird der EPO-Rezeptor durch Vorbehandlung mit dem Blocking-Peptid besetzt, ist keine immunhistochemische Reaktion nachweisbar (B).

4.5 Einfluss von Erythropoietin auf die axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen der Ratte *in vivo*

In den vorangegangenen *in vitro*-Versuchen wird gezeigt, dass Erythropoietin neuritogene Effekte auf Retinaexplantatkulturen ausübt und, dass in der Rattenretina der EPO-Rezeptor sowohl auf RNA-Ebene (PCR, s. Abb. 5) als auch auf Proteinebene (Immunhistochemie, s. Abb. 6) nachweisbar ist. Im N. opticus Läsionsmodell soll nun untersucht werden, ob die Gabe von Erythropoietin auch die Regeneration von Nervenfasern im ZNS adulter Mammalier *in vivo* fördern kann. Nach Setzen einer intraorbitalen Quetschläsion des N. opticus, die eine Durchtrennung der Axone bei Erhaltung der Gewebekontinuität erzeugt, werden nach sieben und 21 Tagen Überlebenszeit die regenerierenden Axone mittels eines

Antikörpers gegen ein intrazelluläres wachstumsassoziiertes Phosphoprotein (GAP-43) dargestellt. Die Substanzen werden in diesem Modell direkt an die retinalen Ganglienzellen appliziert, indem Kollagenschwämmchen, die eine definierte Menge der zu untersuchenden Substanz enthalten, intravitreal implantiert werden, ohne die Linse zu verletzen. Als Negativkontrolle dient die Implantation des alleinigen Schwämmchens. Als Positivkontrolle werden Zellpellets aus Schwannomzellen in den Glaskörper implantiert, von denen bekannt ist, dass sie eine Vielzahl neurotropher Faktoren für retinale Ganglienzellen wie BDNF oder NT-3 sezernieren (Berry et al. 1999).

In der Gruppe der kontrolloperierten Tiere zeigt der proximale Nervenstumpf GAP-43-positive Immunreaktivität. Nur wenige regenerierende Fasern überwinden die Läsionsstelle und zeigen ein abortives lediglich subperineuriales Wachstumsverhalten (s. Abb. 7). Das maximale Wachstum beträgt $0,2 \text{ mm} \pm 0,1 \text{ mm}$ gemessen vom Zentrum der Läsion aus, was Werten einer alleinigen Quetschläsion des N. opticus ohne intravitreale Manipulation entspricht (Weibel et al. 1994).

Nach Implantation der Schwannomzellpellets in den Glaskörper werden regenerierende Axone mit einer Länge von $2,2 \text{ mm} \pm 0,4 \text{ mm}$ gemessen (s. Abb. 8).

Nach Implantation eines mit 6000 U (=50 μg) rekombinanten humanen Erythropoietin (rhEPO) präparierten Schwämmchens zeigte sich keine signifikante Steigerung der axonalen Regeneration. Auch nach Erhöhung der verwendeten rhEPO-Menge auf 10 000 U (=84 μg) pro implantiertem Schwämmchen zeigte sich keine im Vergleich zur Gruppe der Kontrolltiere verbesserte axonale Regeneration (s. Abb. 8) über die Läsionsstelle hinaus. Wohl aber zeigt sich, dass die Expression von GAP-43 proximal der Quetschläsion - insbesondere nach drei Wochen - deutlich gegenüber den Kontrolltieren erhöht ist (s. Abb. 7).

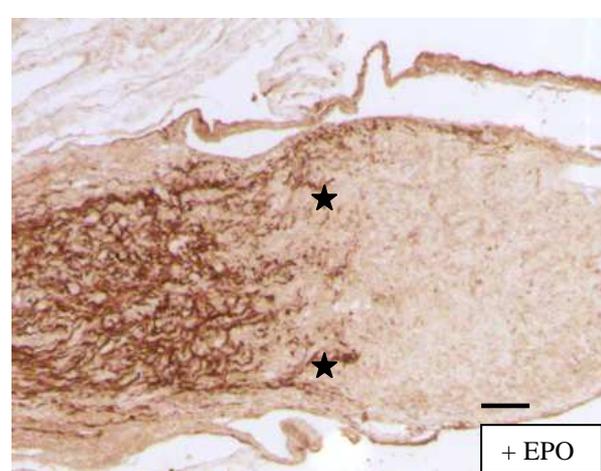
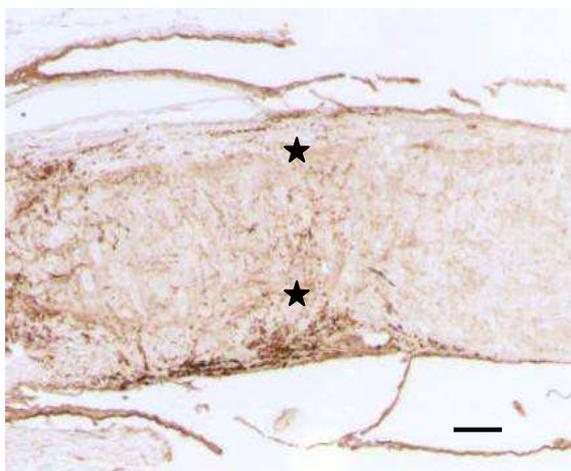
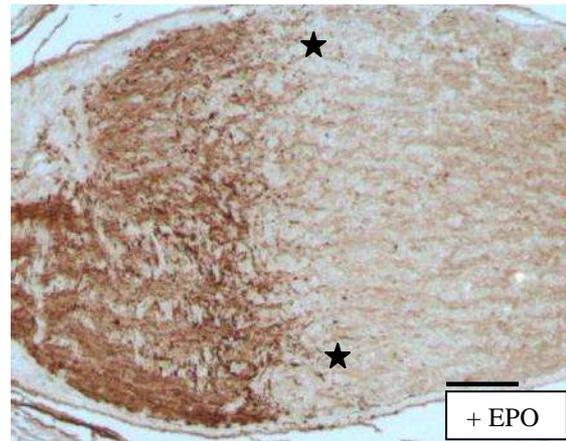
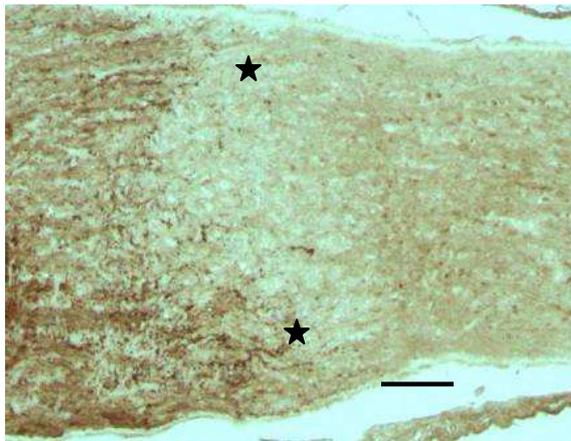


Abb. 7 Längsschnitt durch die Läsion im N.opticus, Färbung mit GAP-43, nach einer Woche (oben) und nach drei Wochen (unten)

Nach Implantation von EPO nach intravitreal (rechte Abbildung, oben) kommt es zu einer deutlichen Vermehrung der regenerierenden Axone (Stärke der GAP-43-Färbung) bis zur typischerweise zystisch degenerierten Läsionsstelle (markiert mit Sternen), es zeigt sich jedoch kein Wachstum über die Läsion nach distal. Beim Kontrolltier (linke Abbildung) zeigt sich proximal der Läsion nur eine schwache GAP-43-Anfärbung und ebenfalls kein Wachstum distal der Läsion. Drei Wochen nach Läsion und EPO-Applikation zeigt sich weiterhin eine deutliche Zunahme der GAP-43-Anfärbung (untere Bildreihe, rechts), während in den Kontrolltieren die Axone weitestgehend degeneriert sind (untere Bildreihe, links. Balken=100 µm).

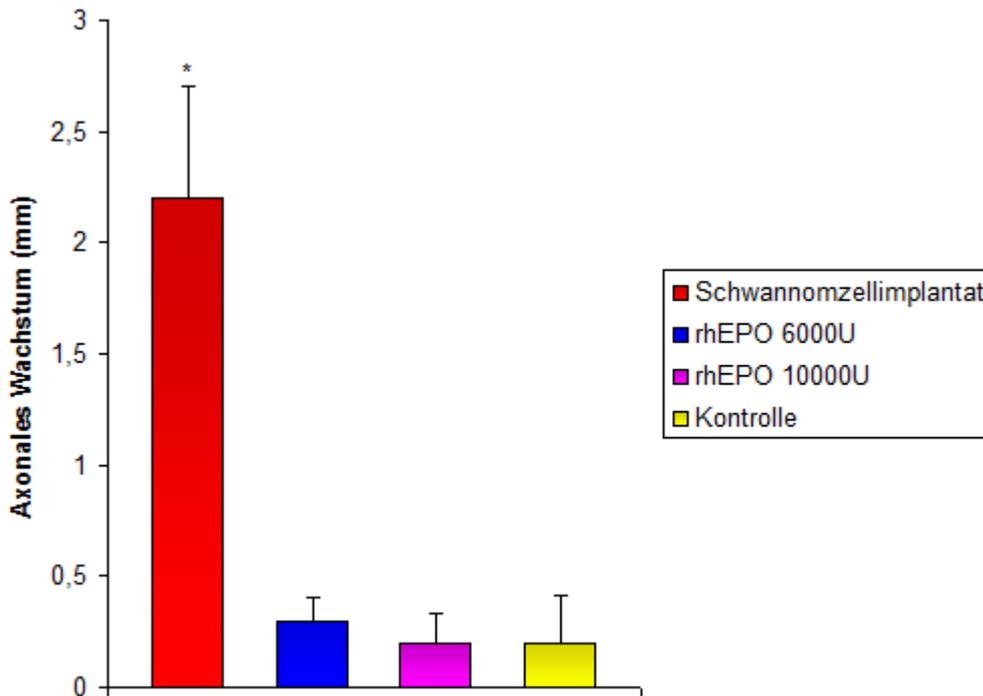


Abb. 8 Messung des Längenwachstums regenerierender Axone nach einer Quetschläsion des Nervus opticus

Durch die intravitreale Gabe von 6000 oder 10000 Einheiten (U) Erythropoietin lässt sich kein regeneratives Auswachsen von Axonen nach einer Quetschläsion des N. opticus erzielen, das sich signifikant von dem der Kontrollgruppe unterscheidet. Als Positivkontrolle dient die intravitreale Implantation eines Pellets Schwannomzellen, als Kontrolle die Implantation des Gelschwämmchens alleine (n=6 für alle Gruppen, *p<0,05).

Schlussendlich wird an den gequetschten Sehnerven geprüft, ob EPO möglicherweise einen Einfluss auf die im Bereich der Läsionsstelle typischerweise vorhandenen Mikrogliazellen zeigt.

Die Expression des ED-1 Markers (am ehesten entsprechend dem humanen CD68-Marker), der ein Antikörper gegen ein phagolysosomales Antigen in phagozytotisch aktivierter Mikroglia darstellt, wird in den mit rhEPO behandelten Tieren nicht im Vergleich zu Kontrolltieren gesteigert (Abb. 9).

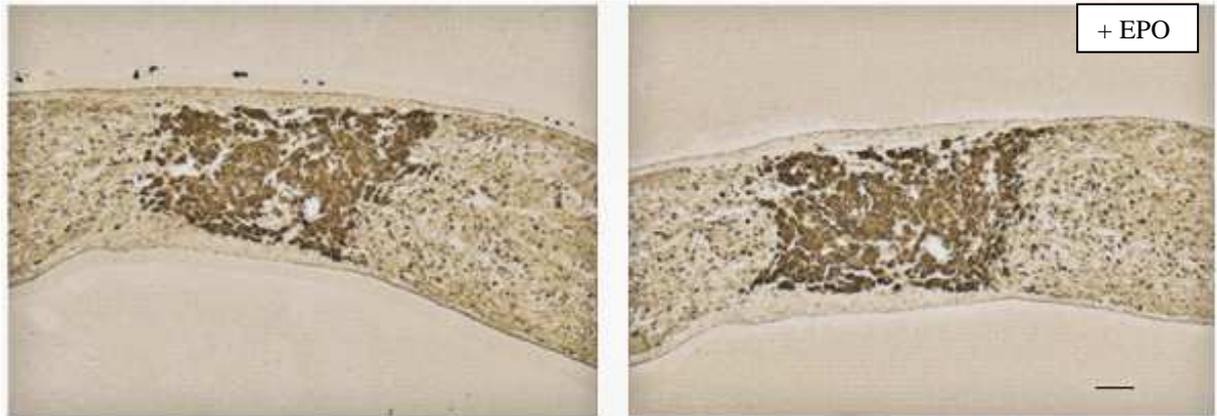


Abb. 9 Längsschnitt durch die Läsion im N. opticus, Färbung mit ED-1

Es zeigt sich kein Unterschied zwischen dem mit EPO behandelten Tier (rechts) und dem Kontrolltier (links). In jedem Fall kommt es zu einem deutlichen Nachweis aktivierter Mikroglia in der Läsion (Balken=100 μm).

5. Diskussion

Am Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation standen Befunde, dass das haematopoietische Zytokin Erythropoietin neuroprotektive Effekte unter Hypoxiebedingungen *in vitro* und *in vivo* ausübt, so zum Beispiel bei AMPA-vermittelter Zytotoxizität oder in einem Parkinson-Tiermodell.

Die im folgenden diskutierten Untersuchungen sollten neue Informationen über die Bedeutung des Zytokins Erythropoietin erbringen und klären, ob die neuroprotektiven Effekte auch auf die axonale Regeneration im adulten ZNS bei Mammaliern übertragen werden kann.

5.1 Einfluss von Erythropoietin auf die axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen *in vitro*

In diesen Experimenten wurde ein anerkanntes *in vitro*-Modell zur Untersuchung axonaler Regeneration im ZNS verwendet. Es wurden Explantatkulturen von Retinae postnataler Ratten verwendet. In einem dreidimensionalen Fibringel kultiviert, können die Axone der in dem Explantat enthaltenen Neurone auswachsen. Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden (Lucius et al. 1996), dass der Hauptteil dieser Axone denen retinaler Ganglienzellen entspricht. Die regenerative Potenz entspricht zum Zeitpunkt der Explantatgewinnung (postnataler Tag 11) der von adulten Nervenzellen. Deshalb befindet sich in den Kontrollkulturen, die in serumfreiem Medium kultiviert wurden, ein nur sehr begrenztes, abortives Wachstum. Zur Erklärung des abortiven Wachstums wurde unter anderem die Hypothese herangezogen, dass im ZNS im Gegensatz zum peripheren Nervensystem neurotrophe Faktoren praktisch nicht vorhanden sind. Werden adulte Neurone *in vitro* jedoch mit den entsprechenden wachstumsfördernden Substraten stimuliert, können auch diese Zellen Neuriten generieren. Für die hier verwendeten retinalen Ganglienzellen stellt BDNF (brain derived growth factor) einen solchen neurotrophen Faktor dar (Mansour-Robaey et al. 1994) und bewirkte in Positivkontrollen in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten ein deutliches axonales Wachstum. So konnte belegt werden, dass die im *in vitro*-Assay verwendeten zentralen Neurone in Gegenwart einer wachstumsfördernden Substanz zur Regeneration ihrer Axone befähigt werden.

Es gelang in den Experimenten nun erstmals einen direkten pro-regenerativen Effekt von Erythropoietin auf adulte Neurone im ZNS zu zeigen (Böcker-Meffert et al. 2002; s. Abschnitt 4.1). In einem anderen *in vitro*-Modell konnten unsere initialen Befunde an retinalen Ganglienzellen bestätigt werden (Kretz et al. 2005).

5.2 Nachweis des Erythropoietin-Rezeptors in der Retina und intrazelluläre Signalkaskade des Rezeptors

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die erzielte Wachstumssteigerung der zentralen Neurite durch die Wirkung von Erythropoietin auf den Erythropoietin-Rezeptor an retinalen Ganglienzellen vermittelt ist.

Eine Koinkubation mit den EPO-Rezeptor blockierenden Antikörpern konnte den pro-regenerativen Effekt von Erythropoietin vollständig aufheben. Ferner wurde transkribierte m-RNA des EPO-Rezeptorgens in der Retina postnataler Ratten nachgewiesen. Zusätzlich wurde der EPO-Rezeptor immunhistochemisch in der Retina nachgewiesen und hier zeigte sich die stärkste Färbung in der Schicht der retinalen Ganglienzellen.

Studien, in denen andere Zellpopulationen untersucht wurden und Arbeiten von Assandri et al. 1999 mit Neuroblastomzellen lassen vermuten, dass die EPO-vermittelte Regulation von Calciumströmen für die hervorgerufene Wachstumssteigerung der Axone verantwortlich ist. Calcium scheint eine Schlüsselrolle im Prozess des axonalen Wachstums und der Wachstumskegel-Steuerung zu spielen. Darauf lassen auch die Ergebnisse in unserem experimentellen Ansatz schließen: so konnten wir durch Koinkubation mit dem T-Calciumkanal-Blocker Ethosuximid die progenerative Wirkung von Erythropoietin aufheben.

Bei einer Phaeochromozytomzelllinie der Ratte (PC12) konnte durch Erythropoietin eine calciumabhängige Zunahme einer mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) hervorgerufen werden (Koshimura et al. 1999). Dieser Mechanismus könnte bei der calciumabhängigen, durch Erythropoietin verursachten Wachstumszunahme eine Rolle spielen.

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass ein weiterer wichtiger Bestandteil der EPO-Signaltransduktion die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Signaltransduktoren- und Transkriptionsaktivatorenfamilie (STATs) darstellt (Coffer et al., 2000).

Das durch die Bindung von EPO an den Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R) induzierte Signal ist einer der bedeutendsten Schritte in der Kontrolle der EPO-Wirkung. Klinische und vor allem hämatologische Studien, zusammen mit Analysen experimenteller Tiermodelle, haben dazu beigetragen, molekulare Aspekte im die vom EPO/EPO-R regulierten System aufzuklären. Die fötale Leber von genetisch modifizierten EPO- oder EPO-R-defizienten Mäusen hat zwar eine normale Anzahl erythrozytärer Vorläuferzellen (Burst forming unit-erythroids, BFU-Es), jedoch keine reiferen erythroiden Zellen. Das bedeutet, dass das EPO-Signalsystem für die frühe Zelllinienspezialisierung unbedeutend, aber für die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen zu reifen Zellen essentiell ist (Wu et al. 1995; Zang et al. 2001).

Der EPO-R gehört zur Familie der Zytokinrezeptoren. Er besteht aus einer extrazellulären Domäne mit cysteinreichen Regionen und WSXWS-Motiven (Charakteristisch für Zytokinbindungsmodule sind vier konservierte Cysteinreste in der amino-terminalen und ein WSXWS, W: Tryptophan, S: Serin, X: beliebig,-Motiv in der carboxy-terminalen FNIII-Domäne), welche für die korrekte Faltung und Stabilisierung des EPO-R bedeutend sind. Einer Transmembranregion folgt der zytoplasmatische Teil mit zunächst zwei Regionen (Box1 und Box2), welche für die Bindung der Janus-Protein-Tyrosinkinase Jak2 und der Interaktion mit anderen Zytokinrezeptoren eine Rolle spielen. Der EPO-R besitzt keine intrinsische Enzymaktivität, sondern ist mit Tyrosinkinasen komplexiert. Den beiden EPO-R-Boxen folgt ein langer Proteinabschnitt mit acht Tyrosinresten.

Es gibt zwei Modelle für die Aktivierung des EPO-R. Im ersten bindet der EPO-R das Hormon EPO, was zur Dimerisierung des Rezeptors führt. Dadurch werden die konstitutiv an den EPO-R gebundenen Jak2-Kinaseproteine nah zusammen gebracht und durch Autotransphosphorylierung aktiviert (Witthuhn et al. 1993).

Andere Publikationen vertreten ein Modell, bei dem der EPO-R bereits im inaktiven Zustand als Dimer vorliegt und EPO-Bindung lediglich eine Konformationsänderung verursacht, die letztendlich zur Aktivierung der Jak2-Proteine führt (Constantinescu

et al. 2001; Livnah et al. 1999). Die aktiven Jak2-Proteine phosphorylieren nachfolgend Tyrosine im zytoplasmatischen Teil des EPO-R, was Proteinen mit sogenannten Src-Homologie-2-Domänen (src homology domain 2, SH2) die Bindung ermöglicht. Die Unterdrückung der Jak2-Genexpression in Mäusen führt zum Tod während der Embryonalentwicklung (Parganas et al. 1998). Dabei ist die Zellzahl in der fötalen Leber als auch die der erythroiden Vorläuferzellen stark reduziert, was zeigt, dass im Gegensatz zum EPO-R die Jak2-Kinase bereits in früheren Stadien der erythropoietischen Entwicklung absolut notwendig ist. Jak2 ist vermutlich nicht die einzige Tyrosinkinase, die durch EPO aktiviert werden kann. So zeigten Studien in Zelllinien, dass die Src-Tyrosinkinase Lyn eine Rolle in der EPO-induzierten Differenzierung spielen könnte (Tilbrook et al. 1997). Lyn-defiziente Mäuse haben jedoch keinen offensichtlichen Defekt in der Erythropoese, so dass weiterhin unklar ist, ob Lyn oder vielleicht auch andere Src-Kinasen im EPO-induzierten Signalsystem von Bedeutung sind.

Eine Hauptaufgabe von EPO ist der Schutz von erythroiden Vorläuferzellen vor Apoptose (programmierter Zelltod). Abbildung 8 zeigt eine stark vereinfachte Übersicht der wichtigsten EPO-induzierten Signalwege.

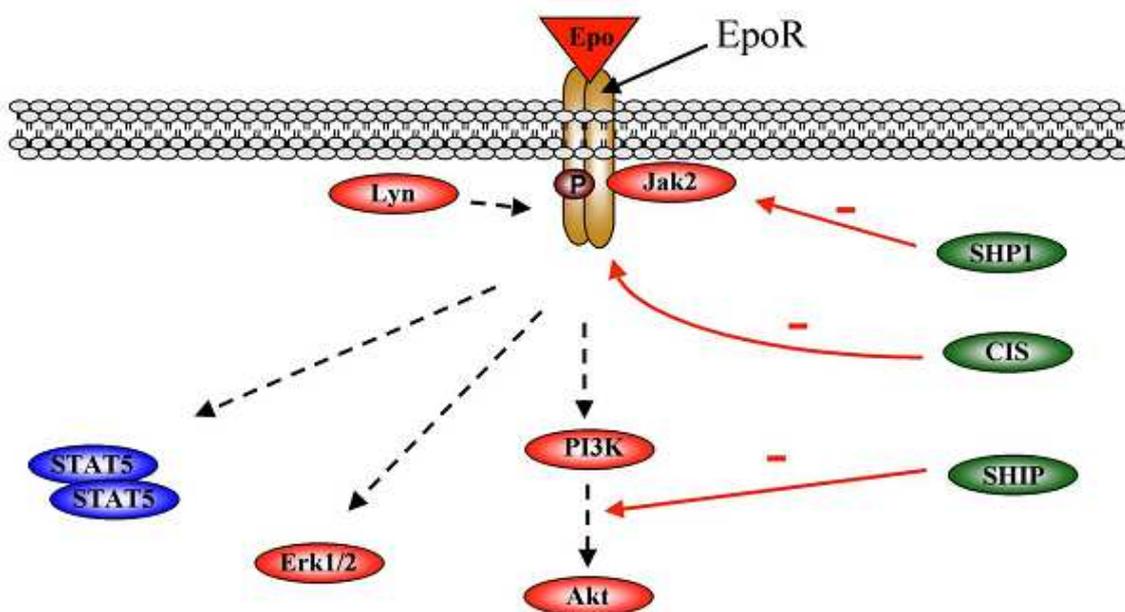


Abb. 10 Vereinfachte Darstellung EPO-induzierter Signalereignisse

EPO bindet an den EPO-R und Jak2 wird aktiviert, was wiederum zur Phosphorylierung des EPO-R führt. Dies führt zur Rekrutierung von Proteinen und der Aktivierung von Signalkaskaden die anti-apoptotische und/oder proliferative Effekte haben. Auch werden negative Rückkopplungsprozesse aktiviert. (nähere Erläuterungen im Text); *modifiziert nach E. K. Schmidt, EPO-induzierte Signalwege.*

Der Transkriptionsfaktor „signal transducer and activator of transcription 5“ (STAT5) bindet über seine SH2-Domäne an den aktivierten EPO-R, wo er dann phosphoryliert wird. Anschließend löst sich STAT5 vom EPO-R und formt mit einem anderen phosphorylierten STAT5-Molekül ein Dimer. Dieser aktive Komplex wandert direkt in den Zellkern, um die Transkription spezifischer Gene (z.B. *cis1*, *pim1*, *bcl-x*) zu regulieren (Damen et al. 1995; Gobert et al. 1996; Klingmuller et al. 1996; Teglund et al. 1998). In Mäusen mit einem Defekt in der STAT5-Expression kann das Überleben früher Erythroblasten nicht ausreichend gewährleistet werden, was zur Anämie führt. Auch bleibt die verstärkte Bildung von Erythrozyten als Antwort der Erythropoese auf starken Blutverlust oder anderen Stress-induzierten Situationen aus. Das Fehlen von STAT5 ist nicht letal, da vermutlich Mechanismen, wie die Hochregulierung von STAT1 und STAT3, diesen Defekt kompensieren können oder andere Signalwege unter Normalbedingungen für die Entwicklung der Erythroblasten ausreichend sind (Socolovsky et al. 1999).

In der erythroiden Entwicklung spielt die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) eine zentrale anti-apoptotische Rolle (Haseyama et al. 1999) und ist zusätzlich an der EPO-induzierten mitogenen Antwort beteiligt (Wickrema et al. 1999). PI3Ks werden in 3 Klassen unterteilt, wobei soweit bisher bekannt nur die Klasse 1 (PI3K α , β , γ , δ) in der Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen von Bedeutung ist. Die Funktion der Klasse 2 PI3Ks ist zurzeit unklar. Die PI3Ks der Klasse 3 werden dagegen nicht durch Rezeptoren reguliert und sind am intrazellulären Membrantransport und der zytosolischen Vesikelzuordnung beteiligt.

Die Klasse 1 PI3Ks sind heterodimere Proteine und bestehen aus einer 110 kDa großen katalytischen Untereinheit (p110) und einer konstitutiv assoziierten kleinen regulatorischen Untereinheit. Diese Klasse kann weiter unterteilt werden; während die Klasse 1a PI3Ks (α , β , δ) p85-Untereinheiten besitzen, hat die Klasse 1b PI3K γ keine N-terminale p85-Bindungsstelle, sondern assoziiert mit einer der p85 nicht verwandten p101-Untereinheit, welche keine erkennbaren Protein-Protein-Interaktionsmotive besitzt. SH2-Domänen in der p85-Untereinheit binden an spezifische Phosphotyrosinreste innerhalb des EPO-R oder an andere Signalproteine, was zur Aktivierung der PI3K führt und den zytosolischen Komplex an die Zellmembran rekrutiert, wo er das membranständige Substrat Phosphatidylinositol-3,4-phosphat (PIP₂) phosphorylieren kann. Klasse 1a PI3Ks

können auch direkt durch GTP-beladene Formen von Ras (*Rat sarcoma-Proto-Onkogen*) stimuliert werden (Stephens et al. 2000; Vanhaesebroeck et al. 2001). Klasse 1b PI3K wird z.B. direkt durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine aktiviert, wobei die regulatorische Untereinheit p101 an $G\beta\gamma$ bindet. p110 γ oder p101/p110 γ können ebenfalls direkt durch Ras-GTP aktiviert werden (Stephens et al. 2000). Das Produkt der Phosphorylierung von membranständigem PIP₂ durch PI3K ist Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat (PIP₃). PIP₃ kann als sekundärer Botenstoff die Rekrutierung zytosolischer Proteine mit PH-Domänen an die Zytoplasmamembran vermitteln. Es ist ebenfalls beschrieben, dass PIP₃ direkt Enzyme, wie Proteinkinase B (Akt) (Bos 1995; Franke et al. 1997) oder Proteinkinase C (PKC) (Moriya et al. 1996; Toker et al. 1994) aktivieren kann. Ein anderer PIP₃-regulierter Signalweg führt zur Ras-abhängigen Erk-Aktivierung (Klingmüller et al. 1997). Verschiedene negative Regulatorproteine werden durch den aktivierten EPO-R rekrutiert. So dephosphoryliert und inaktiviert die Phosphatase SH2-Domäneenthaltendes Protein 1 (SHP1) die Tyrosinkinase Jak2 (Klingmüller et al. 1995). CIS, ein kleines Protein mit einer SH2-Domäne blockiert durch Bindung an phosphorylierte Tyrosine des EPO-Rs Bindungsstellen für andere Proteine (Sokol et al. 1994). Die SH2-enthaltende Inositol-5-Phosphatase (SHIP) ist nach EPO-R-Aktivierung ebenfalls tyrosinphosphoryliert und kann PIP₃ dephosphorylieren (Constantinescu et al. 1999). SHIP reguliert somit die PI3K-induzierten Signalwege. Viele der oben beschriebenen EPO-Signalwege sind inzwischen auch in den Fokus der neurobiologischen Forschung gerückt:

Wird Erk durch PD 98059 (2'-amino-3'-Methoxyflavon) ausgeschaltet, zeigte sich in einem Modell ketamininduzierter Apoptose kultivierter Neurone, dass die neuroprotektive Wirkung von EPO nicht vermindert wird. (Wu et al. 2007). Wird dagegen PI3K durch den Kinaseninhibitor LY294002 ausgeschaltet, ist die neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin aufgehoben (Kretz et al. 2005; Shang et al. 2007, 2008). Es ist wahrscheinlich, dass die EPO-induzierte Neuroprotektion über den PI3K-Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

Zunächst ist man davon ausgegangen, dass die Regulierung der Expression des EPO-Gens durch den HIF-2 (Hypoxia induced factor) vermittelt wird (Warnecke et al. 2004; Eckardt und Kurtz 2005). Neuere Studien konnten zeigen, dass im Zusammenhang mit EPO-induzierter Neuroprotektion vor allem die Regulierung der

EPO-Genexpression durch HIF-1 entscheidend ist (Bonello et al 2007; Mengozzi et al. 2008; Übersicht bei Maurer et al. 2008).

5.3 Einfluss von Erythropoietin auf die axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen *in vivo*

Frühere Arbeiten konnten für das Läsionsmodell des Nervus opticus zeigen, dass das Einbringen von Zellen in den Glaskörper, die neurotrophe Faktoren sezernieren, ein deutliches Wachstum von Axonen über die Läsionsstelle hinaus hervorruft (Berry et al. 1996; 1999). Nach intracranieller Läsion des Nervus opticus konnte demonstriert werden, dass die auswachsenden Axone sogar das Chiasma opticum korrekt kreuzen und ihre ursprüngliche Wachstumsrichtung wiederfinden (Berry et al. 1999).

Um der Frage nachzugehen, ob die Stimulation des Erythropoietinrezeptors auch *in vivo* die axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen fördern kann, wurde nach der intraorbitalen Quetschläsion des Nervus opticus Erythropoietin in einem Gelschwamm intravitreal appliziert und die Regenerationsfähigkeit der retinalen Ganglienzellen über die Läsionsstelle hinaus nach einer und drei Wochen Überlebenszeit bestimmt.

Die Quantifizierung der EPO-induzierten Neuritenaussprossung erfolgte durch Färbung der Axone der retinalen Ganglienzellen gegen GAP-43 (growth associated protein 43). GAP-43 ist ein Phosphoprotein des Wachstumskegels und identifiziert diejenigen Nervenzellen, die zu einer regenerativen Antwort befähigt sind (Schaden et al. 1994). Während die Überexpression von GAP-43 das Wachstum neuer Neuriten induziert (Aigner et al. 1995), bewirkt die Abwesenheit dieses Proteins eine Instabilität des Wachstumskegels und eine schlechte Adhärenz der gebildeten Axone in ihrem Substrat (Aigner und Caroni 1995). Die Stärke der GAP-43-Expression nach Axotomie ist proportional zur regenerativen Potenz der verletzten Nervenzelle (Doster et al. 1991). Die Applikation von Erythropoietin bewirkte eine im Vergleich zu kontrollierten Tieren deutlich gesteigerte Expression von GAP-43 im Nervus opticus proximal der Läsion (besonders deutlich nach drei Wochen), was auf eine verstärkte regenerative Kapazität der Nervenzellen nach EPO-Behandlung

hinweist. Auch ein vermehrtes Überleben/Schutz vor Apoptose (Kretz et al. 2005) retinaler Ganglienzellen könnte zusätzlich zu diesem Effekt beitragen. Es war allerdings, ebenso wie in der Gruppe der Kontrolltiere, keine über ein abortives Wachstum über die Läsionsstelle nach distal hinausgehende Regeneration nachzuweisen.

Ein weiterer Grund für die gesteigerte GAP-43-Expression könnte in einer EPO-vermittelten verbesserten Angiogeneese liegen. Dies konnte im *in vivo*-Versuch nicht sicher ausgeschlossen werden, erklärt aber nicht das verbesserte axonale Wachstum *in vitro*. Weitere indirekte Effekte könnten auch über die retinale Glia, die Müller-Zellen der Netzhaut, vermittelt werden. Bislang fehlen jedoch Studien, die eine regenerationsfördernde Wirkung dieser Zellen zum Beispiel durch die Freisetzung neurotropher Faktoren wie BDNF auf retinale Ganglienzellen zeigen. In Kokultorexperimenten wurde sogar ein eher toxischer Effekt der Müller-Glia beschrieben (Kashiwagi et al. 2001).

Es ist bekannt, dass Verletzungen des vorderen Augenabschnittes, insbesondere der Iris, zu einem verbesserten Überleben axotomierter retinaler Ganglienzellen führen (Mansour-Robaey et al. 1994). Leon und Mitarbeiter konnten 2000 nachweisen, dass bei Verletzungen der Linsenkapsel intravitreal neurotrophe Faktoren freigesetzt werden, die eine deutliche Verbesserung der axonalen Regeneration auch über die Läsionsstelle hinaus bewirken. In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Experimenten daher ein Zugang zur Orbita und zum hinteren Corpus vitreum von lateral gewählt, in dem eine Verletzung der Linse, Hornhaut oder der Regenbogenhaut unwahrscheinlicher ist, da die vorderen Augenabschnitte unangetastet bleiben.

Einflüsse der Trägermatrix (Kollagen) wurden dadurch ausgeschaltet, dass die Kontrollgruppe nur das Gelschwämmchen ohne Erythropoietin implantiert bekam.

Eine weitere Erklärung für die neuroprotektive Wirkung von EPO kann darin liegen, dass EPO durch Wirkung auf die gliale Umgebung nach einer Läsion ein neuroprotektives Milieu schafft.

Eine anti-inflammatorische Wirkung von Erythropoietin, wie sie von Agnello und Mitarbeitern (2002) an einem Tiermodell zur Multiplen Sklerose beschrieben wurde, scheint hier keine Rolle zu spielen: in der ED1-Färbung ließ sich keine Steigerung

oder Verminderung der Rekrutierung von Mikrogliazellen an der Läsionsstelle nachweisen.

Weiterhin zeigen Arbeiten aus unserem Labor (Wilms et al. 2009, in Revision), dass Mikrogliazellen zwar den EPO-Rezeptor besitzen, EPO aber keine anti-inflammatorische Wirkung zeigt.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das anfänglich lediglich in der Erythropoese für wichtig erachtete Zytokin Erythropoietin zeigte in vielen Studien auch neuroprotektive Wirkungen und wird sogar schon in ersten klinischen Studien zur Behandlung von Schlaganfallpatienten eingesetzt. Da die Neuroprotektion die unabdingbare Voraussetzung für nachfolgende regenerative Prozesse zur Wiederherstellung der Integrität und Konnektivität des ZNS ist, sollte in dieser Arbeit die Hypothese geprüft werden, ob EPO auch die Regeneration zentraler Neurone *in vitro* und *in vivo* begünstigt. Während die Hypothese *in vitro* anhand eines Retina-Stanzen-Bioassays bestätigt werden konnte, gelang *in vivo* anhand des Modells der Quetschläsion des Sehnerven keine Bestätigung der *in vitro*-Ergebnisse, da es den Fasern nicht gelang, die sich nach einer Verletzung bildende gliale Narbe zu überwinden. Bemerkenswert ist aber, dass EPO die Regeneration im proximalen Stumpf des Sehnerven deutlich verbesserte und über einen längeren Zeitraum aufrecht erhielt, so dass man schließen kann, dass eine Kombinationstherapie mit anderen Faktoren eher als die alleinige EPO-Gabe notwendig sein kann, um die funktionelle Regeneration zu fördern. Ansatzpunkte sind dabei einerseits die Verhinderung oder Reduktion der Glianarbe, die Beeinflussung inhibierender Moleküle sowie die Manipulation intrinsischer Wachstumsprogramme im Neuron selbst.

Da EPO von Patienten gut toleriert wird und ein sehr gutes Sicherheitsprofil aufweist, existieren gute Grundvoraussetzungen, um EPO oder EPO-Derivate in naher Zukunft nicht nur als neuroprotektive, sondern auch regenerationsstimulierende Substanz am Patienten einzusetzen.

7. Literaturverzeichnis

Agnello D., Bigini P., Villa T., Menini A., Cerami ML., Brines P., Ghezzi P. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 2002; 952: 128-134

Aigner L., Arber S., Kapfhammer JP., Laux T., Schneider C., Botteri F., et al. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell.* 1995; 83: 269-78

Aigner L., Caroni P. Absence of persistent spreading, branching and adhesion in GAP-43-depleted growth cones. *J. Cell Biol.* 1995; 128: 647-60

Allcutt D., Berry M., Sievers J. A qualitative comparison of the reactions of retinal ganglion cell axons to optic nerve crush in neonatal and adult mice. *Brain Res.* 1984; 318: 231-240.

Allcutt D., Berry M., Sievers J. A quantitative comparison of the reactions of retinal ganglion cell axons to optic nerve crush in neonatal and adult mice. *Brain Res.* 1984; 318: 219-230.

Archer FR., Doherty P., Collins D., Bolsover SR. CAMs and FGF cause a local submembrane calcium signal promoting axon outgrowth without a rise in bulk calcium concentration. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11: 3565-3573.

Assandri R, Egger M, Gassmann M, Niggli E, Bauer C, Forster I, Gorlach A. Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line. *J. Physiol.* 1999 Apr 15; 516: 343-52.

Bähr M., Eschweiler GW., Wolburg H. Precrushed sciatic nerve grafts enhance the survival and axonal regrowth of retinal ganglion cells in adult rats. *Exp. Neurol.* 1992; 116: 13-22

Banati RB., Gehrman J., Schubert P., Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia*. 1993; 7: 111-118

Banker GA. Trophic interactions between astroglia and hippocampal neurons in culture. *Science*. 1980; 209: 809-810

Barber PC. Axonal growth by newly-formed vomeronasal neurosensory cells in the normal adult mouse. *Brain Res*. 1981; 216: 229-237.

Bauer HC., Tontsch U. Glia-conditioned medium and attachment to ConA are essential for long-term culture of cortical neurons. *Int. J. Devl. Neurosci*. 1990; 8: 151-158

Beckh S., Müller HW., Seifert, W. Neurotrophic and neurite promoting activities in astroglial conditioned medium. *Cell Biology*. 1987; 2: 385-406

Berman DH., Friedmann EA. Partial absorption of hard exudates in patients with diabetic endstage renal disease and severe anemia after treatment with erythropoietin. *Retina*. 1994; 14: 1-5

Berry M., Rees L., Sievers J. Regeneration of axons in the mammalian visual system. *Brain Res*. 1986a; 13: 18-33

Berry M., Rees L., Sievers J. Unequivocal regeneration of rat optic nerve axons into sciatic nerve isografts. In: Wallace, R; Das G.D. (Hrsg.) *Neural tissue transplantation research*. Springer, New York 1986b; 63-79

Berry M., Carlile J., Hunter A., Tsang W., Rosenstiel P., Sievers J. Optic nerve regeneration after intravitreal peripheral nerve implants: trajectories of axons regrowing through the optic chiasm into the optic tracts. *J. Neurocytol*. 1999 Sep; 28: 721-41.

Bianchi R., Buyukakilli B., Brines M., Savino C., Cavaletti G., Oggioni N., Lauria G., Borgna M., Lombardi R., Cimen B., Comelekoglu U., Kanik A., Tataroglu C., Cerami

A., Ghezzi P. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101: 823-8

Björklund A., Stenevi U. 1979. Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 1979; 59: 62-100

Björklund A., Stenevi U. *Neural grafting in the mammalian CNS*, Oxford: Elsevier Amsterdam, New York, 1985

Björklund A., Stenevi U., Svenggaard NA. Growth of transplanted monoaminergic neurons into the adult hippocampus along the perforant path. *Nature*, 1976; 262: 787-791

Björklund A., Stenevi U. Intracerebral neural implants: Neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Annu. Rev. Neurosci.* 1984; 7: 279-308

Böcker-Meffert S., Rosenstiel P., Röhl C., Warneke N., Held-Feindt J., Sievers J., Lucius R. Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43: 2021-6

Bonello S., Zähringer C., Bel Aiba RS., Djordjevic T., Hess J., Michiels C., Kietzmann T., Görlach A. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 755-61

Bos JL. A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB. *Trends Biochem. Sci.* 1995; 20: 441-442.

Cafferty WB., McGee AW., Strittmatter SM. Axonal growth therapeutics: regeneration or sprouting or plasticity? *Trends Neurosci.* 2008 May;31(5):215-20. Epub 2008 Apr 7

Caroni P., Schwab ME. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron.* 1988a; 1: 85-96

Caroni P., Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties and for neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell. Biol.* 1988b; 106: 1281-1288

Carulli D., Laabs T., Geller HM., Fawcett JW. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2005; 15: 116-20

Cassel JC., Kelche C., Majchrzak M., Will BE. Factors influencing structure and function of intracerebral grafts in the mammalian brain: a review. *Rest. Neurol. Neurosci.* 1992; 4: 65-96

Chen MS., Huber AB., van der Haar ME., Frank M. Schnell L., Spillmann AA., Christ F., Schwab ME. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature.* 2000; 403: 369-70

Chomczynski P. Sacchi N. Single-step method of isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162:156-9

Coffer PJ., Koendermann L., de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukaemia. *Oncogene.* 2000; 15: 2511-2522

Constantinescu SN., Ghaffari S., Lodish HF. The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol. Metab.* 1999; 10: 18-23.

Constantinescu SN., Keren T., Socolovsky M., Nam H., Henis YI., Lodish HF. Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 4379-4384.

Dallner C., Woods AG., Deller T., Kirsch M., Hofmann HD. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia.* 2002; 37: 374-8

Damen JE., Wakao H., Miyajima A., Krosi J., Humphries RK., Cutler RL. Krystal G. Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *EMBO J.* 2001; 14: 5557-5568.

David S., Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. 1981; 214: 931-933

Dawson VL., Dawson TM., London ED., Bredt DS., Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate toxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 6368-6371

Dellmann, HD. Degeneration and regeneration of neurosecretory systems. *Int. Rev. Cytol.* 1973; 36: 215-315

Demidov V., Frank-Kamenetskii MD. Egholm M., Buchardt O., Nielsen PE. Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21: 2103-7

Dijkstra CD., Döpp EA., Joling P., Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology.* 1985; 54: 589-99

Doherty P., Williams G., Williams EJ. CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol. Cell. Neurosci.* 2000; 16: 283-295

Doster SK., Lozano AM., Aguayo AJ., Willard MB., Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury. *Neuron.* 1991; 6: 635-47

Eckardt KU., Kurtz A. Regulation of erythropoietin production. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005; 35: 13-9. Review

Ehrenreich H., Hassellatt M., Dembowski C., Cepek L., Lewczuk P., Stiefel M., Rustenbeck HH., Breiter N., Jacob S., Knerlich F., Bohn M., Poser W., Rüter E., Kochen M., Gefeller O., Gleiter C., Wessel TC., De Ryck M., Itri L., Prange H., Cerami A., Brines M., Sirén AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol. Med.* 2002; 8: 495-505

Ehrenreich H., Timmer W., Sirén AL. A novel role for an established player: anemia drug erythropoietin for the treatment of cerebral hypoxia/ischemia. *Transfus. Apher. Sci.* 2004; 31: 39-44

Ehrenreich H., Hinze-Selch D., Stawicki S., Aust C., Knolle-Veentjer S., Wilms S., Heinz G., Erdag S., Jahn H., Degner D, Ritzen M., Mohr A., Wagner M., Schneider U., Bohn M., Huber M., Czernik A., Pollmächer T., Maier W., Sirén AL., Klosterkötter J., Falkai P., Rüter E., Aldenhoff JB., Krampe H. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol. Psychiatry.* 2007; 12: 206-20

Ehrenreich H., Fischer B., Norra C., Schellenberger F., Stender N., Stiefel M., Sirén AL., Paulus W., Nave KA., Gold R., Bartels C. Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2007; 130: 2577-88

Emerich DF., Bruhn S., Chu Y., Kordower JH. Cellular delivery of CNTF but not NT-4/5 prevents degeneration of striatal neurons in a rodent model of Huntington's disease. *Cell Transplant.* 1998; 7: 213-25

Franke TF., Kaplan DR., Cantley LC., Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science.* 1997; 275: 665-668

Friedmann B., Aguayo AJ. Injured neurons in the olfactory bulb of the adult rat grow axons along grafts of peripheral nerve. *J. Neurosci.* 1985; 5: 1616-1625

Genc S., Kuralay F. Genc K., et al. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL micr through increasing nitric oxide production. *Neurosci. Lett.* 2001; 298: 139-141

Giulian D., Chen J., Ingeneman JE., George JK., Nojonen M. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. *J Neurosci.* 1989; 9: 4416-4429

Giulian D. Microglia and disease of the central nervous system. *Curr. Topics Neurol.* 1992; 12: 23-54

Gobert S., Chretien S., Gouilleux F., Muller O., Pallard C., Dusanter-Fourt I., Groner B., Lacombe C., Gisselbrecht S. and Mayeux P. Identification of tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor crucial for STAT5 activation. *EMBO J.* 1996; 15: 2434-2441

Gorio A., Gokmen N., Erbayraktar S., Yilmaz O., Madaschi L., Cichetti C., Di Giulio AM., Vardar E., Cerami A., Brines M. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 14: 9450-5

GrandPré T., Nakamura F., Vartanian T., Strittmater SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature.* 2000; 403: 439-44

Green SJ., Nacy CA., Meltzer MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: A protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *J. Leuk.Biol.* 1991; 50: 93-103

Gudiño-Cabrera G., Nieto-Sampedro M. Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia.* 2000; 30: 49-63

Hagg T., Quon D., Higaki J., Varon S. Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. *Neuron.* 1992; 8: 145-158

Haseyama Y., Sawada K., Oda A., Koizumi K., Takano H., Tarumi T., Nishio M., Handa M., Ikeda Y., Koike T. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. *Blood*. 1999; 94: 1568-1577

Hausmann B., Sievers J., Hermanns J., Berry M. regeneration of axons from the adult rat optic nerve: influence of fetal brain grafts, laminin and artificial basement membrane. *J. Comp. Neurol.* 1989; 281: 447-466

Huang H., Wang H., Chen L., Gu Z., Zhang J., Zhang F., Song Y., Li Y., Tan K., Liu Y., Xi H. Influence factors for functional improvement after olfactory ensheathing cell transplantation for chronic spinal cord injury. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2006 Apr;20(4): 434-8.

Huang H., Chen L., Xi H., Wang H., Zhang J., Zhang F., Liu Y. Fetal olfactory ensheathing cells transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients: a controlled pilot study. *Clin. Transplant*. 2008 Jul 31.

Ip NY, Yancopoulos GD. The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* 1996; 19: 491-515. Review

Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic brain damage. *Acta Paediatr. Suppl.* 2002; 91: 36-42

Kafitz KW. und Greer CA. Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia*. 1999; 25: 99-110

Kashiwagi K., Iizuka Y., Araie M., Suzuki Y., Tsukahara S. Effect of retinal glial cells on isolated rat retinal ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42: 2686-94

Kesslak JP., Nieto-Sampedro M., Globus J., Cotman CW. Transplants of purified astrocytes promote behavioural recovery after frontal cortex ablation. *Exp. Neurol.* 1986; 92: 377-390

Kiernan JA.. Hypotheses concerned with axonal regeneration in the mammalian nervous system. *Biol. Rev.* 1978; 54: 155-197

Klingmuller U. (1997) The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells-signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur. J. Biochem.* 1997; 249: 637-647.

Klingmuller U., Bergelson S., Hsiao JG., Lodish HF. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 8324-8328.

Klingmuller U., Lorenz U., Cantley LC., Neel BG., Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell.* 1995; 80: 729-738.

Klingmuller U., Wu H., Hsiao JG., Toker A., Duckworth BC., Cantley LC., Lodish HF. Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 3016-3021.

Koshimura K., Murakami Y., Sohmiya M., Tanaka J., Kato Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J. Neurochem.* 1999; 72: 2565-2572

Kottis V., Thibault P., Mikol D., Xiao ZC., Zhang R., Dergham P., Braun PE. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 2002; 82: 1566-9

Kretz A., Happold CJ., Marticke JK., Isenmann S. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. *Mol Cell Neurosci.* 2005; 29(4): 569-79.

Kromer LF., Björklund A., Stenevi U. Innervation of embryonic hippocampal implants by regenerating axons of cholinergic septal neurons in the adult rat. *Brain Res.* 1981a; 210: 153-171

Kromer LF., Björklund A., Stenevi U. Regeneration of the septohippocampal pathways in adult rats is promoted by utilizing embryonic hippocampal implants as bridges. *Brai Res.* 1981b; 210: 173-200

Kromer LF., Cornbrooks CJ. Transplants of Schwann cell cultures promote axonal regeneration in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 82: 6330-6334

Laabs T., Wang H., Katagiri Y., Mc Cann T., Fawcett JW., Geller HM. Inhibiting glycosaminoglycan chain polymerization decreases the inhibitory activity of astrocyte-derived chondroitin sulfate proteoglycans. *J. Neurosci.* 2007; 27: 14494-501

Liesi P., Dahl D., Vaheri A. Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *J. Cell Biol.* 1983; 96: 920-924

Lindsay RM. Adult rat brain astrocytes support survival of both NGF-dependent and NGF-insensitive neurons. *Nature.* 1979; 282: 80-82

Liu XB., Wang JA., Yu SP., Keogh CL., Wei L. Therapeutic strategy of erythropoietin in neurological disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2008; 7: 227-34

Livnah O., Stura EA., Middleton SA., Johnson DL., Jolliffe LK., Wilson IA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science.* 1999; 283: 987-990.

Liuzzi FJ., Lasek RJ. Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science.* 1987; 237: 642-645

Lochter A., Vaughan L., Kaplony A., Prochiantz A., Schachner M., faissner A. J1/tenascin in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 1991; 113: 1159-1171

Lucius R., Sievers J. Postnatal retinal ganglion cells in vitro: protection against reactive oxygen species (ROS)-induced axonal degeneration by cocultured astrocytes. *Brain Res.* 1996; 743: 56-62

Lucius R., Gallinat S., Rosenstiel P., Herdegen T., Sievers J., Unger T. The angiotensin type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 661-670

Mansour M., Asher A., Dahl D., Labkowsley B., Perides G., Bignami A. Permissive and non-permissive reactive astrocytes: Immunofluorescence study with antibodies to the glial hyaluronat-binding proteins. *J. Neurosci. Res.* 1990; 25: 300-311

Mansour-Robaey S., Clarke DB., Wang YC., Bray GM. Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 1632-6

Marletta MA. Nitric oxide: Biosynthesis an biological significance. *Topics Biol. Sci.* 1989; 14: 488-492

Marti HH., Bernaudin M., Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: Dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol. Sci.* 2000; 15: 225-229

Maurer MH., Schäbitz WR., Schneider A. Old friends in new constellations--the hematopoetic growth factors G-CSF, GM-CSF, and EPO for the treatment of neurological diseases. *Curr Med Chem.* 2008;15(14):1407-11

Mc Connel P., Berry M. Regeneration of ganglion cell axons in the adult mouse retina. *Brain Res.* 1982; 241: 362-365

Mc Conell P., Berry M., Rees EL., Sievers J. The injury response of nerve fibres in the anterior medullary velum of the rat. *Brain Res.* 1984; 323: 257-268

Mc Kerracher L., David S., Jackson DL., Kottis V., Dunn RJ., Braun PE. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*. 1994; 13: 805-11

Mengozi M., Cervellini I., Bigini P., Martone S., Biondi A., Pedotti R., Gallo B., Barbera S., Mennini T., Boraso M., Marinovich M., Petit E., Bernaudin M., Bianchi R., Viviani B., Ghezzi P. Endogenous erythropoietin as part of the cytokine network in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis.

Mol. Med. 2008; 14: 682-8

Mittoux V., Joseph JM., Conde F., Palfi S., Dautry C., Poyot T., Bloch J., Deglon N., Ouary S., Nimchinsky EA., Brouillet E., Hof PR., Peschanski M., Aebischer P., Hantraye P. Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum. Gene Ther.* 2000; 11: 1177-87

Müller HW., Beckh S., Seifert W. Neurotrophic factor for central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; 81: 1248-1252

Mullis KB., Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 335-50

Pallini R., Fernandez E., Sbriccoli A. Retrograde degeneration of corticospinal axons following transection of the spinal cord in rats. A quantitative study with anterogradely transported horseradish peroxidase. *J. Neurosurg.* 1988; 68: 124-8

Parganas E., Wang D., Stravopodis D., Topham DJ., Marine JC., Teglund S., Vanin EF., Bodner S., Colamonici OR., van Deursen JM., Grosveld G., Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell.* 1998; 93: 385-395

Prinjha R., Moore SE., Vinson M., Blake S., Morrow R., Christie G., Michalovich D., Simmons DL., Walsh FS. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature.* 2000; 403: 369-70

Properzi F., Fawcett JW. Proteoglycans and brain repair. *News Physiol. Sci.* 2004; 19: 33-8

Quelle FW., Wang J., Feng J., et al. Cytokine rescue of p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest is mediated by distinct Jak-kinase signaling pathways. *Genes. Dev.* 1998; 12: 1099-1107

Ramón-Cueto A. und Avila J. Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull.* 1998; 46: 175-87. Review

Ramón-Cueto A, Valverde F. Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia.* 1995; 14: 163-73. Review

Ruscher K., Freyer D., Karsch M., Isaev N., Megow D., Sawitzki B., Priller J., Dirnagl U., Meisel A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an *in vitro* model. *J. Neurosci.* 2002; 22:10291–10301

Saiki RK., Gelfand DH., Stoffel S., Scharf SJ., Higuchi R., Horn GT., Mullis KB., Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239: 487-91

Sakanaka M., Wen TC., Matsuda S. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 4635-4640

Sambrook J., Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 1989; 342: 224-5

Schaden H., Stuermer CA., Bähr M. GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat. *J. Neurobiol.* 1994; 25: 1570-8

Schmidt RH., Björklund A., Stenevi U. Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspensions: a new approach for neuronal transplantation to deep brain sites. *Brain Res.* 1981; 218: 347-356

Schnell L., Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature*. 1990; 343: 269-272

Sendtner M., Carroll P., Holtmann B., Hughes RA., Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol*. 1994; 25: 1436-53. Review

Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1: Mechanisms and consequences. *Biochem. Pharmacol*. 2000; 59: 47-53

Shang Y., Wu Y., Yao S., Wang X., Feng D., Yang W. Protective effect of erythropoietin against ketamine-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons: involvement of PI3K/Akt and GSK-3 beta pathway. *Apoptosis*. 2007; 12: 2187-95

Shang Y., Yao SL., Wu Y. Erythropoietin protects neuron against ketamine induced injuries. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008; 88: 876-9

Sharp PA., Sugden B., Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*. 1973; 12: 3055-63

Sievers J., Hausmann B., Unsicker K., Berry M. Fibroblast growth factor promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci. Lett*. 1987; 76: 157-162

Sievers J., Hausmann B., Berry M. Fetal brain grafts rescue adult retinal ganglion cells from axotomy-induced cell death. *J. Comp. Neurol*. 1989; 281: 467-478

Sievers J., Bamberger C., Debus OM., Lucius R. Regeneration in the optic nerve of adult rats: influences of cultured astrocytes and optic nerve grafts of different ontogenetic stages. *J. Neurocyt*. 1995; 24: 783-793

Sinor AD., Greenberg DA. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia from hypoxia. *Neurosc. Lett.* 2000; 290: 213-215

Sirén AL., Knerlich F., Schilling L., Kamrowski-Kruck H., Hahn A., Ehrenreich H. Differential glial and vascular expression of endothelins and their receptors in rat brain after neurotrauma. *Neurochem. Res.* 2000; 25: 957-69

Smith GM., Miller RH., Silver J. Changing role of forebrain astrocytes during development, regenerative failure, and induced regeneration upon transplantation. *J. Comp. Neurol.* 1986; 251: 23-43

Snow DM., Lemmon V., Carrino D., Caplan A., Silver J. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 1990; 109: 111-130

Socolovsky M., Fallon AE., Wang S., Brugnara C., Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell.* 1999; 98: 181-191

Spring J., Beck K., Chiquet-Ehrismann R. Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. *Cell.* 1989; 59: 325-334

Stephens L., McGregor A., Hawkins P. Phosphoinositide 3-kinases: regulation by cell-surface receptors and function of 3-phosphorylated lipids. In Cockcroft S. (ed.), *Biology of phosphoinositides*. Oxford University Press, Oxford. 2000: 32-130

Stephens LR., Eguinoa A., Erdjument-Bromage H., Lui M., Cooke F., Coadwell J., Smrcka AS., Thelen M., Cadwallader K., Tempst P., Hawkins PT. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell.* 1997; 89: 105-114

Stöckli KA., Lillien LE., Näher-Noé M., Breitfeld G., Hughes RA., Raff MC., Thoenen H., Sendtner M. Regional distribution, developmental changes, and cellular

localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J. Cell. Biol.* 1991; 115: 447-59

Teglund S., McKay C., Schuetz E., van Deursen JM., Stravopodis D., Wang D., Brown M., Bodner S., Grosveld G., Ihle, JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell.* 1998; 93: 841-850

Thoenen H., Sendtner M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci.* 2002; 5: 1046-50. Review

Tilbrook PA., Ingley E., Williams JH., Hibbs ML., Klinken SP. Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *EMBO J.* 1997;16: 1610-1619

Toker A., Meyer M., Reddy KK., Falck JR., Aneja R., Aneja S., Parra A., Burns DJ., Ballas LM., Cantley LC. Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3,4,5-P₃. *J.Biol. Chem.* 1994; 269: 32358-32367.

Vahlsing HL., Hagg T., Spencer M., Conner JM., Manthorpe M., Varon S. Dose-dependent responses to nerve growth factor by adult rat cholinergic medial septum and neostriatum neurons. *Brain Res.* 1991; 552: 320-329

Vanhaesebroeck B., Leever SJ., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll PC., Woscholski R., Parker P.J., Waterfield, MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 2001; 70: 535-602

Varon S., Skaper SD., Baebin G., Selak I., Manthorpe M. Low molecular weight agents support survival of cultured neurons from the central nervous system. *J. Neurosci.* 1984; 4: 654-658

Warnecke C., Zaborowska Z., Kurreck J., Erdmann VA., Frei U., Wiesener M., Eckardt KU. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2(EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J.* 2004; 18: 1462–1464.

Weibel D., Cadelli D., Schwab ME. Regeneration of lesioned rat optic nerve fibres is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res.* 1994; 642: 259-66

Weibel D., Kreutzberg GW., Schwab ME. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in young rat optic nerve. *Brain Res.* 1995; 15: 249-54

Weisenhorn DM., Roback J., Young AN., Wainer BH. Cellular aspects of trophic actions in the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* 1999; 189: 177-265. Review

Wickrema A., Uddin S., Sharma A., Chen F., Alsayed Y., Ahmad S., Sawyer S.T., Krystal, G., Yi, T., Nishada, K., Hibi, M., Hirano, T., Plataniias, L.C. Engagement of Gab1 and Gab2 in erythropoietin signaling. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 24469-24474

Wilms H., Schwabedissen B., Sievers J., Lucius R. Erythropoietin does not attenuate cytokine production and inflammation in microglia - Implications for the neuroprotective effect of Erythropoietin in neurovascular and neurodegenerative disease. *J. Neuroimmunol.* 2009 (in Revision)

Winter CG., Saotome Y., Levison SW., Hirsh D. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995; 92: 5865-9

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

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

Wu Y., Shang Y., Sun S., Liang H., Liu R. Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis*. 2007; 12: 1365-75

Xiong Y., Mahmood A., Lu D., Qu C., Kazmi H., Goussev A., Zhang ZG., Oguchi CT., Schallert T., Chopp M. Histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice null for the erythropoietin receptor in the central nervous system. *Brain Res*. 2008; 1230: 247-57

Xu XM., Martin GF. Evidence for new growth and regeneration of cut axons in developmental plasticity of the rubrospinal tract in the North American opossum. *J. Comp. Neurol*. 1991; 313: 103-112

Zang H., Sato K., Nakajima H., McKay C., Ney P.A., Ihle JN. The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for in vivo erythropoiesis. *EMBO J*. 2001; 20: 3156-3166

Zhu Y., Andrea AD. The molecular physiology of erythropoietin and the erythropoietin receptor. *Curr. Opin. Hematol*. 1994; 1: 113-8

Zielasek J., Tauscher M., Toyka KV., Hartung P. Production of nitrite by neonatal microglia cells/brain macrophages. *Cell. Immunol*. 1992; 141: 114-120

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Bernhard Tillman, dem ehemaligen geschäftsführenden Vorstand des Anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, und bei Professor Dr. med. Jobst Sievers, dem aktuellen geschäftsführenden Vorstand des Anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation bedanken. Durch die Nutzung eines sehr gut ausgestatteten Arbeitsplatzes konnte ich die die Versuche und Arbeiten problemlos durchführen. Zur persönlichen Etablierung der einzelnen Arbeitstechniken, Unterstützung bei Versuchsplanungen und Hilfe bei Fragen jeder Art, standen mir alle Mitarbeiter des Institutes kollegial als Ansprechpartner zur Verfügung.

Bei Sybille Piontek und Rosemarie Sprang bedanke ich mich für die geduldige Anleitung in Arbeitstechnik und Arbeitsablauf im Labor. Sie vermittelten mir die funktionelle Basis zur Arbeit mit den Gewebekulturen sowie zur Aufarbeitung der histologischen Präparate. Ebenso gedankt sei Frau Professor Dr. rer. nat. Dr. med. Janka Held-Feindt für die Einführung in einige molekularbiologische Untersuchungsverfahren, insbesondere die m-RNA-Isolierung. Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel für die exzellente und geduldige Einführung in die OP-Techniken des Opticus-Crush-Modells.

Mein größter Dank gilt meinem stets engagierten und hilfreichen Doktorvater, Herrn Professor Dr. rer. nat. Ralph Lucius. Ohne seine Geduld, fachliche Unterstützung, differenzierte Reflektion der Ergebnisse und kreative Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei ebenfalls für ihre Hilfe, Diskussionen und Unterstützung gedankt.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nils Warneke
Geburtsdatum	04.06.1976
Geburtsort	Göttingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Frau Gunda Warneke, geb. Eggers, Krankenschwester und Dr. med. Johann Warneke, Facharzt für Innere Medizin

Schulbildung

1983-1984	Grundschule Asendorf
1984-1987	Bürgermeister-Smidt-Grundschule in Bremen
1987-1989	Orientierungsstufe in der Schule An der Brokstraße in Bremen
1989-1992	Altes Gymnasium in Bremen
1992-1996	Gymnasium Syke
1996	Abitur

Wehrdienst

09/1996-07/1997	Grundwehrdienst in Oldenburg und Altenstadt
-----------------	---

Studium

1997-2003	Studium der Humanmedizin an der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel
1999	Physikum
2000	1. Staatsexamen
2002	2. Staatsexamen
2003	3. Staatsexamen

Beruf

Seit 01/2004	Wissenschaftlicher Assistent in der Klinik für Neurochirurgie am UK-SH, Campus Kiel
--------------	--