Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

Beeinflussung des klinischen, histologischen und molekularbiologischen Outcomes von Mäusen nach spinaler Ischämie durch präoperative pharmakologische Konditionierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Leon-Gordian Köpke

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Florian Simon

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Drittgutachter: PD Dr. med. Alexander Gombert

Gewidmet an

Klaus-Michael Dreier

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Simon, F., Köpke, L.-G., Ibing, W., Schelzig, H., (2018), Effects of Preoperative Pharmacological Conditioning on the Clinical and Molecular Outcome of Mice after Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Sequence. European Journal of Vascular & Endovascular Surgery, Volume 56, e15 [1].

Köpke, L.-G., Simon, F., (2018), Immunhistochemische Färbungen – Ein möglicher Lösungsweg. Gefäßchirurgie, Volume 23, 261-263 [2].

Kongressbeiträge zu der vorliegenden Dissertationsschrift:

04/2018	Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin
	"Immunhistochemie – Selektive Färbung und softwaregestützte Quantifizierung von Antigenen in Paraffinschnitten als Methode zur Analyse von Proteinexpression in der Histologie." – Posterpräsentation durch Köpke, LG.
09/2017	Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Gefäß- und Endovaskularchirurgie, Frankfurt
	"Präoperative pharmakologische Konditionierung beeinflusst den klinischen und molekularen Outcome bei Ischämie und Reperfusionsschäden des Rückenmarks nach thorakalem Aortencrossclamping im Mausmodell." – Vortrag durch Köpke, LG.
09/2017	Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Gefäß- und Endovaskularchirurgie, Frankfurt
	"Immunhistochemische Färbungen – Nöte eines Doktoranden." – Vortrag durch Köpke, LG.
09/2017	21. Chirurgische Forschungstage, Köln
	"Präoperative pharmakologische Konditionierung beeinflusst das klinische und molekulare Outcome bei Ischämie- und Reperfusionsschäden des Rückenmarks nach thorakalem Aortencrossclamping im Mausmodell." – Vortrag durch Köpke, LG.
03/2017	Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München
	"Klinische und molekulare Auswirkungen von Epo und cEpo-Fc auf Ischämie und Reperfusionsschäden des Rückenmarks nach thorakalem Aortencrossclamping im Mausmodell." – Vortrag durch Köpke, LG.

10/2016 Dreiländertagung der SGG, ÖGG und DGG, Bern

"Klinische und molekulare Auswirkungen von Epo und cEpo-Fc auf Ischämie und Reperfusionsschäden des Rückenmarks nach thorakalem Aortencrossclamping im Mausmodell." – Vortrag durch Köpke, L.-G.

09/2016 20. Chirurgische Forschungstage, Magdeburg

"Clinical and molecular effects of Epo and cEpo-Fc on murine spinal cord ischemia/reperfusion injury after aortic clamping." – Vortrag durch Köpke, L.-G.

In Bearbeitung stehende Publikationen zu der vorliegenden Dissertationsschrift:

In	"Influence of preoperative pharmacological preconditioning on the
Bearbeitung	clinical, histological and molecular outcome of mice after spinal
C	ischemia" - Köpke, LG., Daum G., Ibing W., Vcelar B., Schelzig H.,
	Simon F.

Zusammenfassung:

Spinale Ischämien können unter anderem durch das Arteria-spinalis-anterior-Syndrom (ASAS) oder operative Eingriffe an der Aorta, wie dem aortalen Crossclamping, bei der Versorgung von thorakalen Aortenaneurysmen (TAA) ausgelöst werden. Eine spinale Ischämie kann mit Parästhesien, autonomen Funktionsstörungen sowie einer transienten oder permanenten Paraplegie einhergehen. Bis heute existiert keine effiziente Prophylaxe gegen die Komplikationen einer spinalen Ischämie. In den letzten Jahren ist das Hormon Erythropoetin (EPO) in den Fokus der Forschung gerückt, da es das neurologische Outcome von Tieren nach spinalen Schädigungen verbessern kann. Als mögliche Ursache wird der positive Einfluss von EPO auf den ischämiebedingten Stress des endoplasmatischen Retikulums (ERS) und dessen Antwort darauf, die Unfolded Protein Response (UPR), angesehen. In dieser Studie haben wir den Einfluss von rekombinantem Erythropoetin (rhEPO) und einem carbamylierten Derivat (cEPO-Fc) auf das klinische, histologische und molekulare Outcome von Mäusen nach einer spinalen Ischämie- und Reperfusionssequnez (IRS) untersucht. In 12 Monate alten Mäusen (C57BL/6J) wurde durch Clamping der thorakalen Aorta eine spinale Ischämie induziert. Präoperativ wurde eine pharmakologische Präkonditionierung mittels rhEPO, cEPO-Fc oder einem Placebo verabreicht. Tiere dieser drei Studiengruppen wurden über verschiedene Reperfusionszeiträume (6, 24 und 96 Stunden) neurologisch evaluiert. Anschließend wurde das Rückenmark entnommen und histologisch sowie molekularbiologisch untersucht. Neben einer Hämatoxylin-Eosin (HE) und einer Luxol-Fast-Blue (LFB) Färbung wurden immunhistochemische Proteinanalysen zu Caspase 12, GRP 78 und ATF 6 durchgeführt. Weiterhin wurden Gene der Schlüsselproteine der UPR (atf 6, perk und ire 1a) mittels qRT-PCR untersucht. Die präoperative Konditionierung mit rhEPO oder cEPO-Fc bewirkte ein signifikant verbessertes klinisches und histologisches Outcome gegenüber der Kontrolle. In der Kontrollgruppe war die Expression von Caspase 12 nach 24 und 96 Stunden Reperfusion gegenüber der 6 Stunden Gruppe signifikant erhöht. Die Untersuchungen mittels qRT-PCR zeigten keine eindeutigen Effekte von rhEPO oder cEPO-Fc auf die Genexpression der Effektoren der UPR. Es lässt sich ableiten, dass rhEPO und cEPO-Fc protektive Effekte auf das klinische und molekulare Outcome von Mäusen nach einer spinalen IRS haben und dass das endoplasmatische Retikulum (ER) teilweise in die Vermittlung dieser Effekte involviert zu sein scheint.

Abstract:

Among others, spinal ischemia can be caused by the anterior spinal artery syndrome (ASAS) or surgical interventions on the aorta, such as crossclamping in the treatment of thoracic aortic aneurysms (TAA). The ASAS is one of the most common causes of spinal cord ischemia. Spinal ischemia can be associated with paresthesia, autonomic dysfunction and transient or permanent paraplegia. The ASAS can be triggered by dissections and aneurysms of the aorta and their operative treatment. To date, there is no efficient prophylaxis against the complications of spinal ischemia. In recent years, the hormone erythropoietin (EPO) has moved into the focus of research, because it can improve the neurological outcome of animals after spinal damage. The positive influence of EPO on the ischemic stress of the endoplasmic reticulum (ERS) and its response, the Unfolded Protein Response (UPR), is seen as a possible cause. In this study we examined the influence of recombinant erythropoetin (rhEPO) and a carbamylated derivative (cEPO-Fc) on the clinical, histological and molecular outcome of mice after a spinal ischemia and reperfusion sequence (IRS). Spinal ischemia was induced in 12-month-old mice (C57BL / 6J) by clamping the thoracic aorta. Pharmacological preconditioning using rhEPO, cEPO-Fc or a placebo was administered preoperatively. Animals from these three study groups were neurologically evaluated over various reperfusion periods (6, 24 and 96 hours). The spinal cord was then removed and examined histologically and molecularly. In addition to a hematoxylin-eosin (HE) and a Luxol-Fast-Blue (LFB) staining, immunohistochemical protein analyzes for caspase 12, GRP 78 and ATF 6 were carried out. In addition, the genes of major proteins of the UPR (atf 6, perk and ire 1a) were examined using qRT-PCR. The preoperative conditioning with rhEPO or cEPO-Fc resulted in a significantly improved clinical and histological outcome compared to the control. In the control group, expression of caspase 12 was significantly increased after 24 and 96 hours of reperfusion compared to 6 hours of reperfusion. The examinations by means of qRT-PCR did not show any clear effects of rhEPO or cEPO-Fc on the gene expression of the UPR effectors. From our findings it can be deduced that rhEPO and cEPO-Fc have a protective effect on the clinical and molecular outcome of mice after a spinal IRS and that the endoplasmic reticulum (ER) might be involved in mediating this effect.

Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μΜ	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor 1
ASA	Arteria spinalis anterior
ASAS	Arteria-spinalis-anterior-Syndrom
ATF6	activating transcription factor 6
Bcl-X _L	B-cell-lymphoma-extra-large
ßcR	β-common-Rezeptor
BiP	immunoglobulin heavy chain binding protein
BMS	Basso Mouse Scale
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa

cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cEPO	carbamyliertes Erythropoetin
cEPO-Fc	carbamyliertes Erythropoetin-Fc
CFD	cerebrospinal fluid drainage
	(Drainage von Cerebrospinalflüssigkeit)
СНОР	C/EBP homology protein
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag(e)
EC	epidural cooling (epidurale Kühlung)
eIF2a	eukaryotic translation initiation factor-2
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetin-Rezeptor
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER associated protein degradation
	(ER assoziierte Proteindegradation)
ERS	ER Stress
	(Stress des endoplasmatischen Retikulums)
ESC	European Society of Cardiology

	(europäische Gesellschaft für Kardiologie)
ЕТОН	Ethanol
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GRP 78	78-kDa glucose-regulated protein
h	Stunde(n)
HCL	Salzsäure
НЕ	Hämatoxylin Eosin
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
I.E.	internationale Einheit(en)
IRE1a	inositol requiring enzyme 1α
IRS	Ischämie- und Reperfusionssequenz
JAK	Januskinase
JAK-2	Januskinase-2
JNK	c-Jun-N-terminale-Kinasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LFB	Luxol-Fast-Blue
Li ₂ CO ₃	Lithiumcarbonatlösung

Μ	Molar
МАРК	mitogen-activated-protein-kinases
Mg	Milligramm
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MZP	Messzeitpunkt
n =	Gruppenstärke
NaCl	Natriumchlorid
NFxB	nuclear-factor-kappa-B
ng	Nanogramm
O ₂	Sauerstoff
p	p-Wert, Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PERK	Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
РІЗК	Phosphoinositide-3-Kinase
qRT-PCR	quantitative real time Polymerase Chain Reaction
	(quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion)

rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoetin
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROI	region of interest (Bereich von Interesse)
ROS	reactive oxygen species
	(reaktive Sauerstoffradikale)
RPFZ	Reperfusionszeit
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rt	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
sec.	Sekunde
sog.	sogenannte(r,s)
STAT	signal transducers and activators of transcription
ТАА	thorakales Aortenaneurysma
Tab.	Tabelle
TEVAR	thoracic endovascular aortic repair
	(thorakale endovaskuläre Aortenreparatur)
U	unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
UPR	unfolded protein response
	(Antwort auf fehlgefaltete Proteine)

VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WS1	thorakaler Wirbelsäulenabschnitt
WS2	thorakolumbaler Übergang
WS3	lumbosakraler Wirbelsäulenabschnitt
XBP1	X-box binding protein 1
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleit	ung	1
	1.1 S	pinale Ischämien	1
	1.1.1	Thorakale Aortenaneurysmen und das aortale Crossclamping	1
	1.1.2	Klinik, Komplikationen und Versorgung eines akuten Aortensyndroms	;4
	1.1.3	Das Arteria-spinalis-anterior-Syndrom	6
	1.1.4	Prophylaxe von spinalen Ischämien	7
	1.2 R	ekombinantes und carbamyliertes Erythropoetin	9
	1.3 S	tress des endoplasmatischen Retikulums und fehlgefaltete Proteine	11
	1.3.1	ERS spezifische Apoptose im zentralen Nervensystem	13
	1.4 S	pinale Ischämie- und Reperfusionssequenzen in Tiermodellen	14
	1.5 Z	iele der Arbeit	16
2	Materi	al und Methoden	17
	2.1 N	1aterial	17
	2.1.1	Versuchstiere	17
	2.1.2	Studienmedikamente	17
	2.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
	2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	22
	2.1.5	Antikörper und Primer	26
	2.2 N	1ethoden	27
	2.2.1	Chirurgischer Eingriff	27
	2.2.2	Evaluation des klinisch neurologischen Outcomes	30
	2.2.3	Gewinnung und Lagerung des Rückenmarksgewebes	30
	2.2.4	Histopathologie	30
	2.2.4	1.1 Hämatoylin-Eosin-Färbung	31
	2.2.4	I.2 Auswertung der HE-Färbungen	32
	2.2.4	I.3 Luxol-Fast-Blue-Färbung	35
	2.2.4	4.4 Auswertung LFB	36
	2.2.5	Immunhistochemie	37
	2.2.5	5.1 Anfertigung eines PBS-Puffers	37
	2.2.5	5.2 Anfertigung eines Citrat-Puffers	38
	2.2.5	5.3 Caspase 12	38
	2.2.5	5.4 78-kDa glucose-regulated protein	39
	2.2.5	5.5 Activating transcription factor 6	40
	2.2.5	5.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	42

2.2.6 Molekularbiologie	
2.2.6.1 Isolierung von RNA au	s Kryoproben43
2.2.6.2 Synthese von cDNA au	ıs RNA44
2.2.6.3 qRT-PCR	
2.2.7 Statistik	
3 Ergebnisse	
3.1 Austestung der Clampingzeit	
3.2 Neurologisches Outcome	
3.3 Histopathologie	
3.3.1 Allgemeine Histopathologie	
3.3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Fä	rbung49
3.3.1.2 Luxol-Fast-Blue-Färbu	ng50
3.3.2 Immunhistochemie	
3.3.2.1 Caspase 12	
3.3.2.2 78-kDa glucose-regular	ted protein52
3.3.2.3 Activating transcription	1 factor 653
3.4 Molekularbiologie	
3.4.1 qRT-PCR	
3.4.1.1 <i>activating transcription</i>	<i>n factor 6</i> 55
3.4.1.2 <i>inositol requiring enzy</i>	ne 1α56
3.4.1.3 protein kinase RNA-like	e endoplasmic reticulum kinase58
4 Diskussion	
4.1 Etablierung eines Mausmodell	s60
4.2 Einflüsse von rhEPO und cEPO	O-Fc auf das neurologische Outcome62
4.3 Einflüsse von rhEPO und cEPO	O-Fc auf die Histopathologie63
4.4 Einflüsse von rhEPO und cEPO	O-Fc auf das ER64
4.4.1 Expression von Caspase 12	nach spinaler Ischämie64
4.4.2 Immunhistochemischer Nac	hweis von GRP 78 und ATF 666
4.4.3 Expression der Gene <i>atf</i> 6, <i>i</i>	re 1α und <i>perk</i> 67
4.5 Limitationen unserer Studie	
4.6 Schlussfolgerung	
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	
6 Anhang	
6.1 Abbildungsverzeichnis	
6.2 Tabellenverzeichnis	

1 Einleitung

1.1 Spinale Ischämien

Rückenmarksverletzungen lassen sich in zwei Überkategorien einteilen. Auf der einen Seite stehen traumatische Verletzungen, bei denen es zu einer direkten Schädigung des Gewebes mit entsprechenden Funktionsausfällen kommt. Auf der anderen Seite stehen atraumatische Schädigungen des Rückenmarks. Für diese gibt es verschiedenste Ursachen wie z.B. die Schädigung des Rückenmarks durch eine Ischämie- und Reperfusionssequenz (IRS) [3]. Spinale Ischämien zählen, im Gegensatz zu zerebralen Ischämien, zu den seltenen ischämischen Insulten des zentralen Nervensystems und ihre Ätiologie ist vielseitig. Beispielsweise kann es durch Hypotonien im Körperkreislauf oder Verschlüsse der Aorta zu spinalen Minderperfusionen kommen. Obwohl selten, haben spinale Ischämien und ihre Folgen eine große Bedeutung in unserem Gesundheitssystem. Für die betroffenen Patienten haben spinale Ischämien häufig irreversible Funktionseinschränkungen mit wesentlichen Beeinträchtigungen des alltäglichen Lebens zur Folge. Für das Gesundheitssystem entstehen vor allem bei jungen Patienten massive Versorgungsaufgaben und damit verbunden hohe Kosten [4].

1.1.1 Thorakale Aortenaneurysmen und das aortale Crossclamping

Im klinischen Alltag treten spinale Ischämien beispielsweise beim *Crossclamping* der thorakalen Aorta, im Rahmen der offen operativen Versorgung eines thorakalen Aortenaneurysmas (TAA) oder eines akuten Aortensyndroms auf. Ein TAA bleibt nicht selten für lange Zeit symptomlos und deshalb unerkannt. Im Verlauf kann es zu Rupturen oder Dissektionen kommen, die sich durch heftige Schmerzen, Synkopen oder Blutdruckabfälle äußern können [5]. Die Morbidität und Mortalität im Rahmen eines rupturierten TAA ist hoch. In der Literatur sind Mortalitätsraten von > 90 % beschrieben [6, 7]. Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde das TAA unter anderem von Saeyeldin et al. als "*silent killer*" bezeichnet [8]. Risikofaktoren für die Ausbildung eines TAA sind genetische Erkrankungen mit Beeinflussung der Kollagenstruktur der Aortenwand, wie zum Beispiel das Marfan-Syndrom. Weiterhin stellt der arterielle Hypertonus als

Volkskrankheit einen relevanten Risikofaktor für die Ausbildung eines degenerativen TAA dar [9]. Nicht selten muss ein Eingriff zur Ausschaltung des Aneurysmas erfolgen, um eine Ruptur und die damit einhergehende hohe Mortalität zu vermeiden. Eingriffe an der thorakalen Aorta zeichnen sich jedoch, trotz endovaskulärer Techniken, durch eine hohe Invasivität aus. Die perioperativen Risiken und möglichen Komplikationen, wie z.B. zerebrale und spinale Ischämien sowie Infektionen und *Endoleaks*, bei denen es zu einer unerwünschten Perfusion der ausgeschalteten Anteile des TAA kommt und die nach endovaskulärer Versorgung auftreten können [10], müssen gegen das Risiko einer Ruptur aufgewogen werden. Die Mortalitätsraten bei der elektiven chirurgischen Versorgung eines TAA liegen jedoch deutlich unter den Mortalitätsraten eines rupturierten TAA [11]. Der Durchmesser der Aorta, das jährliche Wachstum sowie das Auftreten von Symptomen stellen die wichtigsten Parameter zur Prädiktion einer Ruptur dar und haben somit Einzug in die Leitlinien erhalten [10, 12].

Ein degeneratives TAA der aszendierenden Aorta und des Aortenbogens mit einem Durchmesser von > 55 mm stellt laut der European Society of Cardiology (ESC) in der allgemeinen Bevölkerung eine Operationsindikation dar [10]. Von der ESC Leitlinie angegebene Risikofaktoren, unter denen bereits bei geringeren Durchmessern eine operative Versorgung von Aneurysmen der Aorta ascendens indiziert sein kann, sind unter anderem eine positive Familienanamnese für Dissektionen der Aorta, eine Zunahme des Durchmessers von > 3 mm/Jahr und speziell bei Frauen ein Schwangerschaftswunsch. Im Bereich der Aorta ascendens und des Aortenbogens sind offen operative Verfahren Mittel der ersten Wahl. Für Patienten mit vielen Komorbiditäten, die nicht für einen langstreckigen offenen Ersatz der Aorta ascendens in Frage kommen, stellt eine Hybridversorgung aus offenen und endovaskulären Techniken eine Alternative dar. Dabei wird die proximale Aorta ascendens durch einen Graft ersetzt und der Truncus brachiocephalicus sowie die Arteriae carotis und subclavia sinistra werden von dem ehemaligen Aortenbogen abgesetzt und End-zu-Seit an den Graft anastomisiert [12, 13]. Im Anschluss wird dann die distale aszendierende Aorta endovaskulär versorgt. Für degenerative Aneurysmen der Aorta descendens ist die thorakale endovaskuläre Aortenreparatur (TEVAR) der offen operativen Versorgung vorzuziehen [10, 12, 14]. Die ESC Leitlinie und die Leitlinien der amerikanischen Fachgesellschaften empfehlen die Versorgung eines TAA mittels TEVAR bei Aneurysmen der deszendierenden Aorta mit einem Durchmesser > 55 mm. Falls eine TEVAR technisch nicht möglich ist, sollten

TAA der Aorta descendens ab einem Durchmesser von 60 mm offen operativ versorgt werden [10, 12, 14]. In Fällen mit einem Wachstum des TAA der Aorta descendens von über > 5 mm/Jahr kann bereits bei geringeren Durchmessern die Indikation zur operativen Ausschaltung des Aneurysmas gestellt werden [14]. Zudem sollten Patienten, die Symptome wie z.B. Rückenschmerzen, Heiserkeit oder Dysphagie aufweisen, unabhängig des Durchmessers und der Lokalisation des TAA, dringlich einer operativen Therapie zugeführt werden [12, 14]. Studien konnten zeigen, dass Rückenschmerzen bei einem vorliegenden TAA ein positiver Indikator für eine Ruptur des Aneurysmas sein können [15]. Eingriffe an der thorakalen Aorta, ob endovaskulär oder offen, stellen aufgrund einer hohen Komplexität und Invasivität eine Herausforderung für Chirurgen und Patienten dar. Nicht selten kommt es zu Komplikationen, die relevante Langzeitfolgen für die Patienten haben. Die Indikationen für Eingriffe zur Versorgung eines TAA sollten deshalb eng anhand der Leitlinien gestellt und von Expertenteams geprüft werden.

Um offene Eingriffe an der Aorta durchführen zu können, ist es notwendig, den Blutfluss über die Aorta temporär mittels Crossclamping zu unterbinden. Im Rahmen des Crossclampings werden Gefäßklemmen proximal und distal des operativ zu versorgenden Abschnitts der Aorta quer zum Gefäßverlauf aufgesetzt und so der Blutfluss unterbunden. Der abgeklemmte Bereich der Aorta kann, wie unter anderem von Lopez-Marco et al. beschrieben, mittels eines Bypasses überbrückt werden. So kann der Blutdruck proximal des Clampings gesenkt und die Perfusion distal aufrecht erhalten werden [16]. Das Crossclamping ermöglicht es, ganze Abschnitte der Aorta operativ zu ersetzen. Pathophysiologisch kommt es zu einer IRS des Rückenmarkes, des Intestinums, der Nieren und der unteren Extremitäten. Die Schädigungen bei spinalen Ischämien sind nicht selten irreversibel, wie das Vorkommen einer permanenten Paraplegie [17]. Zum ersten Mal beschrieben wurde das Auftreten von Paralysen der hinteren Extremitäten nach offenem Clamping der Aorta bei Hunden im Jahre 1910 durch Alexis Carrel [18]. Doch nicht nur im Rahmen von offenen Operationen an der Aorta kann es zu spinalen Schädigungen kommen. Auch durch endovaskuläre Techniken, wie der TEVAR [19], kann es zu klinisch relevanten Schädigungen des Rückenmarks durch Ischämien kommen [20]. Obwohl die Techniken zur operativen Versorgung von Erkrankungen der Aorta im Laufe der Zeit immer weiterentwickelt worden sind, bleibt die spinale Ischämie nach Aorteneingriffen eine relevante und gefürchtete Komplikation.

1.1.2 Klinik, Komplikationen und Versorgung eines akuten Aortensyndroms

Das akute Aortensyndrom beschreibt einen Symptomkomplex, dem verschiedene Ursachen zu Grunde liegen können, wie Dissektionen der Aorta, intramurale Aortenhämatome, penetrierende atherosklerotische Ulzerationen der Aorta sowie symptomatische oder rupturierte Aortenaneurysmen [21]. Da das akute Aortensyndrom mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehen kann, ist die rasche klinische Diagnose und regelrechte Therapie für das klinische Outcome der Patienten entscheidend. Die akute Aortendissektion stellt dabei eine der häufigsten Ursachen für ein akutes Aortensyndrom dar. Klassifiziert wird die akute Aortendissektion unter anderem nach der Standford-Klassifikation in Typ-A- und Typ-B-Dissektionen [22]. Die Inzidenz von akuten Dissektionen ist in der Literatur nicht einheitlich angegeben. Olsson et al. beschrieben im Jahre 2006 retrospektiv ein Ansteigen der Inzidenz von Aneurysmen und Dissektionen der thorakalen Aorta um 52 % in der männlichen und 28 % in der weiblichen Population von 1987 bis 2002. 2002 traten dabei 16,3/100.000 Fälle bei Männern und 9,1/100.000 Fälle bei Frauen auf. Die Anzahl der operativen Versorgungen in der männlichen Population stiegen in diesem Zeitraum um das 7-fache und in der weiblichen Population um das 15-fache [23]. Im Jahr 2013 führten Howard et al. eine prospektive Populationsstudie durch. Dort zeigte sich eine Inzidenz von 35/100.000 unter 65- bis 75jährigen [24]. Weiterhin identifizierten Howard et al. die Hypertonie, insbesondere therapieresistente Formen, als relevantesten Risikofaktor für das Auftreten einer Aortendissektion. Neben der Volkskrankheit Hypertonie wurden weitere Risikofaktoren identifiziert. Dazu zählen fortgeschrittenes Lebensalter, männliches Geschlecht, Nikotinabusus, Vorerkrankungen der Aorta, eine positive Familienanamnese sowie intravenöser Drogenabusus [5, 10, 25, 26].

Klinisch präsentiert sich eine akute Aortendissektion typischerweise durch das abrupte Auftreten des Leitsymptoms, ein heftiger, reißender Schmerz, der ja nach Lokalisation der Dissektion in der Brust oder im Rücken auftreten kann [27]. Bei 25 % der Patienten können auch Schmerzen im Abdomen auftreten [10]. Weitere Symptome können vor allem durch Komplikationen, wie z.B. Herzbeuteltamponaden, Klappeninsuffizienzen, Nierenversagen, viszerale Ischämien oder Ischämien des Rückenmarkes, hervorgerufen werden. Nicht nur das akute Aortensyndrom an sich, sondern auch dessen Therapie kann folgenschwere Komplikationen verursachen. Die Auftretenswahrscheinlichkeit von schweren Komplikationen, wie Nierenversagen, mediastinalen Blutungen, Mediastinitis sowie Chylothorax und auch Rückenmarksschädigungen bei Typ-A-Dissektionen nach Stanford, wurde im Jahre 2018 von Fukui et al. mit 3-10 % angegeben [28]. Auch im Rahmen von Typ-B-Dissektionen nach Stanford kann es zu schweren Komplikationen wie zerebralen Insulten, Lungenverletzungen oder Rückenmarksschädigungen kommen [29, 30].

Die Rückenmarksschädigung kann in ihrer klinischen Ausprägung und Auftretenswahrscheinlichkeit stark variieren. Die klinische Manifestation einer Rückenmarkschädigung kann zum einen unmittelbar postoperativ oder häufiger auch erst im weiteren, klinischen Verlauf auftreten [31, 32]. Neben dem Manifestationszeitpunkt der Symptome kann auch die Dauer der Funktionsausfälle variieren. So kann es zu transienten oder auch permanenten Symptomen kommen [32, 33], welche sich von Gefühlsstörungen der Haut über Paresen bis zu Paraplegien und autonomen Dysfunktionen erstrecken. Die Anzahl der Patienten, die nach einer operativen Versorgung eine Schädigung des Rückenmarks erfahren, variiert unter anderem in Abhängigkeit von dem jeweils durchgeführten operativen Eingriff. Damberg et al. beschrieben beispielsweise Raten von bis zu 24 % nach offen operativem Ersatz des Aortenbogens mittels "Frozen Elephant Trunk" [34], während nach endovaskulärer Versorgung geringere Schädigungsraten des Rückenmarks von 3 % [35] oder 5,7 % [36] zu finden sind.

In der jüngeren Vergangenheit ist zur Verringerung von Mortalität und Morbidität nach operativer Versorgung von akuten Aortensyndromen die endovaskuläre Versorgung mehr und mehr in den Fokus gerückt. Heutzutage gilt die TEVAR als häufig angewandte Option zur Versorgung von Typ-B-Dissektionen der thorakalen Aorta [37]. 2018 führten Yuan et al. eine vergleichende Studie durch, in der sie die Daten von Publikationen zwischen Januar 2006 und Juli 2017 verglichen. In der Behandlung von akuten und komplizierten Fällen ergaben sich 30-Tage-Mortalitätsraten von 19 % nach offener und 7,3 % nach endovaskulärer Versorgung [38]. Zudem wurden immer wieder Studien zum Vergleich von Paraplegieraten bei offenen und endovaskulären Verfahren durchgeführt. 2008 beschrieben Greenberg et al. Paraplegieraten von 4,3 % nach endovaskulärer Versorgung und 7,5 % nach offener Versorgung. Die Unterschiede waren dabei nicht signifikant [39]. Ähnliche Ergebnisse lieferten Lee et al. in 2015. Die Arbeitsgruppe beschrieb Paraplegieraten von 3,5 % nach endovaskulärer und 7,5 % nach offener Versorgung, ebenfalls ohne signifikante Unterschiede [40]. Während die Ursache für die Rückenmarksschädigungen bei der offenen Versorgung in der Ischämie- und Reperfusionssequenz durch das thorakale Aortencrossclamping gesehen wird, werden als Auslöser der Rückenmarksschädigungen nach TEVAR verschiedene Mechanismen vermutet. Zu diesen zählen zum einen die unmittelbare Okklusion von Intercostalarterien, ungenügender Blutfluss über die Intercostalarterien bei Hypotension [36], inadäquates Remodeling von Kollateralen zur Versorgung des Rückenmarks nach Überstentung von Intercostalarterien sowie Embolien in Intercostalarterien durch Plaquematerial der Aorta [41]. Trotz der Vorteile der endovaskulären Versorgung, wie zum Beispiel die geringeren 30-Tage-Mortalitätsraten [38], erscheint das Verfahren allein nicht ausreichend zu sein, um spinale Schädigungen zu vermeiden.

1.1.3 Das Arteria-spinalis-anterior-Syndrom

Eine weitere häufige Ursache einer spinalen Ischämie ist das Arteria-spinalis-anterior-Syndrom (ASAS) [17]. Im Jahre 1909 wurde das ASAS erstmalig von William G. Spiller beschrieben. Das ASAS präsentierte sich als Folge einer Thrombose der zervikalen, medianen, spinalen Arterie. Spillers Patient zeigte Symptome wie Paralysen der Extremitäten, Lähmungen der Atemhilfsmuskulatur, Verlust von Schmerz- und Temperaturempfinden bei erhaltener Sensibilität sowie Blasen- und Mastdarmstörungen [42]. Der von Spiller beschriebene Symptomkomplex ist in der weiteren Geschichte oftmals Ziel von Untersuchungen geworden. Dabei wurden vielerlei Auslöser eines ASAS erkannt. Wie im Jahre 1983 von Foo et al. zusammengefasst [43], zählen zu diesen ein allgemeiner Abfall des Blutflusses sowie lokale Durchblutungsstörungen [20, 44]. Entscheidend für das Auftreten eines ASAS ist, dass es zu einer Minderperfusion der ventralen Abschnitte des Rückenmarks kommt. Neben den oben genannten Gründen gehören auch Dissektionen der Aorta [45] und von Vertebralarterien [46] sowie Klappenerkrankungen, Aneurysmen und Isthmusstenosen der Aorta und deren operative Versorgung [47-50] zu den Auslösern eines ASAS. Seltener kann es durch spondylotische Prozesse [51] und vertebrale Operationen [52, 53] sowie Operationen des Oesophagus [54] und Angiographien zu einem ASAS kommen. Typisch für das ASAS ist der plötzliche Beginn, Störungen von Temperatur und Schmerzempfinden bei erhaltener

Sensibilität sowie Muskelschwäche bis zur Paraplegie sowie Urin- und Stuhlinkontinenz [42, 55]. Diese Symptome variieren dabei in ihrer Ausprägung und Reversibilität.

1.1.4 Prophylaxe von spinalen Ischämien

Seitdem Operationen an der Aorta durchgeführt werden und die postoperativen Rückenmarksschädigungen bekannt sind, wird an Techniken zur Prophylaxe dieser Schädigungen geforscht. Im Laufe der Zeit sind verschiedenste Lösungsansätze entstanden. Diese lassen sich in interventionelle bzw. offen chirurgische Techniken sowie pharmakologische Behandlungen unterteilen.

Zu chirurgischen Techniken zählt unter anderem die Drainage den von Cerebrospinalflüssigkeit (CFD). Miyamoto et al. beschrieben 1960, dass der Druck im Liquorsystem einen relevanten Faktor bei der Entstehung von spinalen Schädigungen durch Operationen an der Aorta ausmacht [56]. Im Jahre 1962 zeigten Blaisdell et al., dass CFD die Rate an spinalen Schäden durch eine IRS im Hundemodell senkt [57]. Ziel der CFD ist es, den Perfusionsdruck der Rückenmarksdurchblutung durch eine Verringerung des Liquordrucks aufrecht zu erhalten. Der Perfusionsdruck des Rückenmarks wird entscheidend vom Quotienten aus dem Blutdruck in der Arteria spinalis anterior (ASA) und dem Liquordruck bestimmt. Oka et al. beschrieben, dass der Perfusionsdruck über 15 mmHg gehalten werden sollte und dass dies zum einen durch CFD und zum anderen durch Shuntanlagen zu erreichen sei [58]. Auch Svensson et al. konnten zeigen, dass die Aufrechterhaltung des spinalen Perfusionsdrucks durch Aortenshunts und CFD sich präventiv auf die Entstehung von Rückenmarksschädigungen nach Crossclamping der thorakalen Aorta in Pavianen auswirkte. Auch die Dilatation der ASA mittels Papaverin hatte sich in diesem Experiment als präventiv erwiesen [59]. Zuvor hatte die Gruppe zeigen können, dass Paviane mit großem Durchmesser der ASA weniger wahrscheinlich eine Schädigung des Rückenmarkes durch Crossclamping der Aorta erleiden [60]. In weiteren Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CFD, Shunts und kardiopulmonale Bypässe, die den Perfusionsdruck des Rückenmarks erhöhen, sich protektiv auf die Schädigung des Rückenmarks auswirken [61, 62]. Im Jahre 2002 berichteten Coselli et al. jedoch, dass die Entstehung von spinalen Schäden durch IRS komplex zu sein scheint und nicht allein auf ein Missverhältnis von spinalem Perfusions- und Liquordrücken zurückzuführen sei. Deshalb sei auch die Prävention von

spinalen Schädigungen nicht allein durch Modifizierung dieser beiden Parameter ausreichend zu gewährleisten [63].

Ein weiterer Ansatz zur Prävention von spinalen Ischämien ist das *Epidural Cooling* (EC). Bei dem EC wird der Epiduralraum mit hypothermer Flüssigkeit gespült, um die Stoffwechselrate des Rückenmarks zu senken und die ischämische Toleranz des Gewebes zu erhöhen [64]. Experimente an Tieren haben gezeigt, dass das EC einen positiven Effekt auf die Ausbildung von Ischämieschäden des Rückenmarks durch *Clamping* oder Verschluss der thorakalen Aorta haben kann [65-67]. Auch die Anwendung von EC im Menschen hat in Studien protektive Effekte gehabt, ist jedoch kein komplikationsfreies Verfahren. Durch EC kann es zu überhöhten Drücken im Liquorraum kommen, welche das Rückenmark schädigen und zu neurologischen Ausfällen führen können [68, 69]. Einen ähnlichen Ansatz wie das EC bildet die Etablierung einer allgemeinen Hypothermie während des *Crossclampings* der Aorta. Im Jahre 2004 zeigten Strauch et al., dass eine milde Hypothermie von 32,0 °C die Ischämietoleranz des Rückenmarks erhöht [70].

Weitere interventionelle und chirurgische Strategien zur Protektion des Rückenmarkes während offenem *crossclamping* der Aorta, aber auch während der endovaskulären Versorgung von Aortensyndromen, sind das Identifizieren von Intercostalarterien [71] oder der Adamkiewicz Arterie [72] sowie die präoperative *Coil*-Embolisation von Intercostalarterien zur Ausbildung von Kollateralnetzwerken vor endovaskulärer Versorgung [73]. Jedoch adressieren auch diese Strategien vor allem die Aufrechterhaltung des spinalen Perfusionsdrucks. Das Entstehen der sofortigen und verzögerten Paraplegien sollte als multifaktorielles Geschehen betrachtet werden, welches multimodale Konzepte zur Prävention erfordert [74].

Um das Risiko für das Auftreten einer spinalen Schädigung nach einer IRS so weit wie möglich zu verringern, ist eine Kombination der oben genannten Maßnahmen denkbar. Des weiteren stehen mögliche pharmakologische Präventionen im Fokus der Forschung. In der Vergangenheit sind verschiedene pharmakologische Ansätze, teilweise in Kombination mit Interventionen, verfolgt worden. So wurden unter anderem die Substanzen Naloxon [75], Riluzol [76] und Memantin [77] in Ihrer Auswirkung auf spinale Schädigungen untersucht. Trotz vieler Strategien zur Therapie und Prophylaxe von spinalen Ischämien während und nach gefäßchirurgischen Interventionen, wie dem *Crossclamping* der thorakalen Aorta, konnten bisher keine sicheren und hochwirksamen pharmakologischen Prophylaxen etabliert werden.

1.2 Rekombinantes und carbamyliertes Erythropoetin

In den vergangenen Jahren ist häufig das Hormon Erythropoetin (EPO) in den Fokus der Forschung gerückt. Seit langem ist EPO zur Behandlung von Anämien etabliert [78]. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass EPO nicht nur hämatopoetische Effekte besitzt, sondern unter anderem auch einen wichtigen endogenen Mediator bei der Adaption der Zelle an metabolischen Stress darstellt [79]. Zu diesen nicht hämatopoetischen Effekten zählen unter anderem antiapoptotische, neuroprotektive und neurotrope Effekte [80, 81]. Viele dieser speziellen Effekte werden nicht über den klassischen, homodimeren Erythropoetin-Rezeptor (EPO-R) vermittelt. Die Vermittlung erfolgt hingegen über ein Rezeptorheterodimer, bestehend aus einer EPO-R- und einer ß-common-Rezeptor (ßcR)-Untereinheit [82]. Zytokine vermitteln die Signale nach Rezeptorbindung häufig über die Aktivierung von Januskinasen (JAK), so auch EPO. Nachdem EPO an das Rezeptorheterodimer gebunden hat, kann es zu einer Autophosphorylierung der Januskinase-2 (JAK-2) kommen. Wie von Brines et al. in 2012 zusammengefasst, wurden drei Hauptpfade identifiziert, die durch die Autophosphorylierung von JAK-2 aktiviert werden können. Dabei handelt es sich um die Signalwege der Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT), der Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) und der Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK). Diese Signalpfade münden in unterschiedlichen Geweben in der Hochregulierung von antiapoptotischen und der Herabregulierung von inflammatorischen und proapoptotischen Signalen [82]. Beispielsweise beschrieben Fu et al. im Jahr 2010, dass carbamyliertes Erythropoetin (cEPO) in humanen, neuronalen Stammzellen die neuronale Differenzierung unterstützt und das axonale Wachstum fördern kann. Zudem beschrieb die Arbeitsgruppe eine Vermittlung dieser Effekte über eine Aktivierung des JAK-STAT-Signalpfades [83]. Der Rezeptor des Zytokins EPO wird in verschiedenen Geweben und Organen exprimiert und dort zur Zytoprotektion genutzt [82, 84, 85]. So kann EPO seine zytoprotektiven Effekte zum Beispiel im zentralen Nervensystem (ZNS) [80], in der Niere [86], am Herzen [87] und in der Retina [88] vermitteln.

Im Jahr 2002 zeigte die Forschungsgruppe Ehrenreich et. al, dass EPO das klinische *Outcome* nach ischämischen Hirninfarkten im Menschen verbessern kann [89]. Die Behandlung von Patienten mit EPO birgt jedoch auch Gefahren. Vor allem durch die hämatopoetische Komponente des EPO kommt es zu einem Anstieg des Hämatokrits und somit zu einem erhöhten Risiko für Thrombosen und thromboembolische Ereignisse. Im Jahr 2009 führten Ehrenreich et al. eine weitere Studie zur Behandlung von zerebralen Insulten mit EPO durch. Die Gruppe berichtete von vermehrten, schweren Komplikationen bei Patienten, die mit EPO behandelt worden waren, wie zum Beispiel Thromboembolien, Hirnödemen oder intrazerebralen Blutungen [90]. Zur Vermeidung dieser Ereignisse wurden Derivate des EPO konstruiert, die über keine hämatopoetische Komponente mehr verfügen, die die zytoprotektiven Eigenschaften des EPO jedoch weiterhin vermitteln. Eines dieser Derivate ist cEPO [91].

Das in dieser Studie verwendete cEPO ist ein Fusionsprotein aus zwei Erythropoetin-Molekülen und einer Fc-Domäne eines humanen IgG Antikörpers (cEPO-Fc). Studien in Tiermodellen haben gezeigt, dass die Anwendung von rekombinantem, humanem Erythropoetin (rhEPO) und cEPO-Fc mit einer besseren Funktion des Rückenmarks nach spinaler IRS korreliert [79, 92-97]. In 2011 konnten Simon et al. im Schweinemodell zeigen, dass rhEPO und cEPO-Fc einen positiven Einfluss auf die Schädigung des Rückenmarks nach spinaler Ischämie und einer Reperfusionszeit (RPFZ) von 8 Stunden haben [98]. Eine weitere Studie der Gruppe im Jahr 2016 zeigte, dass rhEPO im Kaninchen dazu in der Lage ist, das Rückenmark nach einer RPFZ von 96 Stunden gegen Schäden zu schützen [99]. Weitere Studien zeigten, dass Erythropoetin und auch seine carbamylierten Derivate einen positiven Einfluss auf das klinische Outcome nach spinalen und zerebralen Ischämien haben [79, 91, 100-102]. Obwohl die klinischen Effekte von rhEPO und cEPO-Fc in vielen Studien gezeigt werden konnten, sind die zu Grunde liegenden molekularen Pfade bislang weitestgehend unklar. Es wird vermutet, dass das endoplasmatische Retikulum (ER) eine Schlüsselrolle bei der subzellulären Vermittlung der Effekte spielen und der Stress auf das ER (ERS) und dessen Inhibierung dabei entscheidend sein könnte.

1.3 Stress des endoplasmatischen Retikulums und fehlgefaltete Proteine

Das ER ist ein Zellorganell, das eine zentrale Rolle bei der Faltung von Proteinen und damit bei der Aufrechterhaltung von essenziellen Zellfunktionen spielt. Das ER ist ein sehr sensitives Kompartiment der Zelle und kann durch diverse Stressoren aus dem Gleichgewicht geraten. Wie im Jahr 2004 von Rao et al. zusammengefasst, zählen zu diesen Stressoren vor allem die Störung der Kalziumhomöostase [103] sowie oxidativer Stress, ausgelöst durch ROS [104]. Dadurch kommt es zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen in der Zelle, die sekundär weiteren ERS auslösen (Abb. 1).





Da der ERS eine vitale Bedrohung für die Zelle darstellt, reagiert das ER mit unterschiedlichen, subzellulären Programmen, um den ERS auszuhalten, bis die Stressoren beseitigt sind. Eines dieser spezifischen Programme ist die sogenannte *unfolded protein response* (UPR) [103]. Die UPR als eine der Antworten des ER auf ERS ist ein komplexer subzellulärer Prozess, in den viele Proteine und Moleküle involviert sind. Das Hauptziel der UPR ist es, die allgemeinen Zellfunktionen aufrecht zu halten, bis der ERS vorüber ist oder, bei andauerndem ERS, den programmierten und kontrollierten Zelltod einzuleiten [105-107]. Die Funktionsmechanismen der UPR bestehen unter anderem darin, die Zelle in Zell-Arrest zu schicken [108], die Proteinbiosynthese zu inhibieren [109], die Expression von ER ständigen Proteinen zur Duldung des ERS [110, 111] und die *ER associated protein degradation* (ERAD) über das Gen *mif1* zu induzieren [112]. Die ERAD hat zur Aufgabe, fehlgefaltete Proteine im ER Lumen zu erkennen, aus dem Lumen herauszutransportieren, zu ubiquitinylieren und im Zytoplasma im Proteasom abzubauen [113].

Eine Schlüsselrolle innerhalb der UPR spielt das 78-kDa glucose-regulated protein (GRP 78). GRP 78, auch immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) genannt, ist ein ER ständiges [114] Mitglied der Familie der heat shock proteins und wird in Zellen bei Stress induziert [115]. GRP 78 ist bekannt als Chaperon und ist in der UPR in die Aufrechterhaltung der ER Homöostase und die korrekte Proteinfaltung im ER involviert. In ruhenden Zellen bindet GRP 78 an ER-Transmembranproteine, die als Effektoren in der UPR fungieren. Diese drei Effektorproteine sind bekannt als Activating Transcription Factor 6 (ATF 6), Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) und Insositol requiring Enzyme 1a (IRE 1a) [109]. Bei Anfallen und Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen innerhalb des ER wird die UPR durch Dissoziation der Effektoren ATF 6 [116], IRE 1a und PERK vom gebundenen GRP 78 [117] und deren Aktivierung initiiert [118]. Das aktivierte IRE 1 α ist unter anderem dazu in der Lage, durch splicing von mRNA die Transkription des X-box binding protein 1 (XBP1) zu steigern [119]. XBP1 wiederum reguliert Gene, die Proteine der ERAD und der UPR kodieren [120, 121]. Weiterhin kann IRE 1α c-Jun-N-terminale-Kinasen (JNK) aktivieren [122]. Sie stellen wichtige Enzyme der Signaltransduktion dar und können einerseits den Untergang von Zellen, andererseits deren Überleben vermitteln [123-125]. Dies kann beispielweise durch Steigerung der Expression von GRP 78 passieren. Zudem ist IRE 1a dazu in der Lage, den Nuclear-Factor-Kappa-B (NFxB) zu aktivieren [126]. Dieser Faktor kann wiederum Gene, die für Proteine wie human x-chromosome linked inhibitor of apoptosis (XIAP) [127] und B-cell-lymphoma-extra-large (Bcl-XL) [128] kodieren, aktivieren. Diese können sich antiapoptotisch auf die Zelle auswirken. Insgesamt kann eine Aktivierung des IRE 1a über verschiedene Pfade unterschiedliche Einflüsse auf das Überleben oder Sterben der unter ERS stehenden Zelle haben.

PERK wird ebenfalls durch die Dissoziation von GRP78 aktiviert und phosphoryliert folgend Untereinheiten des eukaryotic translation initiation factor-2 (eIF2a). Dies wirkt hemmend auf die allgemeine Translation von mRNA, führt so zu einer verlangsamten Proteinbiosynthese [109, 129] und zu weniger Proteinen, die im ER anfallen. ATF 6 nimmt unter den drei Effektoren der UPR eine Sonderrolle ein, da das aktivierte Molekül direkt am Zellkern (Nucleus) wirkt. Nach der Aktivierung wird ATF 6 zum Golgi-Apparat transportiert und dort gespalten [130-132]. Anschließend kann ATF 6 am Nucleus die Transkription von Genen der UPR beeinflussen, die beispielsweise GRP 78 und XBP1 codieren [119, 133]. Falls es dem ER nicht möglich ist, durch die UPR den ERS zu überstehen, kann über die UPR auf verschiedenen Pfaden die Apoptose eingeleitet werden, wie z.B. durch die Aktivierung der Caspase 12 oder des C/EBP homology protein (CHOP), wie von Rao et al. zusammengefasst [103]. Die eingeleitete Apoptose soll die unter ERS stehende Zelle kontrolliert beseitigen. So kann das unter Stress stehende Gewebe seine Funktionen aufrecht erhalten [134]. Falls aber der kontrollierte Zelltod fehlschlägt, kann der ERS zu unkontrollierten Apoptosen führen, was durch Nekrosen und weitere Inflammation final in der irreversiblen Zerstörung des unter ERS stehenden Gewebes münden kann [135].

1.3.1 ERS spezifische Apoptose im zentralen Nervensystem

Das zentrale Nervensystem (ZNS) bestehend aus dem Gehirn und Rückenmark ist ein sehr sensitives und spezielles Gewebe, welches auf die Wahrung einer allgemeinen Homöostase dringend angewiesen ist. Dabei spielt vor allem die Versorgung mit Sauerstoff und Glukose eine entscheidende Rolle. Störungen dieses Gleichgewichts und Gewebestress können verheerende Folgen für das Gewebe selbst und damit für den gesamten Organismus haben. Auch die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER und der dadurch ausgelöste ERS stellen eine Gefahr für die Zellen des ZNS dar. Viele degenerative Erkrankungen des ZNS, wie zum Beispiel der Morbus Alzheimer, der Morbus Parkinson und die Chorea Huntington, gehen mit einer Akkumulation von Proteinen im ZNS einher [136]. Neben chronisch degenerativen Erkrankungen lösen jedoch auch akute Ischämien ERS im ZNS aus und aktivieren die UPR [137]. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von ERS nach einer Ischämie des zentralen Nervensystems das klinisch neurologische *Outcome* positiv beeinflusst [138-140]. Ein Molekül, dem eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der ER spezifischen Apoptose zugeschrieben wird, ist die Caspase 12 [141]. Im Jahr 2000 berichteten

Nakagawa et al., dass die Caspase 12 durch ERS aktiviert wird. Andere, nicht ER abhängige proapoptotische Signale konnten die Caspase 12 jedoch nicht aktivieren [105]. Die Caspase 12 ist also ein ER spezifisches proapoptotisches Molekül, das bei Aufkommen von ERS exprimiert wird. Weitere Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass in knock-out Zellen, in denen Cytochrom C, Mitochondrien und apoptotic proteaseactivating factor 1 (Apaf-1) ausgeschaltet worden waren, durch die Aktivierung von Caspase 12 eine Apoptose induziert werden konnte [142, 143]. Diese Moleküle sind für die Induzierung von ER unabhängigen Apoptosen zwingend notwendig. In der Vergangenheit konnten verschiedene von ERS abhängige Pfade beschrieben werden, die in der Aktivierung von Caspase 12 münden. Während die Zelle ERS ausgesetzt ist, kann die Caspase 12 durch ein Schlüsselprotein der UPR, dem IRE 1a [144], einer Freisetzung von Kalzium aus dem ER-Lumen und einer Aktivierung von Calpain [145] sowie die Spaltung durch Caspase 7 [143] aktiviert werden. Die aktivierte Caspase 12 ist dann in der Lage, durch die Aktivierung von Caspase 3 und folgend durch Caspase 9 die Apoptose in Gang zu setzen [142]. Insgesamt stellt die Caspase 12 ein wichtiges Schlüsselmolekül in der Vermittlung der ER abhängigen Apoptose unter ERS dar.

1.4 Spinale Ischämie- und Reperfusionssequenzen in Tiermodellen

Um die genauen Mechanismen, die zur Schädigung des Rückenmarks führen, zu untersuchen, sind in der jüngeren Vergangenheit einige Tiermodelle entwickelt worden. Es erfolgten Operationen an Hunden [18], Schweinen [98, 146] und Hasen [99]. Ziel war es, ein reproduzierbares Tiermodell zu entwickeln, in welchem spinale Schäden induziert werden konnten. In diesem Tiermodell sollten dann Strategien zur Prophylaxe einer spinalen Ischämie erforscht werden. Im Jahr 1980 stellten Zivin et al. ein Kaninchenmodell vor, welches in den folgenden Jahren häufig als Standard verwendet wurde [147]. Da mit voranschreitenden Möglichkeiten in Laboratorien die Untersuchung von subzellulären Mechanismen bei der Entwicklung von Ischämie- und Reperfusionsschäden mehr und mehr in den Fokus rückten, war es notwendig, das Hasenmodell in ein Mausmodell zu übersetzen, um beispielweise mit *knock-out* Tieren forschen zu können.

Im Jahr 2000 gelang es Lang-Lazdunski et al., ein solches Modell in Mäusen zu entwickeln. [148]. Die Gruppe führte ein Clamping der linken Arteria mammaria interna, des Aortenbogens zwischen der Arteria carotis sinistra und Arteria subclavia sinistra sowie der Arteria subclavia sinistra durch. Die Clampingzeiten betrugen 9 und 11 Minuten. Darunter gelang es, eine spinale Ischämie zu induzieren, die zu einer sofortigen postoperativen Plegie der Hinterläufe der Tiere führte. Während sich die Plegie in 80 % der 9 min.-Tiere zurückbildete, waren die Schädigungen der 11 min.-Tiere permanent. 2010 beschrieben Awad et al. ein Mausmodell zur Induzierung von spinalen Schädigungen durch Aortencrossclamping, bei welchem es je nach Intervention sowohl zu sofortigen als auch zu verzögerten Schädigungen des Rückenmarks kam. Ob die Schäden unmittelbar postoperativ oder mit Verzögerung auftraten, war abhängig von den Clampingzeiten von 3-11 min. und den Körperkerntemperaturen von 33 oder 35 °C. Die Gruppe fand heraus, dass ein kritischer Schwellenwert, um spinale Ischämien auszulösen, aber trotzdem eine geringe postoperative Sterblichkeit unter den Tieren zu haben, bei 7,5 min. Clampingzeit liegt [149]. Im Jahr 2012 wurde von Smith et al. ein weiteres Mausmodell beschrieben, bei welchem die Aorta descendens distal der Arteria subclavia sinistra und die Arteria subclavia sinistra selbst abgeklemmt wurden. Die Clampingzeiten betrugen 3-12 min. und die Tiere wurden bis 48 Stunden postoperativ mittels Basso Mouse Scale (BMS) alle 12 Stunden neurologisch untersucht. Smith et al. fanden heraus, dass ab einer Clampingzeit von 6 min. eine sofortige und permanente Plegie der Hinterläufe eintritt [150].

1.5 Ziele der Arbeit

Spinale Ischämie- und Reperfusionsschäden stellen nach wie vor ein klinisch bedeutendes Problem dar. Es wird vermutet, dass ERS, die ER abhängige Apoptose sowie die UPR eine zentrale Rolle bei den subzellulären Prozessen spielen und dass rhEPO sowie cEPO-Fc Einfluss auf den ERS und die dadurch vermittelte Apoptose nehmen können. Ziel dieser Arbeit ist die Translation der bisher in unserem Hause bestehenden Großtiermodelle in ein Kleintiermodell, um die oben genannten Zusammenhänge zu untersuchen. Nach der Etablierung eines Kleintiermodells zur Induzierung von spinalen Ischämie- und Reperfusionsschäden in Mäusen sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat die pr\u00e4operative Konditionierung mittels rhEPO und cEPO-Fc auf das klinisch neurologische *Outcome* von M\u00e4usen nach einer spinalen Isch\u00e4mie- und Reperfusionssequenz?
- Welchen Einfluss hat die pr\u00e4operative Konditionierung mittels rhEPO und cEPO-Fc auf das histopathologische *Outcome* des R\u00fcckenmarksgewebes der Versuchstiere?
- Lassen sich in immunhistochemischen F\u00e4rbungen Anhaltspunkte auf m\u00f6gliche subzellul\u00e4re Prozesse auf Ebene des ER und der UPR finden, welche eine Rolle bei der Vermittlung etwaiger Effekte von rhEPO oder cEPO-Fc auf das klinische oder histologische *Outcome* der Versuchstiere spielen?
- Lassen sich mittels qRT-PCR molekulare Prozesse auf Ebene des ER und der UPR nachweisen, welche eine Rolle bei der Vermittlung etwaiger Effekte von rhEPO oder cEPO-Fc auf das klinische oder histologische *Outcome* der Versuchstiere spielen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um ein Jahr alte Mäuse (C57BL/6J). Eine für die Arbeiten benötigte Tierversuchsgenehmigung wurde vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz ausgestellt (Aktenzeichen: 84-02.04.2013.A081, Datum: 06.05.2013). Durch Abklemmen der thorakalen Aorta (direkt unterhalb der Arteria sublavia sinistra) und der Arteria subclavia sinistra wurde eine Ischämie der distalen Körperpartien und der zugehörigen Rückenmarksabschnitte induziert. Zur Validierung der *Clampingzeit* wurden in Vorversuchsgruppen unterschiedliche *Clampingzeiten* von 5, 6, 7 und 8 min. ausgetestet und die Tiere über eine RPFZ von 96 Stunden nachbeobachtet. Wie unter Abschnitt 3.1 beschrieben und unter Abschnitt 4.1 diskutiert ergaben diese Vorversuche eine angestrebte *Clampingzeit* von 7 min..

2.1.2 Studienmedikamente

In dieser Studie wurde die pharmakologische Präkonditionierung von Mäusen bei *Aortencrossclamping* untersucht. Die pharmakologische Präkonditionierung fand mit rhEPO und einem Derivat, dem cEPO-Fc statt. Die Studienmedikamente wurden von der Firma Polymun Scientific GmbH, Klosterneuburg, Österreich bezogen. Das Fusionsprotein cEPO-Fc besteht aus zwei EPO Molekülen und der Fc-Domäne eines humanen IgG1 Antikörpers. Durch die Carbamylierung der EPO Moleküle wird die erythropoetische Komponente des Fusionsproteins unterbunden. Nach einem verblindeten Randomisierungsplan wurden die Studienmedikamente, oder die Trägerlösung als Placebo (PBS-Puffer) allein, 30min. präoperativ appliziert. Dabei wurden für die Studienmedikamente die folgenden Dosierungen gewählt: 5000 IU/kg rhEPO i.p. und 50 µg/kg cEPO-Fc i.p.. Diese Dosierungen wurden zuvor bereits von der eigenen Arbeitsgruppe in Groß- und Kleintiermodellen eingesetzt [98, 99]. Eine EPO Dosis von 5000 IU/kg wurde zudem in der Vergangenheit immer wieder als Dosis beschrieben, unter welcher das Zytokin neuroprotektive Effekte vermittelte [78, 102, 151].

Im Folgenden ist in einem Überblick die Verteilung der Versuchstiere auf die Studiengruppen dargestellt:

Kontrollgruppe (n = 23):

Studienmedikament:	PBS-Puffer	RPFZ = 6 h	n = 5	
Studienmedikament:	PBS-Puffer	RPFZ = 24 h	n = 5	
Studienmedikament:	PBS-Puffer	RPFZ = 96 h	n = 13	
rhEPO Gruppe (n =	20):			
Studienmedikament:	rhEPO	RPFZ = 6 h	n = 5	
Studienmedikament:	rhEPO	RPFZ = 24 h	n = 5	
Studienmedikament:	rhEPO	RPFZ = 96 h	n = 10	
cEPO-Fc Gruppe (n = 22):				
Studienmedikament:	cEPO-Fc	RPFZ = 6 h	n = 6	
Studienmedikament:	cEPO-Fc	RPFZ = 24 h	n = 5	

Studienmedikament: cEPO-Fc RPFZ = 96 h n = 11

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Absaugsystem "INTEGRA	Integra Bioscience, Biebertal,
VACUSAFE"	Deutschland
Dampfdruckkochtopf	BEEM GmbH, Rosbach, Deutschland
Deckgläser 24x32mm	Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland
Einkanalpipetten "Eppendorf Research Plus": 10, 20, 100, 200, 1000 μl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einkanalpipetten "Eppendorf Research": 10, 100, 1000 μl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eismaschine "Scotsman FRIMONT AF 80"	Scotsman Ice, Mailand, Italien
Entsorgungsbeutel	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Feinwaage "Extend sartorius"	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Flüssig-Stickstoff-Probenbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
"Cryoplus3"	Massachusetts, USA
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kanüle 22 G	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland

Klinge Feather A35	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kochplatte	AKO, Wangen im Allgäu, Deutschland
Kosmetiktücher	Tapira, Heidenheim, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Küvetten (250 ml)	Kartell, Noviglio, Italien
Laserdopplersonden	Moor Instruments GmbH, Köln, Deutschland
Magnetrührer "MS 4 basic Yellow ^{line"}	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Micro Tubes (2-, 1,5-, 0,5 ml)	SARSTEDT AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop für Fotoaufnahmen	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	Leica, Wetzlar, Deutschland
Nano-Drop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Nitrilhandschuhe "Micro-Touch Nitra- Tex"	Ansell, Brüssel, Belgien
Objektträger (adhäsiv)	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Objektträger (non adhäsiv)	Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland
--------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------
Parafilm	Bemis Corporate, Neenah, USA
PCR-Cycler	Analytic Jena AG, Jena, Deutschland
PCR-Tubes	SARSTEDT AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
PerfectSpin Mini	peQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter Modell FE20	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetten Modell Research plus 0,5-10, 10-100, 100-1000 μl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettus "Accurpette"	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettus "HIRSCHMANN"	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
qRT-PCR Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, US
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Corning, New York, USA
Spritzen 5 ml Luer Lock solo Omnifix	Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland
Tischzentrifuge "HERAEUS FRESCO 17 Centrifuge"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Vakuumzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Venenverweilkanüle (Vasofix)	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
VORTEX-GENIE 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
Wärmeplatte (slide dryer)	Bio-Optica, Mailand, Italien
Wärmeschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

AEC-Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Buprenorphin	Indivior Inc., North Chesterfield, Virginia, USA
Chloroform	VWR, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CV Mount Eindeckmedium	VWR, Darmstadt, Deutschland
DAB-Kit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Di-Kalium-Di-Hydrogen-Phosphat Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat-Di-RAL Diagnostics, Martillac, Frankreich Hydrat Eosin Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Essigsäure 1 % Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Essigsäure 100 % (Eisessig) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Ethanol 70 % Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Ethanol 99,5 % Leica, Wetzlar, Deutschland Formalin Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Fetales Kälberserum (FCS) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Gentamicin Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland Hämatoxylin-Lösung nach Gill II Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Heparin B. Braun AG, Melsungen, Deutschland Isopropanol Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA Kaliumchlorid VWR, Darmstadt, Deutschland Kalium-di-hydrogen-phosphat VWR, Darmstadt, Deutschland

Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	Zoetis Inc., Parsippany, USA
Kreysylviolett (Acetat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lithium Carbonate	VWR, Darmstadt, Deutschland
Luxol-Fast-Blue	RAL Diagnostics, Martillac, Frankreich
Mayers Hämalaun Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pap-Pen	Kisker Biotech GmbH & Co.KG,
	Stellinuit, Deutschland
Paraffin	Leica, Wetzlar, Deutschland
Pferdeserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Prolene 4-0	Ethicon Inc., Edinburgh, Schottland
Rimadyl (Caprophen)	Zoetis Inc., Parsippany, USA
Ringer-Lactat-Lösung	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
RNAse away	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Shandon-Immu-Mount	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stickstoff (flüssig)	Linde, Dublin, Irland
Streptavidin-HRP	Dako, Jena, Deutschland
SYBRGreen Master-Mix	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tri-Natrium-Citrat-Di-Hydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trizol	Ambion by life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Vicryl 4-0	Ethicon Inc., Edinburgh, Schottland
Wasserstoffperoxid 35 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

2.1.5 Antikörper und Primer

AK-ATF 6 (NBP1-40256-0.1mg) Clone: 70B1413.1

AK-Caspase 12 Gene ID: 12364

AK-GRP 78 (NB 100-56411) Gene ID: 3309

AK-Isotyp-Mouse *Clone: P3.6.2.8.1.*

AK-Isotyp-Rabbit Entrez Gene: LOC100009097

Biotinylierter-AK-Mouse-IgG LOT: Y0907

Biotinylierter-AK-Rabbit-IgG Stock Keeping Unit: BA-1000-1.5

Primer atf 6 Mouse GeneGlobe-Nr.: PPM33057A

Primer ire 1a (Ern2) Mouse GeneGlobe-Nr.: PPM36937A

Primer perk (EIF2AK3) Mouse GeneGlobe-Nr.: PPM26428B

Primer ribosomale 18S GeneGlobe-Nr.: PPM57735E Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA

Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA

eBioscience Inc., San Diego, Kalifornien, USA

Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA

Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

Qiagen, Venlo, Niederlande

Qiagen, Venlo, Niederlande

Qiagen, Venlo, Niederlande

Qiagen, Venlo, Niederlande

2.2 Methoden

Abbildung 2 zeigt schematisch den methodischen Aufbau der vorliegenden Arbeit (Abb. 2). Die Gabe der Studienmedikamente erfolgte wie unter Abschnitt 2.1.2 beschrieben nach einem verblindeten Randomisierungsplan. Die Durchführung der Experimente in vivo und in vitro sowie die Auswertungen erfolgten ebenfalls verblindet. Zur Durchführung der Statistik erfolgte die Entblindung.



Abb. 2: Schematische Darstellung des methodischen Aufbaus der vorliegenden Arbeit. Zu Beginn der Arbeit erfolgten Vorversuche zur Austestung der Clampingzeit. Im Anschluss begannen die operativen Eingriffe mit Applikation der Studienmedikamente nach einem verblindeten Randomisierungsplan, 30 min präoperativ. Es folgten die Reperfusionsphasen (6, 24 und 96 Stunden) und währenddessen die regelmäßige neurologische Evaluation der Tiere mittels Basso Mouse Scale (BMS). Nach Ablauf der Reperfusionsphase wurden die Tiere getötet und das Rückenmark gewonnen, aufbereitet und im Labor prozessiert. Es erfolgte die Erstellung von histologischen (Hämatoxlin-Eosin (HE) und Luxol Fast Blue (LFB)) und immunhistochemischen (Caspase 12, 78-kDa glucose-regulated protein (GRP 78) und activating transcription factor 6 (ATF 6)) Färbungen. Im Anschluss wurden (qRT-PCR) für die Gene atf 6, ire 1a und perk angefertigt. Nachfolgend wurden Fotografien der histologischen und immunhistochemischen Schnitte am Mikroskop erstellt und die Protokolle zur softwaregestützten Auswertung und die Bewertungsscores etabliert. Im Anschluss konnten die Bilder ausgewertet werden, um folgend nach der Entblindung die statistische Auswertung durchzuführen. (eigene Abbildung)

2.2.1 Chirurgischer Eingriff

30 min. präoperativ erfolgte die Applikation der Studienmedikamente nach dem oben beschriebenen Schema. Die Einleitung der Narkose und Analgesie erfolgte mittels Ketamin (Zoetis Inc., Parsippany, USA) 100 mg/kg i.p. und Xylazin (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) 5 mg/kg i.p.. Zudem erfolgte die Verabreichung von Heparin (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) (200 IE/kg) i.p. und Gentamicin (Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) (0,1 mg/Maus in 0,1 ml) s.c.. Anschließend folgte die Intubation der Tiere mit Hilfe eines medizintechnisch modifizierten peripheren Venenverweilkatheters (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) mit zurückgefeilter Spitze (Abb 3.). Die endotracheale Beatmung erfolgte mit einer Atemfrequenz von 230/min. und einem Ventilationsvolumen von 250 µl. Die Analgesie wurde während der Operation mittels 0,05-0,1 mg/kg Buprenorphin s.c. (Indivior Inc., North Chesterfield, Virginia, USA) aufrechterhalten. Es folgte der Beginn der chirurgischen Maßnahmen mit dem Abwaschen des Tieres, Rasieren der Haare und Desinfektion der Haut.



Abb. 3: Einleitung der Narkose und Intubation. a: Verabreichung von Buprenorphin 0,05-0,1 mg/kg s.c. zur Analgesie; b: Aufhängen der Maus in der Haltevorrichtung zur Vorbereitung der Intubation. c: Endotracheale Intubation der Maus mittels eines peripheren Venenverweilkatheters mit medizintechnisch zurückgeschliffener Spitze unter Sicht und Diaphanoskopie. (eigene Abbildung)

Der operative Eingriff erfolgte nach dem folgenden Procedere: Durchführung einer Thorakotomie, Präparation und Darstellung des Aortenbogens mit Art. carotis communis sinistra und Art. subclavia sinistra sowie der thorakalen Aorta descendens. *Clamping* der thorakalen Aorta, distal der Art. subclavia sinistra sowie der Art. subclavia sinistra selbst mittels Yasargil Aneurysma-Klemmen. Monitoring des suffizienten *Clampings* und der Ischämiephase mittels Flussmessung durch Laserdopplersonden (Moor Instruments GmbH, Köln, Deutschland) am rechten Vorder- und linken Hinterlauf. Die Dauer der *Clampingzeit* betrug 7 min.. Nach Ablauf der *Clampingzeit* folgte die Verabreichung von Noradrenalin direkt intrathorakal zum Blutdruckmanagement sowie das *Declamping* der Aorta und Art. subclavia sinistra. Durch das Lösen der Klemmen wurde die Reperfusionsphase eingeleitet (Kontrolle über die Flussmessung). Schichtweiser Verschluss der Thorakotomie mit Vicryl 4-0 (Ethicon Inc., Edinburgh, Schottland). Subcutannaht mit Vicryl 4-0 (Ethicon Inc., Edinburgh, Schottland), Hautnaht mit Prolene 4-0 (Ethicon Inc., Edinburgh, Schottland) (Abb. 4).



Abb. 4: Relevante Operationsschritte. a: Thorakotomie in Rückenlage; b: Clamping von Aorta descendens distal der Art. subclavia sinistra und der Art. subclavia sinistra selbst mittels Yasargil Aneurysma-Klemmen; c: Es erfolgte der schichtweise Verschluss des Thorax und der Operationswunde. (eigene Abbildung)

Es folgte eine Aufwachphase unter einer Sauerstoffglocke (Sauerstoffflussrate ca. 1 l/min.). Die Mäuse wurden über verschiedene Reperfusionszeiten (6, 24 und 96 Stunden) nachbeobachtet. Abbildung 5 zeigt das Tierexperiment und die Einteilung der Studiengruppen (Abb. 5).



Abb. 5: Schematische Darstellung des Tierexperiments und Einteilung der Studiengruppen. 30 min. präoperativ erfolgte die Gabe der Studienmedikamente (rhEpo oder cEpo-Fc) sowie der Trägerlösung (Vehikel (Ktr.)) als Kontrolle. Es resultierten die folgenden Studiengruppen: Kontrolle, rhEpo und cEpo-Fc. Intraoperativ erfolgte für 7 min. das Abklemmen der Aorta distal der Arteria subclavia sinistra sowie der Arteria subclavia sinistra selbst. Die Clampingzeit betrug 7 min.. Mit dem Lösen der Gefäßklemmen wurde die Reperfusionsphase eingeleitet. Die Reperfusionsphase betrug 6, 24 oder 96 Stunden. Durch die verblindete und randomisierte Gabe der Studienmedikamente sowie durch die Reperfusionszeiten entstanden so die Vergleichsgruppen der vorliegenden Studie. (eigene Abbildung)

Zweimal täglich erfolgten eine neurologische Untersuchung und die Erhebung des BMS. Dabei wurde die Blase bei Bedarf manuell ausgedrückt. Zusätzlich erhielten die Tiere 1-1,5 ml Ringer-Lactat-Lösung (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) s.c. und einmal täglich Gentamicin (Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) (0,1 mg/Maus in 0,1 ml) s.c. als antiinfektive Prohpylaxe. Zudem erfolgte zweimal täglich die Verabreichung von Rimadyl (Caprophen) 5 mg/kg Körpergewicht (Zoetis Inc., Parsippany, USA) s.c. als analgetische Therapie.

2.2.2 Evaluation des klinisch neurologischen Outcomes

Die Evaluation des klinisch neurologischen Outcomes erfolgte mit Hilfe des Basso Mouse Scale [152]. Bei diesem Beobachtungsscore werden die motorische Funktion der Hinterläufe, die Koordination der Vorder- und Hinterläufe und die Rumpfstabilität erfasst. Es erfolgt die Zuordnung zu einer 10 Punkte Skala (0-9), wobei eine 0 die vollständige Lähmung der Hinterläufe und eine 9 keinerlei Einschränkungen beschreibt. Nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere über den jeweiligen Reperfusionszeitraum von 6, 24 und 96 Stunden nachbeobachtet und alle 12 Stunden mittels BMS evaluiert. Tiere, die über einen Reperfusionszeitraum von insgesamt 6h nachbeobachtet wurden, wurden vor der Tötung einmalig neurologisch evaluiert.

2.2.3 Gewinnung und Lagerung des Rückenmarksgewebes

Nach Ablauf der jeweiligen RPFZ wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt. Daraus ergaben sich die Messzeitpunkte (MZP) (6, 24 und 96 Stunden) für die Histologie und Immunhistochemie. Anschließend erfolgte die Präparation der Wirbelsäule mittels einer Gewebeschwere. Die Wirbelsäule wurde in drei Abschnitte unterteilt: Den thorakalen Wirbelsäulenabschnitt (WS1), den thorakolumbalen Übergang (WS2) und den lumbosakralen Wirbelsäulenabschnitt (WS3). Von jedem dieser Abschnitte wurde eine Hälfte in Formalin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und in Paraffin (Leica, Wetzlar, Deutschland) eingebettet, die andere Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff (Linde, Dublin, Irland) tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Histopathologie

Zur histologischen Beurteilung wurden eine HE- und eine LFB-Färbung angefertigt. Nach der Entnahme der Wirbelsäule und der Erstellung von Paraffinblöcken wurden histologische Schnittpräparate angefertigt. Die Schnitterstellung erfolgte in 4 µm Dicke am Mikrotom der Fima Leica (Leica, Wetzlar, Deutschland). Da die Wirbelkörper in der Probe verblieben, lagen im Präparat verschiedene Härtegrade vor. Es wurde eine Mikrotomklinge (Feather A35 Klingen, VWR, Darmstadt, Deutschland) verwendet, die sowohl das Schneiden von hartem als auch von weichem Gewebe ermöglicht. Vor dem Schneiden wurden die Paraffinblöcke auf Eisklötzen aus vollentsalztem (VE) Wasser für eine Stunde gekühlt. Nur bei angemessener Kühlung ließ sich das Gewebe zuverlässig in der Schnittdicke von 4 µm schneiden. Die Schnitte wurden am Band erstellt und in ein Wasserbad (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) mit VE-Wasser bei 37 °C gegeben. Dort ließen sie sich auf die Objektträger aufziehen. Für HE- und LFB-Färbungen wurden non-adhäsive Objektträger (Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland) und für IHC-Färbungen adhäsive Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, Deutschland) verwendet. Anschließend wurden die Objektträger zum Trocknen auf eine Wärmeplatte (Bio-Optica, Mailand, Italien) gelegt und anschließend über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufbewahrt, um sie zuverlässig an die Objektträger zu binden. Die finale Lagerung der ungefärbten Objektträger erfolgte trocken und dunkel in Holzkästen für mikroskopische Präparate.

2.2.4.1 Hämatoylin-Eosin-Färbung

Die Durchführung aller Färbevorgänge erfolgte unter einem Abzug mit persönlicher Schutzausrüstung. Zunächst erfolgte die Herstellung der Färbereagenzien. Das Hämatoxylin nach Mayer (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) lag als Gebrauchslösung fertig vor. Zur Herstellung der Eosin-Lösung wurden 3,5 g Eosin-Y (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 500 ml 70 % Ethanol (ETOH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gelöst. So ergab sich eine Konzentration von 0,7 % Eosin-Y. Zu diesem Gemisch wurden 2,5 ml Eisessig (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und zum vollständigen Lösen wurde das Eosin auf einen Magnetrührer gestellt. Weiterhin musste HCL-Alkohol hergestellt werden. Dazu wurden 25 ml konzentrierte, rauchende Salzsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) (HCL) mit 1000 ml 70 % ETOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) versetzt. Vor dem Gebrauch musste diese Suspension noch zu gleichen Teilen mit VE-Wasser verdünnt werden. Neben diesen Lösungen wurden zur Anfertigung der Färbung zwei Küvetten (Kartell, Noviglio, Italien) mit Xylol-Ersatz (Roticlear) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und eine absteigende Alkoholreihe (100 % ETOH (Leica, Wetzlar, Deutschland), 96 % ETOH (960 ml 100 % ETOH + 40 ml VE-Wasser) und 70 % ETOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)) sowie Küvetten mit Leitungswasser und 100

% bzw. 70 % ETOH benötigt. Zunächst wurden die Schnitte für jeweils 5 min. in den Küvetten mit Roticlear entparaffiniert. Anschließend wurde die absteigende Alkoholreihe durchlaufen. Dazu wurden die Schnitte jeweils für 5 min. in 100 %, 96 % und 70 % Alkohol belassen. Der Alkoholreihe schloss sich die Färbung der Schnitte im Hämalaun nach Mayer für 5 min. an. Es folgte das Schwenken der Schnitte in einer Küvette mit Leitungswasser und im Anschluss die Differenzierung für ca. 1 sec. im HCL-Alkohol. Es folgte das sofortige Überführen der Schnitte in eine weitere Küvette mit Leitungswasser und die Bläuung unter fließendem Leitungswasser für 2 min.. Sodann erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle (Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Zellkerne sollten sich zu diesem Zeitpunkt blau gefärbt und das restliche Gewebe sich farblos bis gräulich darstellen. Zeigten die Schnitte nicht das gewünschte Aussehen, musste der Färbevorgang wiederholt werden. Waren die Ergebnisse zufriedenstellend, wurden die Schnitte kurz in 70 % ETOH gespült und dann für 7 min. in eine Küvette mit dem zuvor hergestellten 0,7 % Eosin-Y gestellt. Anschließend erfolgte die Spülung mit Leitungswasser. Folgend wurden die Schnitte zunächst für 10 sec. in einer Küvette mit 100 % ETOH und anschließend in einer zweiten Küvette mit 100 % ETOH für 1 min. gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte noch einmal für je 5 min. in die beiden Küvetten mit Roticlear gestellt und anschließend mit CV-Mount (VWR, Darmstadt, Deutschland) und 24x32 mm Deckgläschen (Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland) eingedeckt.

2.2.4.2 Auswertung der HE-Färbungen

Zur Auswertung der histopathologischen Präparate in der HE-Färbung entwickelten wir einen eigenen HE-Nekrose-Score. Damit ließ sich die Ausprägung einer Nekrose in der HE-Färbung mit Hilfe von verschiedenen Kriterien bewerten und in einen Zahlenwert, entsprechend einem Nekrosegrad von 1-5, übersetzen, um mit den aus den Bildern generierten Daten belastbare statistische Tests durchführen zu können. Es erfolgte die Erstellung von Bildern der Schnitte am Fotomikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland), mittels 10x und 20x Objektiv und 10x Okular und somit in 100facher und 200facher Vergrößerung. Anhand dieser Bilder erfolgte dann die Auswertung. Die Präparate wurden dazu nach den unten aufgeführten vier Hauptkriterien mit einem Punktescore (0-12 Punkte) bewertet. Für jedes Kriterium wurden bis zu 3 Punkte vergeben (kein Vorkommen = 0, geringes Vorkommen = 1, mittleres Vorkommen = 2, häufiges Vorkommen = 3). So ergaben sich die Gesamtpunktzahlen von bis zu 12 Punkten, welche anschließend dem entsprechenden Nekrosegrad (Grad 1-5) wie folgt zugeordnet wurden:

0	Punkte	=	keine Nekrose	=	Nekrosegrad	1,
1-3	Punkte	=	leichte Nekrose	=	Nekrosegrad	2,
4-6	Punkte	=	mittlere Nekrose	=	Nekrosegrad	3,
7-9	Punkte	=	schwere Nekrose	=	Nekrosegrad	4,
10-12	Punkte	=	schwerste Nekrose	=	Nekrosegrad	5.



Abb. 6: Verschiedene Nekrosegrade in der HE-Färbung von thorakalem Mäuserückenmark. a.1: 100x Vergrößerung eines Rückenmarkschnittes mit nekrosefreiem Rückenmarksgewebe. b.1: 200x Vergrößerung eines Rückenmarkschnittes mit nekrosefreiem Rückenmarksgewebe. a.2: 100x Vergrößerung eines Rückenmarkschnittes mit ersten Anzeichen für eine Gewebeschädigung in Form von Ödemen der ventralen weißen Substanz. b.2: 200x Vergrößerung eines Rückenmarkschnittes mit ersten Anzeichen für eine Gewebeschädigung in Form von Schrumpfungen der Motorneurone sowie Verlust der Nukleoli und Homogenisierung des Zytoplasmas. a.3: 100x Vergrößerung eines Rückenmarkschnittes mit ausgeprägten massivem Ödem der weißen Substanz und ausgeprägten Nekrosen um den Zentralkanal mit Ausdehnung bis in die Vorderhörner. b.3: 200x Vergrößerung eines Rückenmarkschnittes mit ausgeprägten Gewebenekrosen um den Zentralkanal und im Vorderhorn. (eigene Abbildung)

Zur Gradierung der Nekrose wurden die folgenden 4 Hauptkriterien mit den jeweils aufgeführten Subkriterien im Präparat bewertet. Die Subkriterien dienten dabei zur einheitlicheren Entscheidungsfindung bei der Bewertung der jeweiligen Hauptkriterien und erhöhen die Objektivität der Methode. Abbildung 6 zeigt beispielhaft verschiedene Nekrosegrade in der HE-Färbung von thorakalem Mäuserückenmark (Abb. 6).

- Hauptkriterium 1: Zystische Veränderungen in weißer Substanz als Korrelat eines Ödems (0-3 Punkte)
 - Die zystischen Veränderungen dominieren die weiße Substanz in 10x Vergrößerung
 - Ventrale weiße Substanz betroffen
 - o Dorsale weiße Substanz betroffen
 - o Zystische Veränderungen in der grauen Substanz
- Hauptkriterium 2: Zentrale Nekrose im Bereich um den Zentralkanal (0-3 Punkte)
 - Die zentrale Nekrose stellt sich bereits in 10x Vergrößerung dar
 - Nur unmittelbar um den Zentralkanal
 - Ausdehnung nach lateral
 - Ausdehnung in das Vorderhorn
 - Ausdehnung in das Hinterhorn
- Hauptkriterium 3: Verlust von Motorneuronen in grauer Substanz (0-3 Punkte)
 - o Motorneurone dominieren nicht das Vorderhorn und Seitenhorn
 - Verlust der Motorneurone im Seitenhorn
 - Verlust der Motorneurone im Vorderhorn
 - o Im Vorderhorn ist nur ein Neuronensaum erhalten
 - Es finden sich keine Motorneurone im Präparat
- Hauptkriterium 4: Fokale Nekrosen in grauer Substanz (0-3 Punkte)
 - Saum um die Motorneurone
 - Eosinophiler Kern
 - Homogenes Zytoplasma
 - Schrumpfung der Motorneurone

Zur histologischen Aufarbeitung wurde das Rückenmark eines jeden Tieres, wie oben beschrieben, in drei Abschnitte (thorakal, thorakolumbal und lumbosakral) unterteilt. Die statistischen Tests wurden im Anschluss an die Auswertung jeweils mit dem Mittelwert der aus den drei Abschnitten generierten Daten durchgeführt, welcher als repräsentativer Wert des jeweiligen Tieres galt.

2.2.4.3 Luxol-Fast-Blue-Färbung

Die Anfertigung der Färbungen erfolgte unter einem Abzug mit persönlicher Schutzausrüstung. Zunächst war auch bei dieser Färbung eine Herstellung der Reagenzien erforderlich. Benötigt wurden 1 % und 10 % Essigsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), eine Luxolechtblau-Färbelösung sowie eine Nissl-Färbelösung und eine 0,05 % Lithiumcarbonatlösung. Zur Herstellung der 1 % Essigsäure wurden 495 ml destilliertes H₂O mit 5 ml Eisessig versetzt. Die Herstellung der 10 % Essigsäure gelang durch Mischen von 90 ml destilliertem H₂O mit 10 ml Eisessig. Zur Anfertigung der Luxolechtblau-Färbelösung wurde 1 g Luxolechtblau (RAL Diagnostics, Martillac, Frankreich) mit 1000 ml 96 % ETOH und 5 ml der angefertigten 10 % Essigsäure gemischt. Die Nissl-Lösung ergab sich aus dem Mischverhältnis von 1 g Kreysylviolett (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 1000 ml destilliertem H₂O mit 10 ml der 10 % Essigsäure. Zuletzt wurden noch 0,5 g Lithiumcarbonat (VWR, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml destilliertem H2O gelöst und somit eine 0,05 % Lithiumcarbonatlösung angefertigt. Nach Herstellung dieser Reagenzien konnte mit der eigentlichen Färbung begonnen werden. Dazu wurden die Schnitte zunächst jeweils 5 min. in zwei Küvetten mit Roticlear entparaffiniert. Es folgte das Waschen der Schnitte in 100 % ETOH und folgend in 96 % ETOH für jeweils 3 min.. Anschließend wurden die Schnitte in eine Glasküvette mit der Luxolechtblau-Lösung gestellt. Die Küvette wurde mit einem Deckel verschlossen, mit Parafilm (Bemis Corporate, Neenah, USA) abgedichtet und in handelsüblicher Folie aus Aluminum verpackt. Die Inkubation in der Färbelösung geschah über Nacht bei 60 °C im Wärmeschrank (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Nach erfolgter Inkubation wurden die Schnitte zunächst in 96 % ETOH und folgend in Leitungswasser gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte zunächst für 5 sec. in die Lithiumcarbonatlösung getaucht und folgend sofort zur Differenzierung für 9 sec. in 70 % ETOH gewaschen und anschließend in eine Küvette mit destilliertem H2O gestellt. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei die Schnitte für 15 sec. in der Lithiumcarbonatlösung belassen wurden. Es folgte eine lichtmikroskopische Kontrolle. Das Rückenmark sollte sich wie folgt darstellen. Das zentrale Mark, die graue Substanz, sollte hell auszumachen sein, wobei die Rinde, die weiße Substanz, ein sattes Türkis zeigen sollte. War das Ergebnis nicht zufriedenstellend, wurde eine erneute Entfärbung in Lithiumcarbonat mit anschließender Differenzierung in 70 % ETOH durchgeführt. Es war dabei zu beachten, diese Schritte nicht zu oft zu wiederholen, da es

sonst schnell zu einer zu deutlichen Entfärbung kam. Zeigten die Schnitte das gewünschte Bild, konnte die Färbung fortgesetzt werden. Dazu wurden die Schnitte für 1 min. in die zuvor hergestellte 1 % Essigsäure gebracht. Diesem Schritt schloss sich eine 5 min. andauernde Färbung in der Nissl-Lösung an. Spülen für 20 sec. in 10 % Essigsäure und kurzes Waschen in 96 % ETOH. Zum Abschluss wurden die Schnitte für 3 min. 100 % ETOH ausgesetzt und folgend erneut für je 5 min. in die beiden Küvetten mit Roticlear gebracht, bevor sie mit CV-Mount (VWR, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläschen (Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland) eingedeckt wurden.

2.2.4.4 Auswertung LFB

Die Auswertung der LFB-Färbungen erfolgte softwareunterstützt durch eine Toolbox für die Fiji-Software (BioVoxxel, Mutterstadt, Deutschland). Nach der Erstellung von Bildern der Schnitte am Fotomikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurde die Auswertung der Bilder durchgeführt. Zunächst erfolgte am Bild die Definition einer Region of Interest (ROI), in der die Bildauswertung vorgenommen werden sollte. Zur Bewertung der Motorneurone in den Vorderhörnern des Rückenmarkes wurden die Vorderhörner als ROI ausgewählt. Das technische Vorgehen wurde von der eigenen Arbeitsgruppe bereits 2018 veröffentlicht [2]. Nach Einzug einer Geraden durch die beiden Scheitelpunkte der Vorderhörner wurde diese im Bild auf die dorsale Begrenzung des Zentralkanals verschoben. Anschließend erfolgte manuell die Selektion der Begrenzung der Vorderhörner nach ventral, der Grenze zwischen grauer und weißer Substanz folgend. Die Fläche der ROI war mittels der Fiji-Software bestimmbar. Nach Selektion der ROI erfolgte mit dem Cell-Counter die manuelle Auszählung der Motorneurone innerhalb der ROI. Um einen statistisch vergleichbaren Zahlenwert zu erhalten, wurde die Anzahl der Motorneurone durch die zuvor gemessene Fläche der ROI geteilt (Neurone/Fläche). Zur histologischen Aufarbeitung wurde das Rückenmark eines jeden Tieres, wie oben beschrieben, in drei Abschnitte (thorakal, thorakolumbal und lumbosakral) unterteilt. Die statistischen Tests wurden im Anschluss an die Auswertung jeweils mit dem Mittelwert der aus den drei Abschnitten generierten Daten durchgeführt, welcher als repräsentativer Wert des jeweiligen Tieres galt.

2.2.5 Immunhistochemie

Neben der allgemeinen Histopathologie wurde das Gewebe mittels Immunhistochemie (IHC) evaluiert. Immunhistochemische Färbungen wurden dazu für die Proteine Caspase 12, GRP 78 und ATF 6 angefertigt (Abb. 7). Die Färbevorgänge wurden unter einem Abzug mit persönlicher Schutzausrüstung durchgeführt. Die Schnitterstellung erfolgte wie oben beschrieben in 4 µm Dicke aus Paraffinblöcken an einem Mikrotom der Fima Leica (Leica, Wetzlar, Deutschland). Für die Anfertigung der IHC Färbungen wurden auf jedem adhäsiven Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, Deutschland) zwei Paraffinschnitte platziert. Einer wurde mit dem jeweiligen Antikörper markiert, der andere diente als Negativkontrolle.



Abb. 7: Immunhistochemische Färbungen. a: IHC mit Nachweis der Caspase 12 mittels AEC-Kit. Positiver Nachweis des Proteins gekennzeichnet durch roten Farbausschlag. b: IHC mit Nachweis von GRP 78 mittels DAB-Kit. Positiver Nachweis des Proteins gekennzeichnet durch braunen Farbausschlag. c: IHC mit Nachweis von ATF 6 mittels DAB-Kit. Positiver Nachweis des Proteins gekennzeichnet durch braunen Farbausschlag. (eigene Abbildung)

2.2.5.1 Anfertigung eines PBS-Puffers

Zur Anfertigung des in unseren immunhistochemischen Färbungen verwendeten PBS-Puffers wurden die folgenden Salze in 2000 ml destilliertem Wasser gelöst: 180 g Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 23 g Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat-Di-Hydrat (RAL Diagnostics, Martillac, Frankreich), 4 g Kaliumchlorid (VWR, Darmstadt, Deutschland) und 4 g Kalium-Di-Hydrogen-Phosphat (VWR, Darmstadt, Deutschland). Zum vollständigen Lösen der Salze wurde die Lösung für ca. 2 Stunden auf einen Magnetrührer (IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland) gestellt. Der Puffer wurde anschließend bei 4 °C gelagert.

2.2.5.2 Anfertigung eines Citrat-Puffers

Zur Anfertigung des Citrat-Puffers wurden die folgenden Salze in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst: 3,78 g Citronensäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 24,21 g Tri-Natrium-Citrat-Di-Hydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Der pH-Wert des Puffers wurde mit Hilfe eines pH-Meters (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) auf 6 eingestellt. Zum vollständigen Lösen der Salze wurde die Lösung für ca. 2 Stunden auf einen Magnetrührer (IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland) gestellt. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.5.3 Caspase 12

Zu Beginn der Färbung mussten die Paraffinschnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden die Objektträger nacheinander für je 5 min. in eine Küvette mit Roticlear platziert. Es folgte die Waschung in einer absteigenden Alkoholreihe von 100 % ETOH über 96 % ETOH zu 70 % ETOH für je 3 min.. Anschließend wurden die beiden Schnitte auf dem Objektträger mittels eines PAP-Stiftes (Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt, Deutschland) voneinander abgegrenzt, um ein Verlaufen der Antikörper zu verhindern und eine verlässliche Negativkontrolle zu gewährleisten. In dieser Phase wurden die Schnitte mittels PBS-Puffer tropfenweise feucht gehalten. Es folgte ein Waschen der Schnitte in einer Küvette mit PBS-Puffer für 3 min.. Anschließend wurden die Schnitte in eine Küvette mit 3 % H₂O₂ (200 ml PBS-Puffer + 6 ml H₂O₂ (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)) überführt und für 10 min. dort belassen. Es folgte die Waschung der Objektträger in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 5 min.. Anschließend wurden die Objektträger in einer Feuchtkammer abgelegt und mit Anti-Caspase 12-Antikörper (2 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und Negativkontrolle (Rabbit IgG (2 µg/ml)) (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA) in PBS-Puffer/TritonX (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit 2-5 % Pferdeserum (Biochrom, Berlin, Deutschland) für 90 min. inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in drei Küvetten mit PBS-Puffer für je 5 min. gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem biotinyliertem anti-Rabbit-IgG (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) in PBS-Puffer (2 ml PBS-Puffer + 2 ml PBS/TritonX + 16 µl biot.-antiRabbit-IgG) für 45 min.. Die Inkubation erfolgte erneut in der Feuchtkammer. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 5 min. gewaschen. Es folgte die Inkubation in der Feuchtkammer mit Streptavidin-HRP (1,8 ml PBS + 1,8 ml

PBS TritonX + 6,6 µl Streptavidin-HRP (Dako, Jena, Deutschland)) für 45 min. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 5 min. gewaschen. Es folgte die Farbentwicklung. Zur Anwendung kam ein AEC-Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Nach Firmenprotokoll wurden aus den Dosierflaschen 5 ml H₂O mit 2 Tropfen der Lösung A, 2 Tropfen der Lösung E und 2 Tropfen der Lösung C vermischt. In der Feuchtkammer wurden die Schnitte mit dem Gemisch betropft und die Lösung für 10 min. inkubiert. Um die Reaktion nach 10 min. zu stoppen, wurden die Schnitte ausgiebig in einer Küvette mit PBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde das Gewebe mittels Hämatoxylin nach Gill II (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in einer Küvette für 1-3 sec. gegengefärbt. Es folgte die Waschung für 5 min. unter fließendem Wasser. Anschließend wurden die Objektträger für 1 min. in einer Küvette mit frisch filtrierter, gesättigter Lithiumcarbonatlösung (Li₂CO₃) platziert und anschließend erneut für 5 min. unter fließendem Wasser gewaschen. Abschließend erfolgte die Eindeckung mit Shandon-Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und Deckgläschen (Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland).

2.2.5.4 78-kDa glucose-regulated protein

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte. Dazu wurden die Objektträger nacheinander für je 5 min. in eine Küvette mit Roticlear platziert. Es folgte die Waschung in einer absteigenden Alkoholreihe von 100 % ETOH über 96 % ETOH zu 70 % ETOH für je 3 min.. Nun erfolgte ein Antigen unmasking. Dazu wurden die Schnitte in Küvetten mit einem Citrat-Puffer mit einem pH von 6 (90 ml PBS-Puffer + 10 ml Citrat-Puffer) platziert und für 10 min. in einem Dampfdruckkochtopf (BEEM GmbH, Rosbach, Deutschland) auf einer Kochplatte (AKO, Wangen im Allgäu, Deutschland) bei 100 °C gekocht. Anschließend wurden die beiden Schnitte auf dem Objektträger mittels eines PAP-Stiftes voneinander abgegrenzt, um ein Verlaufen der Antikörper zu verhindern. In dieser Phase wurden die Schnitte mittels PBS-Puffer tropfenweise feucht gehalten. Es folgte ein Waschen der Schnitte in einer Küvette mit PBS-Puffer für 3 min.. Anschließend wurden die Schnitte in einer Küvette mit 3 % H2O2 (200 ml PBS-Puffer + 6 ml H2O2) für 10 min. inkubiert. Es folgte die Waschung der Objektträger in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 3 min.. Sodann erfolgte ein Antigenblocking mittels fetalem Kälberserum (FCS) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und bovinem Serumalbumin (BSA) (Biomol, Hamburg, Deutschland) (20 % FCS + 1 % BSA in PBS/TritonX) für 45 min. in

der Feuchtkammer. Anschließend wurden die Objektträger mit Anti-GRP 78-Antikörper (Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA) (1:250 in PBS-Puffer/TritonX + 2 % FCS + 1 % BSA) und Negativkontrolle (Rabbit IgG (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA) 1:250 in PBS-Puffer/TritonX + 2 % FCS + 1 % BSA) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Schnitte nacheinander in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 3 min. gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem biotinyliertem anti-Rabbit-IgG (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) in PBS-Puffer (1990 µl PBS-Puffer + 1990 µl PBS/TritonX + 16 µl biot.-antiRabbit-IgG) für 45 min.. Die Inkubation erfolgte erneut in der Feuchtkammer. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 3 min. gewaschen. Die Inkubation in der Feuchtkammer mit Streptavidin-HRP (1,8 ml PBS + 1,8 ml PBS TritonX + 6,6 µl Streptavidin-HRP) folgte für 45 min.. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 3 min. gewaschen. Es folgte die Farbentwicklung. Zur Anwendung kam ein DAB-Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Nach Firmenprotokoll wurden aus den Dosierflaschen 1 ml Puffer mit einem Tropfen Reagenz vermischt. In der Feuchtkammer wurden die Schnitte mit dem Gemisch betropft und die Lösung für 5 min. auf dem Schnitt belassen. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Schnitte ausgiebig in einer Küvette mit PBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde das Gewebe mittels Hämatoxylin nach Gill II (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in einer Küvette für 1-3 sec. gegengefärbt. Es folgte die Waschung für 5 min. unter fließendem Wasser. Anschließend wurden die Objektträger für 1 min. in einer Küvette mit frisch filtrierter, gesättigter Lithiumcarbonatlösung (Li₂CO₃) platziert und anschließend erneut für 5 min. unter fließendem Wasser gewaschen. Abschließend erfolgte die Eindeckung mit Shandon-Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und Deckgläschen (Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland).

2.2.5.5 Activating transcription factor 6

Zunächst erfolgte die Platzierung der Objektträger nacheinander für je 5 min. in einer Küvette mit Roticlear zur Entparaffinierung. Anschließende Waschung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe von 100 % ETOH über 96 % ETOH zu 70 % ETOH für je 3 min.. Sodann erfolgte ein Antigen *unmasking*. Dazu wurden die Schnitte in Küvetten mit einem Citrat-Puffer mit einem pH von 6 (90 ml PBS-Puffer + 10 ml Citrat-Puffer) platziert und für 10 min. in einem Dampfdruckkochtopf (BEEM GmbH, Rosbach,

Deutschland) bei 100 °C gekocht. Anschließend wurden die beiden Schnitte auf dem Objektträger mittels eines PAP-Stiftes voneinander abgegrenzt. In dieser Phase wurden die Schnitte mittels PBS-Puffer tropfenweise feucht gehalten. Es folgte ein Waschen der Schnitte in einer Küvette mit PBS-Puffer für 3 min.. Anschließend wurden die Schnitte in einer Küvette mit 3 % H₂O₂ (200 ml PBS-Puffer + 6 ml H₂O₂) für 10 min. gewaschen. Folgend wurden die Objektträger in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 3 min. gewaschen und anschließend mit Anti-ATF 6-Antikörper (Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA) (1:300 in PBS-Puffer/TritonX + 2 % FCS + 1 % BSA) und Negativkontrolle (Mouse IgG (eBioscience Inc., San Diego, Kalifornien, USA) 1:300 in PBS-Puffer/TritonX + 2 % FCS + 1 % BSA) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Schnitte nacheinander in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 3 min. gewaschen. Anschließend wurde die Inkubation mit einem biotinyliertem anti-Mouse-IgG (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) in PBS-Puffer (1990 µl PBS-Puffer + 1990 µl PBS/TritonX + 16 µl biot.-antiRabbit-IgG) für 45 min. durchgeführt. Die Inkubation erfolgte erneut in der Feuchtkammer. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 3 min. gewaschen. Erneut wurde die Inkubation in der Feuchtkammer mit Streptavidin-HRP (1,8 ml PBS + 1,8 ml PBS TritonX + 6,6 µl Streptavidin-HRP) für 45 min. durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in zwei Küvetten mit PBS-Puffer für je 3 min. gewaschen. Anschließend wurde die Farbentwicklung durchgeführt. Zur Anwendung kam ein DAB-Kit. Nach Firmenprotokoll wurden aus den Dosierflaschen 1 ml Puffer mit einem Tropfen Reagenz vermischt. In der Feuchtkammer wurden die Schnitte mit dem Gemisch betropft und die Lösung für 5 min. auf dem Schnitt belassen. Um die Reaktion nach 5 min. zu stoppen, wurden die Schnitte ausgiebig in einer Küvette mit PBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde das Gewebe mittels Hämatoxylin nach Gill II (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 1-3 Sekunden gegengefärbt. Es folgte die Waschung für 5 min. unter fließendem Wasser. Anschließend wurden die Objektträger für 1 min. in einer Küvette mit frisch filtrierter, gesättigter Lithiumcarbonatlösung (Li₂CO₃) platziert und anschließend erneut für 5 min. unter fließendem Wasser gewaschen. Abschließend erfolgte die Eindeckung mit Shandon-Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und Deckgläschen (Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland).

2.2.5.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte softwareunterstützt durch eine Toolbox für die Fiji-Software (BioVoxxel, Mutterstadt, Deutschland). Zunächst wurden Bilder der Schnitte am Fotomikroskop erstellt und anschließend mittels der oben genannten Software ausgewertet. Das Erstellen und Messen der ROI erfolgte analog zu dem oben unter 2.2.4.4. beschriebenen Vorgehen. Wie in 2018 bereits von der eigenen Arbeitsgruppe veröffentlicht, erfolgte die Umwandlung der Bilder über Schwellenwerte und Graustufen in binäre schwarz-weiß Kontraste, in denen die immunhistochemischen Farbausschläge dargestellt werden konnten (Abb. 8) [2]. So konnten die immunhistochemisch angefärbten Antigene automatisch durch die Software ausgezählt werden. Eine statistisch belastbare Zahl wurde durch die Division der absoluten Zählungen durch die gemessene Fläche (Zählung/Fläche) generiert. Zur immunhistochemischen Aufarbeitung wurde das Rückenmark jedes Tieres in drei Abschnitte (thorakal, thorakolumbal und lumbosakral) unterteilt. Die statistischen Tests wurden im Anschluss an die Auswertung jeweils mit dem Mittelwert der aus den drei Abschnitten generierten Daten durchgeführt, welcher als repräsentativer Wert des jeweiligen Tieres galt.



Abb. 8: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mittels Fiji-Software. Schlüsselschritte in der Bildauswertung mittels Fiji-Software (in Vergr. 10:1 am Fotomikroskop erstellt). "a: Lichtmikroskopisches Bild eines Rückenmarkquerschnitts. Das gesuchte Protein Caspase 12 (rote Punkte) ist hier mittels Immunhistochemie gegenüber dem Umgebungsgewebe (blau) selektiv angefärbt. Die Zahlen (1–5) markieren anatomische Landmarken des Rückenmarks: 1 Zentralkanal, 2 Vorderhorn, 3 Hinterhorn, 4 graue Substanz, 5 weiße Substanz. In gelb sind die ersten Schritte zur Definierung der ROI ("region of interest") dargestellt. b: Es wird ein binäres Bild mit Schwarz-Weiβ-Kontrasten erstellt, um das Bild automatisch auszählen zu lassen. In gelb ist die zu untersuchende ROI eingezeichnet. c: Von Fiji-Software erstellte Maske des fertig ausgezählten Schnitts. Die Maske zeigt alle vom Programm gezählten Partikel." (eigene Abbildung, bereits publiziert, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature) [2].

2.2.6 Molekularbiologie

2.2.6.1 Isolierung von RNA aus Kryoproben

Die zur Lagerung in -160 °C Flüssigstickstoff in *Tubes* aufbewahrten *Kryoproben* wurden zunächst in den *Tubes* auf Eis gelagert und langsam aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde das Rückenmarksgewebe aus dem Spinalkanal herauspräpariert (Abb. 9).



Abb. 9: Präparation der Kryoproben zur Gewinnung des Rückenmarksgewebes. a: Nach dem Auftauen auf Eis wurde das Gewebe in eine Petrischale zur Präparation gelagert. Das Präparat besteht aus den Wirbelkörpern, dem Spinalkanal mit den Rückenmarkshüllen und dem Rückenmark sowie paravertebraler Muskulatur und ggf. Rippenanteilen. b: Mittels einer feinen Schere kann die Lamina zu beiden Seiten lateral inzidiert und im Anschluss mit Pinzetten i.S. einer Laminektomie abpräpariert werden. c: Im Anschluss lässt sich das Rückenmarksgewebe mit den Pinzetten aus dem Spinalkanal herauslösen. (eigene Abbildung)

Die Rückenmarksabschnitte WS1, WS2 und WS3 eines Versuchstieres wurden in ein neues 2 ml Tube, gefüllt mit 1 ml Trizol (Ambion by life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) überführt. Folgend wird das Rückenmarksgewebe unter einen Abzug in Trizol mit Hilfe von 1 ml Spritzen und 22 G Kanülen (B.Braun, Melsung, Deutschland) durch wiederholtes Aspirieren homogenisiert und für 10 min. bei Raumtemperatur (Rt) inkubiert. Das Homogenisat kann in den Tubes bei -80 °C gelagert werden. Zur Isolierung der RNA wurden die Lysate für 5 min. bei 200 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Tube gegeben. 200 µl Chloroform (VWR, Darmstadt, Deutschland) wurden zugefügt und die Proben kurz geschwenkt. Inkubation für eine Dauer von 5 min.. Zentrifugieren der Proben für 15 min. bei 12.000 x g und 4 °C. Beim Zentrifugieren kam es zu einer Separation der Probe in 3 Schichten. In der oberen Phase befand sich die RNA. Diese wurde ohne die mittlere Phase (DNA) abpipettiert und in ein neues Tube transferiert. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C. In der unteren Schicht befanden sich die Proteine. Diese wurden für etwaige spätere Versuche ebenfalls in ein neues Tube transferiert und bei -80 °C gelagert. Dann erfolgte die Fällung der isolierten RNA. Zu der isolierten RNA wurden 0,5 ml 100 % Isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gegeben und die Proben

geschwenkt. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10 min.. Anschließend wurde eine Zentrifugation der Proben für 10 min. bei 12.000 x g und 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde anschließend abpipettiert und verworfen. Das Waschen der gefällten RNA erfolgte mit 1 ml eiskaltem 75 % ETOH. Es folgte die Zentrifugation der Proben für 5 min. bei 7.500 x g bei 4 °C. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und verworfen. Daraufhin wurde die pelletierte RNA mit 1 ml eiskaltem 75 % ETOH gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entnommen und verworfen. Zum Trocknen des Pellets sowie zur Entfernung des ETOHs folgte eine Zentrifugation der Proben in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 5 min. bei Rt. Abschließend wurde das Pellet in 20 μ l RNAse freiem Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgte mittels Nano-Drop (Thermo Fischer Scientific).

2.2.6.2 Synthese von cDNA aus RNA

Da in allen Proben dieselbe Menge an RNA umzusetzen war, erfolgte vorher die Messung der RNA Konzentration mittels Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Für die cDNA Synthese wurden 179,9 ng RNA verwendet. Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied BiosystemsTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Das Pipettieren der Reagenzien für die cDNA Synthese wurde auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde der 2X reverse Transkriptase (RT) master mix angesetzt. Dazu wurden je Probe 2 µl 10X RT Puffer, 0,8 µl dNTP Mix (100mM), 2 µl RT Random Primers, 1,0 μ l MultiScribeTM Reverse Transcriptase, 2 μ l nucleasefreies H₂O in einem Reaktionsgefäß gemischt. Es folgte das Pipettieren von 10 µl des 2X RT master mix und 10 µl der jeweiligen RNA Probe in PCR-Tubes (Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland). Anschließend wurden die Proben durch jeweils zweifaches Auf- und Abpipettieren vermischt. Kurzes Zentrifugieren der Tubes. Anschließend erfolgte die Inkubation im PCR-Cycler (Analytic Jena AG, Jena, Deutschland) bei 25 °C für 10 min., dann bei 37 °C für 120 min. und zur Inaktivierung der reversen Transkiptase erfolgte eine Inkubation bei 85 °C für 5 min.. Parallel wurden negativ RT-Kontrollen, welche keine reverse Transkriptase enthalten, mitgeführt. Die cDNA wurde anschließend bei - 20 °C gelagert.

2.2.6.3 qRT-PCR

In dieser Arbeit wurden die Gene *atf 6, ire 1a* sowie *perk* untersucht. Als *Housekeeper* wurde die ribosomale RNA *18S* verwendet. Für die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) wurden die gewonnenen cDNA Proben (Abschnit 2.2.6.2) verwendet. Es erfolgte das Pipettieren von 2 µl cDNA (oder RT-Kontrolle), 1 µl Primer-Mix (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande), 10 µl SYBRGreen Master-Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und 20 µl H₂O in die vorgesehenen *wells* einer 96-*well* Mikrotitierplatte. Die Mikrotitierplatten wurde sicher verschlossen und zentrifugiert, bevor sie im qRT-PCR *Cycler* (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, US) das folgende Programm durchliefen: initiale Erhitzung auf 95 °C für 3 min., dann folgten 40 Zyklen mit 95 °C für jeweils 3 sec., gefolgt von der *Primer*-Hybridisierung für 30 sec. bei 60 °C Temperatur. Darauf folgte die Elongation für 30 sec. bei 72 °C. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurve erstellt, indem die Proben für 15 sec. auf 95 °C erhitzt wurden und dann mit 1 °C/min. bis auf 55 °C heruntergekühlt wurden. Die Datenanalyse erfolgte mit Excel mittels der ddCt-Methode.

2.2.7 Statistik

Die gesammelten Daten stammten von Tieren, die zum Ende der angestrebten RPFZ am Leben waren. Daher wurden Tiere, welche vorzeitig verstarben, von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Die Analysen wurden mittels der Software SigmaPlot 13 (Systat Software Inc, San Jose, Calif.) angefertigt. Die Randomisierung der Tiere erfolgte durch Losung. Die Testung auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests. Der Gruppenvergleich wurde mittels Kruskal-Wallis, bei nicht-Normalverteilung, und mittels Brown-Forsythe, bei Normalverteilung, durchgeführt. Ein post-hoc Test wurde nach Dunn's Method, bei nicht-Normalverteilung, und nach Bonferroni, bei Normalverteilung, angefertigt. Beim Vergleich zweier Gruppen erfolgte die statistische Testung mittels T-Test. Die Daten wurden mittels Box-Plots in Median und Range dargestellt, wobei die Box neben dem Median das obere und untere Quartil darstellt. Der obere und untere Whisker definiert jeweils das Maximum und Minimum. Eine Ausnahme bildet, zur besseren Darstellung der Daten über die Zeit, Abb. 10 in Abschnitt 3.2.. Hier wurden die Daten graphisch mittels Liniendiagramm in Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Das Signifikanzniveau liegt bei $p \le 0.05$.

3 Ergebnisse

3.1 Austestung der Clampingzeit

Die Vorversuche zur Austestung einer *Clampingzeit* von 5 min. ergaben im Median Werte im BMS *Scoring* von 9 zu allen Beobachtungszeitpunkten (Tab. 1).

Clampingzeit	Beobachtungszeitpunkt post OP	BMS
5 min	12h	9 (9)
	24h	9 (9)
	36h	9 (6-9)
	48h	9 (4-9)
	60h	9 (4-9)
	72h	9 (4-9)
	84h	9 (4-9)
	96h	9 (0-9)

Tab. 1: BMS Austestung der Clampingzeit 5 min.. Daten in Median und Range. Nach 5 min. Clampingzeit zeigten sich im Median zu jedem Beobachtungszeitpunkt BMS Scores von 9 (n=3).

Die Vorversuche zur Austestung einer *Clampingzeit* von 6 min. ergaben im Median Werte im postoperativen BMS *Scoring* von 4-9 (Tab. 2).

Clampingzeit	Beobachtungszeitpunkt post OP	BMS
6 min	12h	9 (0-9)
	24h	7 (0-9)
	36h	4 (0-9)
	48h	4 (0-9)
	60h	4 (0-9)
	72h	5 (0-9)
	84h	4 (0-9)
	96h	5 (0-9)

Tab. 2: BMS Austestung der Clampingzeit 6 min.. Daten in Median und Range. Nach 6 min. Clampingzeit zeigten sich Medianwerte des BMS Scores von 4-9 (n=11).

Die Vorversuche zur Austestung einer *Clampingzeit* von 7 min. ergaben im Median Werte im postoperativen BMS *Scoring* von 0-1 (Tab. 3).

Clampingzeit	Beobachtungszeitpunkt post OP	BMS	
7 min	12h	0 (0-9)	
	24h	0 (0-9)	
	36h	1 (0-9)	
	48h	1 (0-9)	
	60h	1 (0-9)	
	72h	1 (0-9)	
	84h	1 (0-9)	
	96h	1 (0-9)	

Tab. 3: BMS Austestung der Clampingzeit 7 min.. Daten in Median und Range. Nach 7 min. Clampingzeit zeigten sich Medianwerte des BMS Scores von 0-1 (n=9).

Die Vorversuche zur Austestung einer *Clampingzeit* von 8 min. ergaben im Median Werte im BMS *Scoring* von 0 zu allen Beobachtungszeitpunkten postoperativ (Tab. 4).

Clampingzeit	Clampingzeit Beobachtungszeitpunkt post OP		ngzeit Beobachtungszeitpunkt post OP BMS		
8 min	12h	0 (0-9)			
	24h	0 (0-9)			
	36h	0 (0-1)			
	48h	0 (0-1)			
	60h	0 (0-7)			
	72h	0 (0-7)			
	84h	0 (0-6)			
	96h	0 (0-6)			

Tab. 4: BMS Austestung der Clampingzeit 8 min.. Daten in Median und Range. Nach 8 min. Clampingzeit zeigten sich im Median zu jedem Beobachtungszeitpunkt BMS Scores von 0 (n=4).

3.2 Neurologisches Outcome

In den Studiengruppen der Tiere, die über 6 und 24 Stunden nachbeobachtet worden waren, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im BMS (Tab. 5).

Beobachtungszeitpunkt	BMS Kontrollgruppe	BMS rhEPO-Gruppe	BMS cEPO-Fc-Gruppe
6h	3 (0-7)	2 (0-3)	0 (0-3)
Beobachtungszeitpunkt	BMS Kontrollgruppe	BMS rhEPO-Gruppe	BMS cEPO-Fc-Gruppe
12h	9 (0-9)	9 (8-9)	9 (0-9)
24h	9 (0-9)	9 (8-9)	9 (0-9)
	Beobachtungszeitpunkt 6h Beobachtungszeitpunkt 12h 24h	Beobachtungszeitpunkt BMS Kontrollgruppe 6h 3 (0-7) Beobachtungszeitpunkt BMS Kontrollgruppe 12h 9 (0-9) 24h 9 (0-9)	BeobachtungszeitpunktBMS KontrollgruppeBMS rhEPO-Gruppe6h3 (0-7)2 (0-3)BeobachtungszeitpunktBMS KontrollgruppeBMS rhEPO-Gruppe12h9 (0-9)9 (8-9)24h9 (0-9)9 (8-9)

Tab. 5: BMS 6 und 24 Stunden Gesamtreperfusionszeitraum. Daten in Median und Range. Nach 6 und 24 Stunden RPFZ zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede im neurologischen Outcome der Tiere. Kontrolle n = 5; rhEPO n = 5; cEPO-Fc n = 6.

Während der Reperfusionssequenz von 96 Stunden zeigten die Tiere der Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten ein signifikant schlechteres neurologisches Outcome im BMS als Tiere der rhEPO- und cEPO-Fc Gruppen (Abb. 10).



Abb. 10: BMS bei einer Reperfusionsphase von 96 Stunden. Basso Mouse Scale der Tiere der 96 Stunden Reperfusionsgruppe. Verglichen werden die BMS-Werte der Tiere, die mit rhEPO, cEPO-Fc oder Kontrolle (PBS) präkonditioniert wurden. Dargestellt sind die Daten in Mittelwert und Standardabweichung. Tiere, welche die Studienmedikamente rhEPO und cEPO-Fc verabreicht bekamen, zeigten über eine RPFZ von 96 Stunden ein signifikant besseres neurologisches Outcome als Tiere der Kontrollgruppe. *p < 0,05 rhEPO und cEPO-Fc vs. Kontrolle. Kontrolle n = 13; rhEPO n = 10; cEPO-Fc n = 11.

3.3 Histopathologie

3.3.1 Allgemeine Histopathologie

3.3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Daten, die mittels HE-Nekrose-Score in der Auswertung der HE-Färbung generiert worden waren, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der Kontrollgruppe, der rhEPO Gruppe und der cEPO-Fc Gruppe nach 6 und 24 Stunden RPFZ. Nach einer RPFZ von 96 Stunden zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede im HE-Nekrose-Score der Kontrollgruppe gegenüber der rhEPO- und cEPO-Fc Gruppe. Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen nach 96h RPFZ signifikant mehr Nekrose im Rückenmarksgewebe auf als Tiere der rhEPO- und cEPO-Fc Gruppen (Abb. 11).



Abb. 11: HE-Score; Kontrolle vs. rhEPO vs. cEPO-Fc nach 6, 24 und 96 Stunden Reperfusion. HE-Nekrose-Score von Tieren der Studiengruppen rhEPO, cEPO-Fc und Kontrolle im Vergleich nach 6, 24 und 96 Stunden RPFZ. Dargestellt in Median und Range. Nach 6 und 24 Stunden RPFZ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Level der Nekrose zwischen den Studiengruppen. Nach 96 Stunden Reperfusion zeigten sich signifikant mehr Nekrosen im Rückenmark der Tiere in der Kontrollgruppe gegenüber den Tieren in den Gruppen rhEPO und cEPO-Fc. *p < 0,05 rhEPO vs. cEPO-Fc vs. Kontrolle. § = Innerhalb der Kontrollgruppe zeigten sich nach 96h RPFZ signifikant höhere Nekroselevel als nach 6h und 24h RPFZ. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5; 96h Kontrolle n = 13; 96h rhEPO n = 10; 96h cEPO-Fc n = 11.

Weiterhin zeigten sich innerhalb der Kontrollgruppe signifikant niedrigere Nekroselevel nach 6 und 24 Stunden RPFZ gegenüber 96 Stunden RPFZ. Zu allen Messzeitpunkten (6h, 24h und 96h) zeigten sich in den rhEPO- und cEPO-Fc Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Nekrosenausprägung (Abb. 11).

3.3.1.2 Luxol-Fast-Blue-Färbung

In Analogie zum HE-Nekrose-Score zeigte die Evaluation der Luxol-Fast-Blue-Färbung keine signifikanten Unterschiede in der Neuronendichte zwischen den Studiengruppen nach 6 und 24 Stunden RPFZ. Nach 96 Stunden RPFZ zeigte sich jedoch eine signifikante Abnahme der Neuronendichte in den Vorderhörnern des Rückenmarks in der Kontrollgruppe (Abb. 12).



Abb. 12: LFB-Färbung; Kontrolle vs. rhEPO vs. cEPO-Fc nach 6, 24 und 96 Stunden Reperfusion. Neurone/Fläche der Vorderhörner von Tieren der Studiengruppen rhEPO, cEPO-Fc und Kontrolle im Vergleich nach 6, 24 und 96 Stunden RPFZ. Dargestellt in Median und Range. Nach 6 und 24 Stunden RPFZ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Neuronendichte zwischen den Studiengruppen. Nach 96 Stunden RPFZ zeigte sich eine signifikant geringere Neuronendichte im Rückenmark der Tiere in der Kontrollgruppe gegenüber den Tieren in den Gruppen rhEPO und cEPO-Fc. * p < 0,05 rhEPO vs. cEPO-Fc vs. Kontrolle. # = Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich eine Abnahme der Neuronendichte von 6 über 24 zu 96 Stunden RPFZ. Zwischen 6 und 96 Stunden RPFZ ist dieser Unterschied signifikant. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5; 96h Kontrolle n = 13; 96h rhEPO n = 10; 96h cEPO-Fc n = 11.

Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich eine Abnahme der Neuronendichte von 6 über 24 zu 96 Stunden RPFZ. Zwischen 6 und 96 Stunden RPFZ ist dieser Unterschied signifikant. In den Gruppen rhEPO und cEPO-Fc zeigt sich diese signifikante Abnahme der Neuronendichte von 6 zu 96 Stunden RPFZ nicht (Abb. 12).

3.3.2 Immunhistochemie

3.3.2.1 Caspase 12

Die Evaluation der Immunhistochemie für Caspase 12 zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Expression im Gewebe zwischen den Studiengruppen nach 6 und 96 Stunden RPFZ. Nach 24 Stunden RPFZ zeigte sich jedoch eine signifikant geringere Expression von Caspase 12 in der cEPO-Fc Gruppe gegenüber den Gruppen Kontrolle und rhEPO (Abb. 13).



Abb. 13: IHC Caspase 12; Kontrolle vs. rhEPO vs. cEPO-Fc nach 6, 24 und 96 Stunden Reperfusion. Immunhistochemie der Caspase 12 von rhEPO, cEPO-Fc und Kontrolle in Median und Range nach 6, 24 und 96 Stunden RPFZ. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression im Gewebe zwischen den Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc nach 6 und 96 Stunden RPFZ. Nach 24 Stunden RPFZ zeigte sich jedoch eine signifikant geringere Expression von Caspase 12 in der cEPO-Fc Gruppe gegenüber den Gruppen Kontrolle und rhEPO. * p < 0,05 24h cEPO-Fc vs. Kontrolle und rhEPO. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5; 96h Kontrolle n = 13; 96h rhEPO n = 10; 96h cEPO-Fc n = 11.

Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich ein Anstieg der Expression von Caspase 12 im Rückenmarksgewebe von 6 über 24 zu 96 Stunden RPFZ. Die Expression der Caspase 12 liegt nach 24 und 96 Stunden RPFZ signifikant höher als nach 6 Stunden RPFZ. Vor allem von 6 zu 24 Stunden RPFZ findet ein starker Anstieg der Expression in der Kontrollgruppe statt. Die Expression der Caspase 12 innerhalb der Kontrollgruppe von 24 und 96 Stunden RPFZ zeigt keine signifikanten Unterschiede. Innerhalb der rhEPO und cEPO-Fc Gruppe lässt sich kein signifikanter Anstieg der Proteinexpression nachweisen (Abb. 14).



Abb. 14: IHC Caspase 12; 6 vs. 24 vs. 96 Stunden Reperfusion innerhalb der Studiengruppen. Immunohistochemie der Caspase 12 nach 6, 24, und 96h RPFZ innerhalb der Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc. Dargestellt in Median und Range. Die Expression von Capsase12 innerhalb der Kontrollgruppe liegt nach 6 Stunden RPFZ signifikant unter der Expression nach 24 und 96 Stunden RPFZ. Innerhalb der Gruppen rhEPO und cEPO-Fc zeigte sich dieser signifikante Unterschied nicht. * p < 0,056 Stunden RPFZ in der Kontrollgruppe vs. 24 vs. 96 Stunden RPFZ in der Kontrollgruppe. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5; 96h Kontrolle n = 13; 96h rhEPO n = 10; 96h cEPO-Fc n = 11.

3.3.2.2 78-kDa glucose-regulated protein

Nach 6, 24 und 96 Stunden RPFZ war in der Immunhistochemie in allen drei Studiengruppen GRP 78 nachweisbar. Der Median der Kontrollgruppe lag dabei nur zum Messzeitpunkt 6 Stunden niedriger als in den Gruppen rhEPO und cEPO-Fc. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. (Abb. 15).



Abb. 15: IHC GRP 78; Kontrolle vs. rhEPO vs. cEPO-Fc nach 6, 24 und 96 Stunden Reperfusion. Immunhistochemie von GRP 78 von rhEPO, cEPO-Fc und Kontrolle in Median und Range nach 6, 24 und 96 Stunden RPFZ. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von GRP 78 im Gewebe zwischen den Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc nach 6, 24 und 96 Stunden RPFZ. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5; 96h Kontrolle n = 13; 96h rhEPO n = 10; 96h cEPO-Fc n = 11.

Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich ein Anstieg der GRP 78 Expression nach 24 Stunden RPFZ gegenüber 6 Stunden RPFZ. Nach 96 Stunden RPFZ war die Expression von GRP 78 wieder verringert. Diese Dynamik über die Zeit wies jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Eine vergleichbare Dynamik zeigte sich innerhalb der rhEPO Gruppe. Auch hier lag der Median der GRP 78 Expression nach 24 Stunden Reperfusion über dem nach 6 und 96 Stunden RPFZ. Auch in der rhEPO Gruppe wies diese Dynamik keine signifikanten Unterschiede auf. In der cEPO-Fc Gruppe blieben die Mediane der Expression von GRP 78 nach 6, 24 und 96 Stunden konstant (Abb. 16).



Abb. 16: IHC GRP 78; 6 vs. 24 vs. 96 Stunden Reperfusion innerhalb der Studiengruppen. Immunhistochemie von GRP 78 nach 6, 24, und 96 Stunden RPFZ innerhalb der Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc. Dargestellt in Median und Range. In keiner der Studiengruppen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression von GRP 78 im Gewebe zwischen 6, 24 und 96 Stunden RPFZ. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5; 96h Kontrolle n = 13; 96h rhEPO n = 10; 96h cEPO-Fc n = 11.

3.3.2.3 Activating transcription factor 6

In der Immunhistochemie zur Detektion der Expression von ATF 6 ließ sich nach 6 Stunden RPFZ in allen drei Studiengruppen ATF 6 nachweisen. Die Mediane lagen dabei auf ähnlich hohem Level und zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch nach 24 Stunden RPFZ ließ sich in allen drei Studiengruppen eine Expression von ATF 6 ohne signifikante Unterschiede nachweisen. Nach 96 Stunden RPFZ war ATF 6 ebenfalls in allen drei Studiengruppen nachweisbar. Der Median in der Kontrollgruppe lag dabei niedriger als in den Gruppen rhEPO und cEPO-Fc, ohne sich dabei durch größere Streuung der Werte signifikant zu unterscheiden (Abb. 17).



Abb. 17: IHC ATF 6; Kontrolle vs. rhEPO vs. cEPO-Fc nach 6, 24 und 96 Stunden Reperfusion. Immunhistochemie für ATF 6 von rhEPO, cEPO-Fc und Kontrolle in Median und Range nach 6, 24 und 96 Stunden RPFZ. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von ATF 6 im Gewebe zwischen den Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc nach 6, 24 und 96 Stunden RPFZ. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 10; 96h cEPO-Fc n = 11.

Innerhalb der Kontrollgruppe, der rhEPO Gruppe und der cEPO-Fc Gruppe war die Expression von ATF 6 nach 6, 24 und 96 Stunden RPFZ immunhistochemisch nachweisbar. Es ließen sich innerhalb der Studiengruppen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen 6, 24 und 96 Stunden RPFZ nachweisen (Abb. 18).



Abb. 18: IHC ATF 6; 6 vs. 24 vs. 96 Stunden Reperfusion innerhalb der Studiengruppen. Immunhistochemie für ATF 6 nach 6, 24, und 96 Stunden RPFZ innerhalb der Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc. Dargestellt in Median und Range. In keiner der Studiengruppen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression von ATF 6 im Gewebe zwischen 6, 24 und 96 Stunden RPFZ. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5; 96h Kontrolle n = 13; 96h rhEPO n = 10; 96h cEPO-Fc n = 11.

3.4 Molekularbiologie

3.4.1 qRT-PCR

3.4.1.1 activating transcription factor 6

In der qRT-PCR ließ sich nach 6 und 24 Stunden RPFZ die Expression von *atf 6* im Rückenmarksgewebe nachweisen. Nach 24 Stunden RPFZ lagen die Mediane der rhEPO Gruppe höher als in den Gruppen Kontrolle und cEPO-Fc (Abb. 19).



Abb. 19: qRT-PCR atf 6; Kontrolle vs. rhEPO vs. cEPO-Fc nach 6 und 24 Stunden Reperfusion. qRT-PCR für atf 6 der Gruppen rhEPO, cEPO-Fc und Kontrolle in Median und Range nach 6 und 24 Stunden RPFZ. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von atf 6 im Gewebe zwischen den Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc nach 6 und 24 Stunden RPFZ. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5.

Innerhalb der Studiengruppen ließen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von *atf 6* zwischen 6 und 24 Stunden RPFZ nachweisen (Abb. 20).



Abb. 20: qRT-PCR atf 6; 6 vs. 24 Stunden Reperfusion innerhalb der Studiengruppen. qRT-PCR für atf 6 nach 6 und 24 Stunden RPFZ innerhalb der Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc. Dargestellt in Median und Range. In keiner der Studiengruppen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression von atf 6 im Gewebe zwischen 6 und 24 Stunden RPFZ. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5.

3.4.1.2 inositol requiring enzyme 1α

Die Expression von *ire 1a* ließ sich in der qRT-PCR nach 6 und 24 Stunden RPFZ im Rückenmark nachweisen. Die Mediane von Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc lagen nach 6 Stunden RPFZ auf ähnlichem Niveau. Nach 24 Stunden RPFZ lagen die Mediane der cEPO-Fc Gruppe höher als in den Gruppen Kontrolle und rhEPO. Dabei unterschieden sich die Werte der Gruppen rhEPO und cEPO-Fc signifikant (Abb. 21).



Abb. 21: qRT-PCR ire 1a; Kontrolle vs. rhEPO vs. cEPO-Fc nach 6 und 24 Stunden Reperfusion. qRT-PCR für ire 1a der Gruppen rhEPO, cEPO-Fc und Kontrolle in Median und Range nach 6 und 24 Stunden RPFZ. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von ire 1a im Gewebe zwischen den Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc nach 6 Stunden RPFZ. Nach 24 Stunden RPFZ zeigten die Tiere der cEPO-Fc Gruppe in der qRT-PCR signifikant höhere Werte als die Tiere der rhEPO Gruppe. * p < 0,05 24 Stunden cEPO-Fc vs. rhEPO. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5.
Innerhalb der Studiengruppen Kontrolle und rhEPO ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Expression von *ire 1* α nach 6 und 24 Stunden RPFZ nachweisen. Innerhalb der cEPO-Fc Gruppe zeigte sich nach 24 Stunden RPFZ eine signifikant höhere Expression von *ire 1* α gegenüber 6 Stunden RPFZ (Abb. 22).



Abb. 22: qRT-PCR ire 1a; 6 vs. 24 Stunden Reperfusion innerhalb der Studiengruppen. qRT-PCR für ire 1a nach 6 und 24 Stunden RPFZ innerhalb der Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc. Dargestellt in Median und Range. In den Studiengruppen Kontrolle und rhEPO zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von ire 1a im Gewebe zwischen 6 und 24 Stunden RPFZ. Innerhalb der cEPO-Fc Gruppe zeigte sich nach 24 Stunden RPFZ eine signifikant höhere Expression von ire 1a gegenüber 6 Stunden RPFZ. * p < 0.05 cEPO-Fc 6 vs. 24 Stunden. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5.

3.4.1.3 protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase

Nach 6 Stunden RPFZ ließ sich in allen drei Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc eine Expression von *perk* nachweisen. Die Mediane erschienen dabei auf ähnlichem Niveau ohne signifikante Unterschiede. Nach 24 Stunden zeigte sich in der cEPO-Fc Gruppe eine signifikant höhere Expression von *perk* gegenüber den Gruppen Kontrolle und rhEPO. Die Mediane dieser Gruppen lagen auf ähnlichem Niveau ohne signifikante Unterschiede (Abb. 23).



Abb. 23: qRT-PCR perk; Kontrolle vs. rhEPO vs. cEPO-Fc nach 6 und 24 Stunden Reperfusion. qRT-PCR für perk in den Gruppen rhEPO, cEPO-Fc und Kontrolle in Median und Range nach 6 und 24 Stunden RPFZ. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von perk im Gewebe zwischen den Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc nach 6 Stunden RPFZ. Nach 24 Stunden RPFZ lag der Median der cEPO-Fc Gruppe höher als in den Gruppen Kontrolle und rhEPO. Dabei unterschieden sich die Gruppen Kontrolle und rhEPO signifikant von der Gruppe cEPO-Fc. * p < 0,05 24h Kontrolle und rhEPO vs. cEPO-Fc. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5.

Innerhalb der Studiengruppen Kontrolle und rhEPO erschien die Expression von perk nach 6 und 24 Stunden RPFZ konstant und ohne signifikante Unterschiede. Innerhalb der cEPO-Fc Gruppe zeigte sich nach 24 Stunden RPFZ eine signifikant höhere Expression von *perk* gegenüber 6 Stunden RPFZ (Abb. 24).



Abb. 24: qRT-PCR perk; 6 vs. 24 Stunden Reperfusion innerhalb der Studiengruppen. qRT-PCR für perk nach 6 und 24 Stunden RPFZ innerhalb der Studiengruppen Kontrolle, rhEPO und cEPO-Fc. Dargestellt in Median und Range. In den Studiengruppen Kontrolle und rhEPO zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von perk im Gewebe zwischen 6 und 24 Stunden RPFZ. Innerhalb der cEPO-Fc Gruppe zeigte sich nach 24 Stunden RPFZ eine signifikant höhere Expression von perk gegenüber 6 Stunden RPFZ. * p < 0,05 cEPO-Fc 6 vs. 24 Stunden. 6h Kontrolle n = 5; 6h rhEPO n = 5; 6h cEPO-Fc n = 6; 24h Kontrolle n = 5; 24h rhEPO n = 5; 24h cEPO-Fc n = 5.

4 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die klinischen und molekularen Effekte von rhEPO und cEPO-Fc auf Ischämie- und Reperfusionsschäden des Rückenmarks im Mausmodell zu untersuchen. Die wesentlichen Erkenntnisse sind die folgenden: (1) rhEPO und cEPO-Fc verbessern das klinisch-neurologische *Outcome* von Mäusen nach einer spinalen Ischämie- und Reperfusionssequenz, (2) das histologische *Outcome*, gemessen im HE-Nekrose-Score und in der Luxol-Fast-Blue-Färbung, zeigte sich nach 96 Stunden RPFZ signifikant verbessert in den rhEPO und cEPO-Fc Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe, (3) das ER spezifische proapoptotische Molekül Caspase 12 zeigte in der IHC einen signifikanten Anstieg von 6 zu 24 Stunden RPFZ in der Kontrollgruppe, (4) innerhalb der Kontrollgruppe ging der signifikante Anstieg der Caspase 12 in der IHC von 6 zu 24 Stunden RPFZ der Ausbildung von Nekrosen (HE) und dem Verlust von Neuronen (LFB) nach 96 Stunden RPFZ voraus, (5) die Immunhistochemie zeigte keine klaren Effekte von rhEPO und cEPO-Fc auf die ER Proteine GRP 78 und ATF 6 und (6) die qRT-PCR zeigte keine klaren Effekte von rhEPO und cEPO-Fc auf die Genexpression von *atf 6, ire 1α* und *perk*.

4.1 Etablierung eines Mausmodells

In der Vergangenheit konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass rhEPO einen positiven Effekt auf Ischämie- und Reperfusionsschäden des Rückenmarks in Schweinen und Kaninchen haben kann [99, 146]. Um Antworten auf die Frage zu finden, welche molekularen Prozesse bei der Vermittlung dieser Effekte eine Rolle spielen und ob das ER und die UPR in diese involviert sind, wurde ein Aortencrossclamping-Mausmodell etabliert.

Eine entscheidende Säule in einem Modell zur Untersuchung von Ischämie- und Reperfusionsschäden ist die Ischämiezeit. Im Jahr 2011 postulierten Smith et al. ein verbessertes neurologisches *Outcome* von Mäusen nach spinaler Ischämie und pharmakologischer Präkonditionierung mittels rhEPO bei einer gewählten Ischämiezeit von 5 min. [101]. Um suffizient spinale Schädigungen in den Mäusen auszulösen, ist eine ausreichende Ischämiezeit notwendig. Deshalb wurden Voruntersuchungen zu diesem Thema durchgeführt. In diesen Versuchen wurden Ischämiezeiten von 5, 6, 7 und 8 min.

getestet. Während nach 5 min. alle Tiere einen hohen BMS aufwiesen, waren nach 8 min. alle Tiere in unseren Versuchen paraplegisch. Nach 7 min. Ischämiezeit erlitten die Tiere ebenfalls eine Paraplegie, einige der Tiere waren jedoch dazu in der Lage, ihre Hinterläufe weiter zu bewegen. Eine Ischämiezeit von 7 min. wurde gewählt, da nach einer Ischämiezeit von 8 min. die spinale Schädigung so massiv zu sein scheint, dass die pharmakologische Konditionierung mittels rhEPO oder cEPO-Fc keinen Effekt mehr gehabt hätte. Um die gesamte Bandbreite der möglichen klinisch-neurologischen Outcomes abzudecken, bedarf es einer Schädigung im Grenzbereich von Apoptose zu Nekrose. Da die zu untersuchenden Studienmedikamente antiapoptotisch wirken sollen, hier größte statistische Gruppenunterschied wäre der zu finden. Neben der *Clampingzeit* wird in der Literatur auch von verschiedenen Lokalisationen berichtet, an welchen die Aorta und ihre Abgänge abgeklemmt werden sollten, um eine spinale Ischämie zu induzieren. Im Jahr 2000 klemmte die Arbeitsgruppe um Lang-Lazdunski die linke Arteria mammaria interna, den Aortenbogen zwischen der Arteria carotis sinistra und Arteria subclavia sinistra sowie die Arteria subclavia sinistra ab [148]. Durch dieses Vorgehen wurde eine Versorgung des Rückenmarks über Umgehungskreisläufe über die linke Arteria mammaria interna oder die Arteria subclavia sinistra vermieden. Awad et al. berichteten im Jahr 2010, dass bereits durch ein alleiniges Abklemmen der thorakalen Aorta distal der Arteria subclavia sinistra spinale Ischämieund Reperfusionsschäden in Mäusen ausgelöst werden könnten [149]. Smith et al. klemmten 2011 in Ihrem Mausmodell ebenfalls die thorakale Aorta descendens distal der Arteria subclavia sinistra und zusätzlich die Arteria subclavia sinistra zur Vermeidung von Umgehungskreisläufen ab [150]. Die Daten dieser Promotionsschrift zeigen, dass durch das 7 minütige Abklemmen der thorakalen Aorta distal der Arteria subclavia sinistra und der Arteria subclavia sinistra selbst in Mäusen spinale Ischämie- und Reperfusionsschäden ausgelöst werden können. Zudem konnten unsere Vorversuche zeigen, dass ein zusätzliches Abklemmen der linken Arteria mammaria interna zur Induzierung von spinalen Schäden in Mäusen nicht notwendig erscheint.

4.2 Einflüsse von rhEPO und cEPO-Fc auf das neurologische Outcome

In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die präoperative, pharmakologische Konditionierung von Mäusen mit rhEPO und cEPO-Fc zu einem signifikant verbesserten klinisch-neurologischen Outcome nach spinaler Ischämie führt. Mit Hilfe des BMS konnte der Einfluss der durchgeführten Prozedur auf die Motorik der Hinterläufe und die Rumpfstabilität der Tiere gemessen und beschrieben werden. Die Evaluation des klinisch-neurologischen Outcomes mittels BMS ist als valide Methode anerkannt, um Schädigungen durch spinale Ischämien zu erkennen und den Funktionsverlust von Motorneuronen zu klassifizieren [97]. So konnte gezeigt werden, dass das klinisch-neurologische Outcome der Mäuse nach 7 min. spinaler Ischämie und 96 Stunden Gesamtreperfusionszeit durch die präoperative Gabe von rhEPO und cEPO-Fc signifikant verbessert wurde. In die den Gruppen, über einen Gesamtreperfusionszeitraum von 6 und 24 Stunden nachbeobachtet worden waren, konnten keine signifikanten Unterschiede im neurologischen Outcome nachgewiesen werden. Hierfür ergeben sich die folgenden Erklärungsmöglichkeiten. Tiere, die über einen Gesamtreperfusionszeitraum von 6 Stunden nachbeobachtet worden waren, wurden vor der Tötung einmalig neurologisch mittels BMS evaluiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Auswirkungen der Narkose auf die Tiere noch nicht vollständig abgeklungen und der BMS somit nicht sicher anwendbar, da dieser vollständig wache Tiere erfordert. Die Gruppen, die über 24 Stunden Gesamtreperfusionszeit nachbeobachtet worden waren, hatten eine geringere Gruppenstärke als die Gruppen, die über 96 Stunden Gesamtreperfusionszeit nachbeobachtet worden waren. Dies könnte für die ausbleibende Signifikanz zwischen den Studiengruppen gesorgt haben.

Die aktuellen Erkenntnisse stimmen mit denen aus früheren Studien der Arbeitsgruppe überein, welche zeigten, dass rhEPO dazu in der Lage ist, das Rückenmark von Kaninchen vor Schädigungen durch Ischämie und 96 Stunden Reperfusion zu schützen [99]. In der Vergangenheit beschrieben auch weitere Gruppen positive Effekte von rhEPO und seinen carbamylierten Derivaten auf das Rückenmark nach spinalen Ischämie- und Reperfusionssequenzen in Kleintiermodellen [95, 101, 102, 153]. In dem aktuellen Projekt konnte durch *Crossclamping* der thorakalen Aorta und der Arteria subclavia sinistra eine spinale Ischämie in Mäusen induziert werden. Zudem konnten die vorbekannten protektiven Effekte von rhEPO und cEPO-Fc reproduziert werden. Es lässt sich sagen, dass es gelungen ist, die bisher durch die Arbeitsgruppe etablierten Tiermodelle anderer Spezies erfolgreich in ein Mausmodell zu transferieren, um die molekularen Vorgänge im Rahmen von spinalen Ischämien sowie deren Prävention und Therapie zu untersuchen.

4.3 Einflüsse von rhEPO und cEPO-Fc auf die Histopathologie

Nachdem in dem neu etablierten Mausmodell gezeigt werden konnte, dass rhEPO und cEPO-Fc sich positiv auf das klinisch-neurologische Outcome der Tiere auswirkten, wurde untersucht, inwiefern diese signifikant positiven Effekte messbare Korrelate in der Histopathologie aufwiesen. Die Daten, die mittels dem HE-Nekrose-Score und der Zählung von Neuronen/Fläche in der Luxol-Fast-Blue-Färbung generiert wurden, zeigten, dass innerhalb der Kontrollgruppe ein Verlust von Motorneuronen und die Ausbildung von spinalen Nekrosen zwischen 24 und 96 Stunden RPFZ auftritt. Diese Erkenntnisse können wie folgend erklärt werden: Die Schädigungen im Rahmen einer Verletzung des Rückenmarks werden, wie von Tator et al. in 1991 in einem Review zusammengefasst, in primäre und sekundäre Schäden unterteilt [154]. Während primäre Schäden meist durch direkte Traumata entstehen, sind sekundäre Schäden nicht selten Ausdruck einer Ischämie- und Reperfusionssequenz. Die Erkenntnisse dieser Promotionsschrift stimmen hierbei mit der Literatur überein. Sakurai et al. beschrieben, dass nach zwei Tagen RPFZ nach spinalen Ischämien in Kaninchen beinahe alle Motorneurone intakt blieben, während nach 7 Tagen Reperfusionszeitraum 70 % der Motorneurone zerstört waren [141]. Weiterhin postulierten Hirano et al. im Jahre 2012, dass die Anzahl der Motorneurone nach spinaler Schädigung von Tag 2 zu Tag 7 abnimmt [102]. Darüber hinaus zeigten spinale MRTs mit Gadolinium Kontrast in Menschen nach spinalen IRS erst nach mehr als 24 Stunden RPFZ eine Anreicherung von Kontrastmittel als Korrelat für Ödeme [155]. Das in der Literatur beschriebene verzögerte Auftreten der Rückenmarksschädigung nach einer spinalen IRS wird unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies, Schädigungen an Proteinen und DNA [156], Aktivierung von Mikroglia, Astrozyten und proinflammatorischen Mediatoren vermittelt [157]. All diese Prozesse brauchen Zeit, um sich zu entwickeln. So ist es nicht überraschend, dass der Verlust der Motorneurone und die Nekroserate im Gewebe nach 96 Stunden RPFZ signifikant höher liegt als nach 24 Stunden RPFZ. Dies erklärt auch, dass neurologische Ausfälle früher klinisch manifest werden, da die neuronale Funktion bereits eingestellt ist, das histologische Korrelat aber noch Stunden bis Tage benötigt, um nachgewiesen werden zu können.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das histologische *Outcome*, evaluiert durch den HE-Nekrose-Score, in den Tieren, die mit rhEPO und cEPO-Fc präkonditioniert worden waren, nach 96 Stunden RPFZ signifikant besser war als bei Tieren der Kontrollgruppe. Diese Zusammenhänge wurden in der Vergangenheit ebenfalls durch andere Arbeitsgruppen beschrieben [95, 101, 102]. Daraus lässt sich ableiten, dass die subzellulären Mechanismen, die zur Ausbildung der sekundären Schädigung des Rückenmarkes führen, durch die präoperative Konditionierung mit rhEPO und cEPO-Fc supprimiert wurden. Die Histopathologie zeigte zudem, dass die Nekrose des Rückenmarksgewebes in der grauen Substanz um den Zentralkanal herum beginnt und sich mit zunehmender Schwere von dort aus in Richtung der Vorderhörner ausbreitet. Die Hinterhörner erschienen zuletzt betroffen zu sein. Ähnliche Dynamiken wurden im Jahr 2010 von Awad et al. beschrieben, die eine dreidimensionale Analyse der Läsionen im Mäuserückenmark nach 7,5-minütiger Ischämie und einer RPFZ von 7 Tagen durchführten [149].

4.4 Einflüsse von rhEPO und cEPO-Fc auf das ER

4.4.1 Expression von Caspase 12 nach spinaler Ischämie

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit das ER in die Prozesse involviert ist, welche im Rahmen einer Ischämie- und Reperfusionssequenz des Rückenmarks ablaufen. In der aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression des ER spezifischen proapoptotischen Moleküls Caspase 12 in der Kontrollgruppe von 6 zu 24 Stunden RPFZ signifikant anstieg. An dieser Stelle stehen die aktuellen Erkenntnisse zum Teil konträr mit bisher in der Literatur beschrieben Zusammenhängen. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Caspase 12 nach 8 Stunden RPFZ in hohen Konzentrationen nachweisbar ist und nach einem Tag RPFZ in ihrer Expression abnimmt [139, 141]. Es muss jedoch gesagt werden, dass die oben beschriebenen Ergebnisse in Kaninchen generiert wurden und dass

sich auch die chirurgischen Prozeduren und Ischämiezeiten von dem Versuchsaufbau der aktuellen Studie unterschieden. So führten Mizukami et al. ein *Clamping* der abdominellen Aorta von Kaninchen für 15 min. durch [139] und Sakurai et al. verschlossen die abdominelle Aorta von Kaninchen mittels eines Ballonkatheters für ebenfalls 15 min.[141]. Diese Unterschiede im Studiendesign müssen beim Vergleich der Arbeiten berücksichtigt werden. Darüber hinaus unterscheiden sich die aktuellen Methoden der Datengenerierung aus histologischen Präparaten, wie unter Abschnitt 4.4.2 beschrieben, von den Methoden, die in der Vergangenheit von anderen Arbeitsgruppen angewendet worden waren. Durch die in diesem Experiment verwendete softwaregestützte Bildanalyse lassen sich in den Präparaten Unterschiede genauer erkennen und statistisch untersuchen. Die Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Präparate ist so differenzierter als bei den bisher durchgeführten Studien der anderen Arbeitsgruppen.

Zudem konnten Liu et al. im Jahr 2015 zeigen, dass die zellulären Level von Caspase 12 nach Hypoxie nach 8 und 24 Stunden signifikant erhöht sind [158]. Alles in allem zeigen die Ergebnisse der aktuellen Studie und die bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur, dass die Expression von Caspase 12 im Gewebe von Kleintieren nach spinalen Ischämien und Reperfusionszeiten um den Zeitpunkt 24 Stunden am stärksten erhöht ist. In Kontrast zu den aktuellen Beobachtungen in den Kontrollgruppen blieb der signifikante Anstieg der Caspase 12 zwischen 6 und 24 Stunden RPFZ in den Studiengruppen rhEPO und cEPO-Fc aus. Daraus lässt sich ableiten, dass die fehlende präoperative Konditionierung der Mäuse mit rhEPO und cEPO-Fc vor der Induzierung einer spinalen Ischämie mit einem stärkeren Anstieg der Expression von Caspase 12 assoziiert ist. Diese Ergebnisse passen zu den aktuell gewonnenen Erkenntnissen aus der Histopathologie. Der signifikante Anstieg der ER spezifischen Caspase 12 im Gewebe der Tiere aus der Kontrollgruppe geht dem Verlust von Motorneuronen und der Ausbildung von Nekrosen im Rückenmarksgewebe zeitlich voraus.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten in Ihren Studien zeigen, dass die Expression der Caspase 12 mit dem Ausmaß der Schäden des Rückenmarks nach einer ischämischen Schädigung korreliert [141], dass eine Inhibition der Caspase 12 das Rückenmark in solchen Situationen schützen kann [159] und die neurologische Rekonvaleszenzzeit verkürzt werden kann [160]. Die verminderte Expression von Caspase 12 wurde zudem

begleitet von einer hohen Anzahl an intakten Neuronen und einer geringeren Ausprägung an spinalen Nekrosen sowie einem besseren klinischen und neurologischen *Outcome*. Dies unterstreicht, dass die Caspase 12 als proapoptotisches Molekül an der Vermittlung der spinalen Schädigungen, die durch eine IRS ausgelöst werden, beteiligt ist. Da die Caspase 12 ein ER spezifisches Molekül ist und nur durch ER vermittelte Apoptosereize aktiviert werden kann [105], lässt sich aus unseren Erkenntnissen eine Beteiligung des ER bei der Vermittlung von Ischämie- und Reperfusionsschäden des Rückenmarkes ableiten.

4.4.2 Immunhistochemischer Nachweis von GRP 78 und ATF 6

Obwohl GRP 78 als Schlüsselprotein der UPR in allen Studiengruppen zu allen Reperfusionszeiträumen in der Immunhistochemie detektierbar war, konnten keine signifikanten Dynamiken in den Kontrollgruppen oder Effekte von rhEPO und cEPO-Fc auf die Expression von GRP 78 aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse waren überraschend, da GRP 78, als einer der Hauptakteure in der UPR, von uns als Bindeglied zwischen ERS und den proapoptotischen Effekten der Caspase 12 vermutet wurde. Die UPR wird, wie oben beschrieben, durch ERS induziert und die Effektorproteine PERK, IRE 1a und ATF 6 werden durch Dissoziation von GRP 78 aktiviert und die UPR ausgeführt [117]. Ein hohes Aufkommen von GRP 78 in der Zelle korreliert mit einer gesteigerten Toleranz der Zelle gegenüber Stressoren [161]. In der Literatur ist zudem beschrieben, dass die Caspase 12 unter ERS aktiviert wird [105, 145]. So wurde eine Korrelation zwischen der Expression von GRP 78 und Caspase 12, wie in der Vergangenheit bereits von Mizukami et al. beschrieben, vermutet [139]. Die unterschiedlichen Erkenntnisse, die sich aus der aktuellen Studie und der Studie von Mizukami et al. ergeben, könnten ihren Ursprung in der unterschiedlichen Technik der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen haben. Während Mizukami et al. die relative Dichte der Immunoreaktivität beschrieben, erfolgte in den aktuellen Experimenten eine automatisierte und softwareunterstützte (Fiji-Software) absolute Zählung der immunoreaktiven Zellen pro Fläche der "Region of Interest", um einen validen Zahlenwert für die Durchführung der Statistik zu generieren. Ziel war es, die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen soweit wie möglich zu automatisieren und damit zu objektivieren.

Auch in der Expression von ATF 6 ließ sich in den immunhistochemischen Färbungen kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die mit rhEPO oder cEPO-Fc konditioniert worden waren, gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe nachweisen. Da dem Protein ATF 6 im Rahmen der UPR eine antiapoptotische Rolle und im Gegensatz zu den Effektoren IRE 1 α und PERK keine proapoptotischen Eigenschaften zugeschrieben werden [109], wurden erhöhte Expressionslevel in den rhEPO und/oder cEPO-Fc Gruppen erwartet, da diese signifikant weniger spinale Schäden aufwiesen.

Somit gelang es nicht, in der Immunhistochemie von GRP 78 und ATF 6 signifikante Unterschiede durch die Präkonditionierung mittels rhEPO und cEPO-Fc nachzuweisen. Auch innerhalb der Studiengruppen waren über die steigende RPFZ hinweg keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

In dem aktuellen Experiment gelang es nicht, eine immunhistochemische Untersuchung für die Proteine IRE 1 α und PERK zu etablieren. So konnten die Effektorproteine der UPR nur unvollständig untersucht werden. Deshalb erfolgte die weitere molekularbiologische Untersuchung dieser Proteine mittels qRT-PCR.

4.4.3 Expression der Gene *atf* 6, *ire* 1α und *perk*

Um die UPR im Rahmen von spinalen IRS in Mäusen weiter zu untersuchen und etwaige Zusammenhänge zwischen dem ERS und der spinalen Schädigung aufzudecken, erfolgte die Untersuchung der Genexpression der drei Effektoren *atf* 6, *perk* und *ire*1 α via qRT-PCR. Nach 6 Stunden RPFZ ließen sich mittels qRT-PCR keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der drei Effektoren zwischen den Studiengruppen nachweisen. Nach 24 Stunden Reperfusionsphase zeigte sich in der cEPO-Fc Gruppe eine signifikant höhere Genexpression von *ire* 1 α und *perk*, gegenüber der rhEPO Gruppe und der Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich in der cEPO-Fc Gruppe eine signifikant geringere Proteinexpression von Caspase 12 im Gewebe immunhistochemisch nachweisen. Wie von Yoneda et al. im Jahr 2001 beschrieben, ist eine Funktion des Proteins IRE 1 α die Aktivierung von Caspase 12 [144]. Es wurde vermutet, dass eine vermehrte Genexpression von *ire* 1 α und somit ein erhöhtes Vorkommen des Proteins IRE 1 α mit einer ebenfalls erhöhten Expression der Caspase 12 im Gewebe einhergehen würde. Nach 24 Stunden RPFZ zeigte sich die Caspase 12 in der cEPO-Fc Gruppe gegenüber den anderen Studiengruppen jedoch signifikant verringert. Da auch dem Protein PERK hauptsächlich proapoptotische Effekte im Rahmen der UPR zugeschrieben werden, die es beispielsweise über die Aktivierung von CHOP vermittelt [109], wurde entgegen der aktuellen Erkenntnisse eine geringere Genexpression von *perk* in Tieren der Studiengrupen rhEPO und cEPO-Fc erwartet. Auch aus der molekularbiologischen Untersuchung der Genexpression von *atf* 6 ließen sich keine für uns wesentlichen Erkenntnisse gewinnen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass es nicht gelungen ist, Muster herauszuarbeiten, die helfen würden, die genauen Abläufe der UPR im Rahmen von ERS, induziert durch eine spinale IRS, in Mäusen genauer zu verstehen. Es ließen sich keine klaren Effekte auf die Genexpression *von atf 6, perk,* und *ire 1a* durch die präoperative Konditionierung der Tiere mit rhEPO oder cEPO-Fc aufzeigen. So konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den positiven Effekten von rhEPO und cEPO-Fc auf das neurologische und histologische *Outcome* der Mäuse und der Expression der Caspase 12 und den Effektorproteinen der UPR erkannt werden.

4.5 Limitationen unserer Studie

Die aktuelle Studie hat einige Limitationen, die in die Bewertung der Erkenntnisse miteinfließen sollten. Alle histologischen und immunhistochemischen Färbungen dieser Studie wurden einzeln und händisch durchgeführt. Trotz engster Bindung an die Versuchsprotokolle kommt es so zu kleinsten Differenzen in den Präparaten. Dies erschwert die Auswertung und muss in die Interpretation der Daten mit einfließen. Einheitlichere Färbungen könnten in Zukunft mittels Färbeautomaten angefertigt werden, um die Auswertung der Präparate noch genauer und fehlerfreier durchführen zu können. Obwohl durch ein einheitliches Scoring und die softwaregestützte Auswertung aller Färbungen möglichst viele Fehlerquellen ausgeschlossen werden sollten, ist mit einer geringen Ungenauigkeit in den Daten zu rechnen. Weiterhin ist festzuhalten, dass es nicht gelungen ist, für alle zunächst geplanten Proteine ein Protokoll für eine stabile immunhistochemische Färbung zu etablieren. Eine weitere Limitation der aktuellen Studie liegt darin, dass in dem Studiendesign keine Kontrollgruppe im Sinne von Tieren, welche keiner Operation unterliefen, vorgesehen war. Aus einer solchen Sham Gruppe hätten Basiswerte für die immunhistochemisch und molekularbiologisch evaluierten Proteine und Gene generiert werden können, um weitere statistische Vergleiche durchzuführen und etwaige weitere Fragestellungen beantworten zu können.

4.6 Schlussfolgerung

In dieser Studie ist es gelungen, ein Mausmodell für die Untersuchung von subzellulären Prozessen nach spinalen Ischämie- und Reperfusionssequenzen zu entwickeln, um den subzellulären Ursachen für die positiven Effekte von rhEPO und cEPO-Fc auf das klinische und histologische Outcome der Tiere auf den Grund zu gehen. Es konnte gezeigt werden, dass rhEPO und cEPO-Fc einen klar positiven Effekt auf das klinisch-neurologische Outcome von Mäusen nach einer spinalen IRS haben. Auch das histologische Outcome der Tiere konnte durch die präoperative Gabe von rhEPO und cEPO-Fc signifikant verbessert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression des ER spezifischen proapoptotischen Moleküls Caspase 12 im Rückenmarksgewebe mit der RPFZ innerhalb der Kontrollgruppe signifikant ansteigt. In der rhEPO und cEPO-Fc Gruppe zeigte sich jedoch kein signifikanter Anstieg von Caspase 12 bei verlängerter RPFZ. Der signifikante Anstieg von Caspase 12 im Rückenmarksgewebe der Tiere der Kontrollgruppe war positiv mit einem schlechteren klinischen, neurologischen und histopathologischen Outcome korreliert. Es kann abgeleitet werden, dass ohne pharmakologische Präkonditionierung mit rhEPO und cEPO-Fc und durch vermehrte Expression der ER spezifischen Caspase 12 in Mäusen ein höheres Maß an spinalen Schäden durch eine IRS zu rechnen ist. Zudem legen unsere Daten zur Expression der Caspase 12 nahe, dass das ER in die stattfindenden subzellulären Prozesse involviert ist. Es konnten jedoch keine klaren Erkenntnisse über eine Rolle der UPR mit den drei Effektoren ATF 6, IRE 1a und PERK in diesen Prozessen nachgewiesen werden. Auch die Untersuchung der Genexpression der Effektoren der UPR ergab kein klares Bild über die ablaufenden Prozesse im Rahmen der spinalen IRS in Mäusen und dessen Beeinflussung durch pharmakologische Präkonditionierung mittels rhEPO und cEPO-Fc.

Da sowohl die spinalen Ischämien als auch der ERS große Bedeutung in Klinik und Forschung haben, sollten diese Themen und ihre Zusammenhänge in weiteren Arbeiten untersucht werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Simon, F., Köpke, L.-G., Ibing, W., Schelzig, H., Effects of Preoperative Pharmacological Conditioning on the Clinical and Molecular Outcome of Mice after Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Sequence. European Journal of Vascular & Endovascular Surgery, 2018. 56(5): p. E15.
- 2. Köpke L.-G., S.F., *Immunhistochemische Färbungen Ein möglicher Lösungsweg.* Gefässchirurgie 2018, 2018. 23(4): p. 261-263.
- 3. Kirshblum, S.C., et al., *Spinal cord injury medicine*. 1. *Etiology, classification, and acute medical management*. Arch Phys Med Rehabil, 2002. 83(3 Suppl 1): p. S50-7, S90-8.
- 4. McDaid, D., et al., Understanding and modelling the economic impact of spinal cord injuries in the United Kingdom. Spinal Cord, 2019. 57(9): p. 778-788.
- 5. Hagan, P.G., et al., *The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease.* JAMA, 2000. 283(7): p. 897-903.
- 6. Johansson, G., U. Markstrom, and J. Swedenborg, *Ruptured thoracic aortic aneurysms: a study of incidence and mortality rates.* J Vasc Surg, 1995. 21(6): p. 985-8.
- 7. Bickerstaff, L.K., et al., *Thoracic aortic aneurysms: a population-based study.* Surgery, 1982. 92(6): p. 1103-8.
- 8. Saeyeldin, A.A., et al., *Thoracic aortic aneurysm: unlocking the "silent killer" secrets.* Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2017.
- 9. Goldfinger, J.Z., et al., *Thoracic aortic aneurysm and dissection*. J Am Coll Cardiol, 2014. 64(16): p. 1725-39.
- 10. Erbel, R., et al., 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J, 2014. 35(41): p. 2873-926.
- 11. Obeid, T., et al., Contemporary outcomes of open thoracoabdominal aneurysm repair: functional status is the strongest predictor of perioperative mortality. J Surg Res, 2016. 206(1): p. 9-15.
- Hiratzka, L.F., et al., 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with Thoracic Aortic Disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine. Circulation, 2010. 121(13): p. e266-369.

- 13. Czerny, M., et al., *Transposition of the supraaortic branches for extended endovascular arch repair.* Eur J Cardiothorac Surg, 2006. 29(5): p. 709-13.
- 14. T. A. Koeppel, A.G., M. J. Jacobs, *DGG-Leitlinie Thorakale und thorakoabdominelle Aortenaneurysmen.* Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin, 2010.
- 15. Mehta, R.H., et al., *Predicting death in patients with acute type a aortic dissection*. Circulation, 2002. 105(2): p. 200-6.
- 16. Ana Lopez-Marco PhD, B.A.M., Aung Ye Oo MD, *Thoracoabdominal aneurysmectomy: Operative steps for Crawford extent II repair.* JTVCS Techniques, 2020. 3: p. 25-36.
- 17. Santana, J.A. and K. Dalal, *Ventral Cord Syndrome*, in *StatPearls*. 2019: Treasure Island (FL).
- 18. Carrel, A., *VIII. On the Experimental Surgery of the Thoracic Aorta and Heart.* Ann Surg, 1910. 52(1): p. 83-95.
- 19. Matsumura, J.S., et al., International controlled clinical trial of thoracic endovascular aneurysm repair with the Zenith TX2 endovascular graft: 1-year results. J Vasc Surg, 2008. 47(2): p. 247-257; discussion 257.
- 20. Garland, H., J. Greenberg, and D.G. Harriman, *Infarction of the spinal cord.* Brain, 1966. 89(4): p. 645-62.
- 21. Nienaber, C.A., *Das akute Aortensyndrom.* Dtsch Med Wochenschr., 2016. 141: p. 752-756.
- 22. Debakey, M.E., et al., *Surgical Management of Dissecting Aneurysms of the Aorta*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1965. 49: p. 130-49.
- 23. Olsson, C., et al., Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14,000 cases from 1987 to 2002. Circulation, 2006. 114(24): p. 2611-8.
- 24. Howard, D.P., et al., *Population-based study of incidence and outcome of acute aortic dissection and premorbid risk factor control: 10-year results from the Oxford Vascular Study.* Circulation, 2013. 127(20): p. 2031-7.
- 25. Nienaber, C.A. and J.T. Powell, *Management of acute aortic syndromes*. Eur Heart J, 2012. 33(1): p. 26-35b.
- 26. Tsai, T.T., C.A. Nienaber, and K.A. Eagle, *Acute aortic syndromes.* Circulation, 2005. 112(24): p. 3802-13.
- 27. Klompas, M., *Does this patient have an acute thoracic aortic dissection?* JAMA, 2002. 287(17): p. 2262-72.
- 28. Fukui, T., *Management of acute aortic dissection and thoracic aortic rupture.* J Intensive Care, 2018. 6: p. 15.
- 29. Lansman, S.L., et al., *Acute type B aortic dissection: surgical therapy*. Ann Thorac Surg, 2002. 74(5): p. S1833-5; discussion S1857-63.

- 30. Fattori, R., et al., *Complicated acute type B dissection: is surgery still the best option?: a report from the International Registry of Acute Aortic Dissection.* JACC Cardiovasc Interv, 2008. 1(4): p. 395-402.
- 31. Kakinohana, M., *What should we do against delayed onset paraplegia following TEVAR?* J Anesth, 2014. 28(1): p. 1-3.
- 32. DeSart, K., et al., Fate of patients with spinal cord ischemia complicating thoracic endovascular aortic repair. J Vasc Surg, 2013. 58(3): p. 635-42 e2.
- 33. Mehmedagic, I., T. Resch, and S. Acosta, *Complications to cerebrospinal fluid* drainage and predictors of spinal cord ischemia in patients with aortic disease undergoing advanced endovascular therapy. Vasc Endovascular Surg, 2013. 47(6): p. 415-22.
- 34. Damberg, A., et al., *Safety and pitfalls in frozen elephant trunk implantation*. Ann Cardiothorac Surg, 2013. 2(5): p. 669-76.
- 35. Dake, M.D., et al., *The "first generation" of endovascular stent-grafts for patients with aneurysms of the descending thoracic aorta.* J Thorac Cardiovasc Surg, 1998. 116(5): p. 689-703; discussion 703-4.
- 36. Carroccio, A., et al., *Pathophysiology of paraplegia following endovascular thoracic aortic aneurysm repair.* J Card Surg, 2003. 18(4): p. 359-66.
- 37. Grabenwoger, M., et al., Thoracic Endovascular Aortic Repair (TEVAR) for the treatment of aortic diseases: a position statement from the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) and the European Society of Cardiology (ESC), in collaboration with the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). Eur J Cardiothorac Surg, 2012. 42(1): p. 17-24.
- 38. Yuan, X., et al., Conservative management versus endovascular or open surgery in the spectrum of type B aortic dissection. J Vis Surg, 2018. 4: p. 59.
- 39. Greenberg, R.K., et al., *Contemporary analysis of descending thoracic and thoracoabdominal aneurysm repair: a comparison of endovascular and open techniques.* Circulation, 2008. 118(8): p. 808-17.
- 40. Lee, H.C., et al., *Endovascular Repair versus Open Repair for Isolated Descending Thoracic Aortic Aneurysm.* Yonsei Med J, 2015. 56(4): p. 904-12.
- 41. Awad, H., et al., *Spinal cord injury after thoracic endovascular aortic aneurysm repair.* Can J Anaesth, 2017. 64(12): p. 1218-1235.
- 42. Wiiliam G. Spiller, M.D., *Thrombosis of the cervical anterior median spinal artery; syphilitic acute anterior poliomyelitis.* The Journal of Nervous and Mental Disease, 1909. 36(10): p. p 601-613.
- 43. Foo, D. and A.B. Rossier, *Anterior spinal artery syndrome and its natural history*. Paraplegia, 1983. 21(1): p. 1-10.
- 44. Mosberg, W.H., Jr., H.C. Voris, and J. Duffy, *Paraplegia as a complication of sympathectomy for hypertension*. Ann Surg, 1954. 139(3): p. 330-4.

- 45. Cheng, K., M. Perenyei, and R. Sayeed, Anterior spinal artery syndrome from type A aortic dissection in a patient with Marfan syndrome due to a novel fibrillin mutation. J R Coll Physicians Edinb, 2018. 48(2): p. 120-123.
- 46. Rouanet, C., et al., "Man in the Barrel" Syndrome with Anterior Spinal Artery Infarct due to Vertebral Artery Dissection. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017. 26(3): p. e41-e42.
- 47. Wilder, M.J., P.P. Ng, and A.T. Dailey, *Delayed onset of anterior spinal artery syndrome after repair of aortic coarctation*. Spine (Phila Pa 1976), 2012. 37(23): p. E1476-8.
- 48. Yogendranathan, N., et al., A case of anterior spinal cord syndrome in a patient with unruptured thoracic aortic aneurysm with a mural thrombus. BMC Cardiovasc Disord, 2018. 18(1): p. 48.
- 49. Subramaniam, A., A. Pick, and R. Tiruvoipati, *Anterior spinal artery syndrome after double valve replacement and coronary artery bypass surgery*. Clin Case Rep, 2017. 5(5): p. 714-717.
- 50. Servais, L.J., et al., *Anterior spinal artery syndrome after aortic surgery in a child.* Pediatr Neurol, 2001. 24(4): p. 310-2.
- 51. Rovira, M., O. Torrent, and J. Ruscalleda, *Some aspects of the spinal cord circulation in cervical myelopathy.* Neuroradiology, 1975. 9(4): p. 209-14.
- 52. Yazbeck, P.G., et al., *Anterior spinal artery syndrome after percutaneous vertebroplasty*. Spine J, 2011. 11(8): p. e5-8.
- 53. Bredow, J., et al., Anterior spinal artery syndrome: reversible paraplegia after minimally invasive spine surgery. Case Rep Orthop, 2014. 2014: p. 205732.
- 54. Djurberg, H. and M. Haddad, Anterior spinal artery syndrome. Paraplegia following segmental ischaemic injury to the spinal cord after oesophagectomy. Anaesthesia, 1995. 50(4): p. 345-8.
- 55. Baba, H., et al., *Anterior spinal artery syndrome*. Int Orthop, 1993. 17(6): p. 353-6.
- 56. Miyamoto, K., et al., A new and simple method of preventing spinal cord damage following temporary occlusion of the thoracic aorta by draining the cerebrospinal fluid. J Cardiovasc Surg (Torino), 1960. 1: p. 188-97.
- 57. Blaisdell, F.W. and D.A. Cooley, *The mechanism of paraplegia after temporary thoracic aortic occlusion and its relationship to spinal fluid pressure.* Surgery, 1962. 51: p. 351-5.
- 58. Oka, Y. and T. Miyamoto, *Prevention of spinal cord injury after cross-clamping of the thoracic aorta*. Jpn J Surg, 1984. 14(2): p. 159-62.
- 59. Svensson, L.G., et al., *Cross-clamping of the thoracic aorta. Influence of aortic shunts, laminectomy, papaverine, calcium channel blocker, allopurinol, and superoxide dismutase on spinal cord blood flow and paraplegia in baboons.* Ann Surg, 1986. 204(1): p. 38-47.

- 60. Svensson, L.G., P. Klepp, and R.A. Hinder, *Spinal cord anatomy of the baboon-comparison with man and implications for spinal cord blood flow during thoracic aortic cross-clamping.* S Afr J Surg, 1986. 24(1): p. 32-4.
- 61. Safi, H.J., et al., Cerebral spinal fluid drainage and distal aortic perfusion decrease the incidence of neurological deficit: the results of 343 descending and thoracoabdominal aortic aneurysm repairs. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997. 14(2): p. 118-24.
- 62. Coselli, J.S. and S.A. LeMaire, *Left heart bypass reduces paraplegia rates after thoracoabdominal aortic aneurysm repair.* Ann Thorac Surg, 1999. 67(6): p. 1931-4; discussion 1953-8.
- 63. Coselli, J.S., et al., *Cerebrospinal fluid drainage reduces paraplegia after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: results of a randomized clinical trial.* J Vasc Surg, 2002. 35(4): p. 631-9.
- 64. Cambria, R.P., et al., *Clinical experience with epidural cooling for spinal cord protection during thoracic and thoracoabdominal aneurysm repair.* J Vasc Surg, 1997. 25(2): p. 234-41; discussion 241-3.
- 65. Marsala, M., et al., *Panmyelic epidural cooling protects against ischemic spinal cord damage*. J Surg Res, 1993. 55(1): p. 21-31.
- 66. Malatova, Z., et al., *Epidural perfusion cooling protects against spinal cord ischemia in rabbits. An evaluation of cholinergic function.* Mol Chem Neuropathol, 1995. 25(2-3): p. 81-96.
- 67. Mori, A., et al., *An epidural cooling catheter protects the spinal cord against ischemic injury in pigs.* Ann Thorac Surg, 2005. 80(5): p. 1829-33.
- 68. Tabayashi, K., et al., Protection from postischemic spinal cord injury by perfusion cooling of the epidural space during most or all of a descending thoracic or thoracoabdominal aneurysm repair. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2010. 58(5): p. 228-34.
- 69. Motoyoshi, N., et al., *Safety and efficacy of epidural cooling for regional spinal cord hypothermia during thoracoabdominal aneurysm repair.* Eur J Cardiothorac Surg, 2004. 25(1): p. 139-41.
- 70. Strauch, J.T., et al., *Mild hypothermia protects the spinal cord from ischemic injury in a chronic porcine model.* Eur J Cardiothorac Surg, 2004. 25(5): p. 708-15.
- 71. Kieffer, E., et al., *Preoperative spinal cord arteriography in aneurysmal disease of the descending thoracic and thoracoabdominal aorta: preliminary results in 45 patients*. Ann Vasc Surg, 1989. 3(1): p. 34-46.
- 72. Griepp, R.B., et al., Looking for the artery of Adamkiewicz: a quest to minimize paraplegia after operations for aneurysms of the descending thoracic and thoracoabdominal aorta. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996. 112(5): p. 1202-13; discussion 1213-5.
- 73. Etz, C.D., et al., First-in-man endovascular preconditioning of the paraspinal collateral network by segmental artery coil embolization to prevent ischemic spinal cord injury. J Thorac Cardiovasc Surg, 2015. 149(4): p. 1074-9.

- 74. Godet, G., et al., *Cerebrospinal fluid drainage and thoracic endovascular aneurysm repair.* Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2017. 25(9): p. 608-617.
- 75. Acher, C.W., et al., *Combined use of cerebral spinal fluid drainage and naloxone reduces the risk of paraplegia in thoracoabdominal aneurysm repair.* J Vasc Surg, 1994. 19(2): p. 236-46; discussion 247-8.
- 76. Lang-Lazdunski, L., et al., *Riluzole prevents ischemic spinal cord injury caused by aortic crossclamping*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999. 117(5): p. 881-9.
- 77. Ehrlich, M., et al., *Memantine for prevention of spinal cord injury in a rabbit model*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999. 117(2): p. 285-91.
- 78. Wu, S.H., et al., *Erythropoietin attenuates motor neuron programmed cell death in a burn animal model.* PLoS One, 2018. 13(1): p. e0190039.
- 79. Grasso, G., et al., Amelioration of spinal cord compressive injury by pharmacological preconditioning with erythropoietin and a nonerythropoietic erythropoietin derivative. J Neurosurg Spine, 2006. 4(4): p. 310-8.
- 80. Konishi, Y., et al., *Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo*. Brain Res, 1993. 609(1-2): p. 29-35.
- 81. Siren, A.L., et al., *Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(7): p. 4044-9.
- 82. Brines, M. and A. Cerami, *The receptor that tames the innate immune response*. Mol Med, 2012. 18: p. 486-96.
- 83. Fu, Z.Q., et al., *Effect of carbamylated erythropoietin on major histocompatibility complex expression and neural differentiation of human neural stem cells.* J Neuroimmunol, 2010. 221(1-2): p. 15-24.
- 84. Westenfelder, C., D.L. Biddle, and R.L. Baranowski, *Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors.* Kidney Int, 1999. 55(3): p. 808-20.
- 85. Foley, L.S., et al., *Erythropoietin's Beta Common Receptor Mediates Neuroprotection in Spinal Cord Neurons*. Ann Thorac Surg, 2017. 104(6): p. 1909-1914.
- 86. Kitamura, H., et al., *Nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects against tubulointerstitial injury in a unilateral ureteral obstruction model.* Nephrol Dial Transplant, 2008. 23(5): p. 1521-8.
- 87. Calvillo, L., et al., *Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(8): p. 4802-6.
- 88. Colella, P., et al., *Non-erythropoietic erythropoietin derivatives protect from light-induced and genetic photoreceptor degeneration*. Hum Mol Genet, 2011. 20(11): p. 2251-62.
- 89. Ehrenreich, H., et al., *Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial.* Mol Med, 2002. 8(8): p. 495-505.

- 90. Ehrenreich, H., et al., *Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke.* Stroke, 2009. 40(12): p. e647-56.
- 91. Leist, M., et al., *Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic.* Science, 2004. 305(5681): p. 239-42.
- 92. King, V.R., et al., Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. Eur J Neurosci, 2007. 26(1): p. 90-100.
- 93. Xiong, M., et al., *Neuroprotection of erythropoietin and methylprednisolone against spinal cord ischemia-reperfusion injury.* J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011. 31(5): p. 652-6.
- 94. Zhao, H., et al., Erythropoietin delivered via intra-arterial infusion reduces endoplasmic reticulum stress in brain microvessels of rats following cerebral ischemia and reperfusion. J Neuroimmune Pharmacol, 2015. 10(1): p. 153-61.
- 95. Yamanaka, K., et al., Synergetic Induction of NGF With Diazoxide and Erythropoietin Attenuates Spinal Cord Ischemic Injury. J Surg Res, 2019. 233: p. 124-131.
- 96. Barros, A.G.C., et al., *Evaluation of the effects of erythropoietin and interleukin-6 in rats submitted to acute spinal cord injury.* Clinics (Sao Paulo), 2019. 74: p. e674.
- 97. Zhou, Y., et al., Combination Therapy With Hyperbaric Oxygen and Erythropoietin Inhibits Neuronal Apoptosis and Improves Recovery in Rats With Spinal Cord Injury. Phys Ther, 2019.
- 98. Simon, F., et al., Comparison of carbamylated erythropoietin-FC fusion protein and recombinant human erythropoietin during porcine aortic balloon occlusioninduced spinal cord ischemia/reperfusion injury. Intensive Care Med, 2011. 37(9): p. 1525-33.
- 99. Simon, F.H., et al., *Erythropoietin preconditioning improves clinical and histologic outcome in an acute spinal cord ischemia and reperfusion rabbit model.* J Vasc Surg, 2016. 64(6): p. 1797-1804.
- 100. Mares, J.M., et al., Erythropoietin activates the phosporylated cAMP [adenosine 3'5' cyclic monophosphate] response element-binding protein pathway and attenuates delayed paraplegia after ischemia-reperfusion injury. J Thorac Cardiovasc Surg, 2015. 149(3): p. 920-4.
- 101. Smith, P.D., et al., Attenuation of spinal cord ischemia and reperfusion injury by erythropoietin. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011. 141(1): p. 256-60.
- 102. Hirano, K., et al., *Erythropoietin attenuates the sequels of ischaemic spinal cord injury with enhanced recruitment of CD34+ cells in mice.* J Cell Mol Med, 2012. 16(8): p. 1792-802.
- 103. Rao, R.V., H.M. Ellerby, and D.E. Bredesen, *Coupling endoplasmic reticulum stress* to the cell death program. Cell Death Differ, 2004. 11(4): p. 372-80.
- 104. Hayashi, T., et al., Oxidative injury to the endoplasmic reticulum in mouse brains after transient focal ischemia. Neurobiol Dis, 2004. 15(2): p. 229-39.

- 105. Nakagawa, T., et al., *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature, 2000. 403(6765): p. 98-103.
- 106. Oyadomari, S., E. Araki, and M. Mori, *Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells*. Apoptosis, 2002. 7(4): p. 335-45.
- 107. Oyadomari, S. and M. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress.* Cell Death Differ, 2004. 11(4): p. 381-9.
- 108. Brewer, J.W. and J.A. Diehl, *PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(23): p. 12625-30.
- 109. DeGracia, D.J., et al., *Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death.* J Cereb Blood Flow Metab, 2002. 22(2): p. 127-41.
- 110. Kozutsumi, Y., et al., *The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins.* Nature, 1988. 332(6163): p. 462-4.
- 111. Okada, T., et al., Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. Biochem J, 2002. 366(Pt 2): p. 585-94.
- 112. van Laar, T., A.J. van der Eb, and C. Terleth, *Mif1: a missing link between the unfolded protein response pathway and ER-associated protein degradation?* Curr Protein Pept Sci, 2001. 2(2): p. 169-90.
- 113. Meusser, B., et al., *ERAD: the long road to destruction*. Nat Cell Biol, 2005. 7(8): p. 766-72.
- 114. Bole, D.G., et al., *Immunocytochemical localization of BiP to the rough endoplasmic reticulum: evidence for protein sorting by selective retention.* J Histochem Cytochem, 1989. 37(12): p. 1817-23.
- 115. Lee, A.S., *The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications.* Trends Biochem Sci, 2001. 26(8): p. 504-10.
- Shen, J., et al., ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Dev Cell, 2002. 3(1): p. 99-111.
- 117. Bertolotti, A., et al., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response.* Nat Cell Biol, 2000. 2(6): p. 326-32.
- 118. DeGracia, D.J. and H.L. Montie, *Cerebral ischemia and the unfolded protein response.* J Neurochem, 2004. 91(1): p. 1-8.
- 119. Yoshida, H., et al., *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor.* Cell, 2001. 107(7): p. 881-91.
- 120. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation.* Science, 2011. 334(6059): p. 1081-6.

- 121. Abdullah, A. and P. Ravanan, *The unknown face of IRE1alpha Beyond ER stress*. Eur J Cell Biol, 2018.
- 122. Urano, F., et al., *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1.* Science, 2000. 287(5453): p. 664-6.
- 123. Kim, R., et al., *Role of the unfolded protein response in cell death.* Apoptosis, 2006. 11(1): p. 5-13.
- 124. Zhao, P., et al., *c-Jun inhibits thapsigargin-induced ER stress through upregulation of DSCR1/Adapt78.* Exp Biol Med (Maywood), 2008. 233(10): p. 1289-300.
- 125. Shinkai, Y., C. Yamamoto, and T. Kaji, *Lead induces the expression of endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and GRP94 in vascular endothelial cells via the JNK-AP-1 pathway.* Toxicol Sci, 2010. 114(2): p. 378-86.
- 126. Kaneko, M., Y. Niinuma, and Y. Nomura, Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. Biol Pharm Bull, 2003. 26(7): p. 931-5.
- 127. Stehlik, C., et al., Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alphainduced apoptosis. J Exp Med, 1998. 188(1): p. 211-6.
- 128. Tsukahara, T., et al., Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. J Virol, 1999. 73(10): p. 7981-7.
- 129. Shi, Y., et al., *Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control.* Mol Cell Biol, 1998. 18(12): p. 7499-509.
- 130. Shen, J. and R. Prywes, *ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6.* Methods, 2005. 35(4): p. 382-9.
- 131. Schindler, A.J. and R. Schekman, *In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(42): p. 17775-80.
- 132. Shen, J. and R. Prywes, *Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6.* J Biol Chem, 2004. 279(41): p. 43046-51.
- 133. Yamamoto, K., et al., *Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II.* J Biochem, 2004. 136(3): p. 343-50.
- 134. Tabas, I. and D. Ron, Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. Nat Cell Biol, 2011. 13(3): p. 184-90.
- 135. Kaufman, R.J., Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. J Clin Invest, 2002. 110(10): p. 1389-98.
- 136. Taylor, J.P., J. Hardy, and K.H. Fischbeck, *Toxic proteins in neurodegenerative disease*. Science, 2002. 296(5575): p. 1991-5.

- 137. Yamauchi, T., et al., *Impact of the endoplasmic reticulum stress response in spinal cord after transient ischemia.* Brain Res, 2007. 1169: p. 24-33.
- 138. Wang, H., et al., Hydrogen Sulfide Ameliorates Blood-Spinal Cord Barrier Disruption and Improves Functional Recovery by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress-Dependent Autophagy. Front Pharmacol, 2018. 9: p. 858.
- 139. Mizukami, T., et al., Sodium 4-phenylbutyrate protects against spinal cord ischemia by inhibition of endoplasmic reticulum stress. J Vasc Surg, 2010. 52(6): p. 1580-6.
- 140. He, Z., et al., *DI-3-n-butylphthalide improves functional recovery in rats with spinal cord injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.* Am J Transl Res, 2017. 9(3): p. 1075-1087.
- Sakurai, M., et al., Endoplasmic reticulum stress induced in motor neurons by transient spinal cord ischemia in rabbits. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. 130(3): p. 640-5.
- 142. Morishima, N., et al., An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. J Biol Chem, 2002. 277(37): p. 34287-94.
- 143. Rao, R.V., et al., *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway.* J Biol Chem, 2002. 277(24): p. 21836-42.
- 144. Yoneda, T., et al., Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. J Biol Chem, 2001. 276(17): p. 13935-40.
- 145. Nakagawa, T. and J. Yuan, *Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis.* J Cell Biol, 2000. 150(4): p. 887-94.
- 146. Simon, F., et al., *Erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced ischemia/reperfusion injury.* Crit Care Med, 2008. 36(7): p. 2143-50.
- 147. Zivin, J.A. and U. DeGirolami, *Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model.* Stroke, 1980. 11(2): p. 200-2.
- 148. Lang-Lazdunski, L., et al., *Spinal cord ischemia. Development of a model in the mouse.* Stroke, 2000. 31(1): p. 208-13.
- 149. Awad, H., et al., A mouse model of ischemic spinal cord injury with delayed paralysis caused by aortic cross-clamping. Anesthesiology, 2010. 113(4): p. 880-91.
- 150. Smith, P.D., et al., *Ischemic dose-response in the spinal cord: both immediate and delayed paraplegia.* J Surg Res, 2012. 174(2): p. 238-44.
- 151. Wang, Y., et al., *Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia.* Br J Pharmacol, 2007. 151(8): p. 1377-84.

- 152. Basso, D.M., et al., Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. J Neurotrauma, 2006. 23(5): p. 635-59.
- 153. Hwang, J., et al., *Pretreatment with erythropoietin attenuates the neurological injury after spinal cord ischemia*. Spinal Cord, 2012. 50(3): p. 208-12.
- 154. Tator, C.H. and M.G. Fehlings, *Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms*. J Neurosurg, 1991. 75(1): p. 15-26.
- 155. Zhou, K., et al., *The Temporal Pattern, Flux, and Function of Autophagy in Spinal Cord Injury.* Int J Mol Sci, 2017. 18(2).
- 156. Wang, L., et al., *Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats.* J Neurotrauma, 2009. 26(1): p. 55-66.
- 157. Li, X.Q., et al., Intrathecal antagonism of microglial TLR4 reduces inflammatory damage to blood-spinal cord barrier following ischemia/reperfusion injury in rats. Mol Brain, 2014. 7: p. 28.
- 158. Liu, L., et al., *ER stress related factor ATF6 and caspase-12 trigger apoptosis in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy.* Int J Clin Exp Pathol, 2015. 8(6): p. 6960-6.
- 159. Zhao, L., et al., *Dexmedetomidine attenuates neuronal injury after spinal cord ischaemia-reperfusion injury by targeting the CNPY2-endoplasmic reticulum stress signalling.* J Cell Mol Med, 2019. 23(12): p. 8173-8183.
- 160. Dong, Y., et al., *Neuroprotective effects and impact on caspase-12 expression of tauroursodeoxycholic acid after acute spinal cord injury in rats.* Int J Clin Exp Pathol, 2015. 8(12): p. 15871-8.
- 161. Yu, Z., et al., *The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis.* Exp Neurol, 1999. 155(2): p. 302-14.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

6.2 Tabellenverzeichnis

Fab. 1: BMS Austestung der Clampingzeit 5 min.	46	
Tab. 2: BMS Austestung der Clampingzeit 6 min	46	
Tab. 3: BMS Austestung der Clampingzeit 7 min	47	
Tab. 4: BMS Austestung der Clampingzeit 8 min.	47	
Tab. 5: BMS 6 und 24 Stunden Gesamtreperfusionszeitraum.	48	

Danksagung

Herrn PD. Dr. med. Florian Simon danke ich für die Möglichkeit, unter seiner herzlichen und ehrlichen Betreuung als Doktorvater meine Doktorarbeit erstellen zu dürfen. Ich bedanke mich für die enge Begleitung auf meinem Weg. Durch Forderung und Förderung meiner Person wurde ich Schritt für Schritt vorangebracht. Darüber hinaus danke ich für die vielen Stunden an Arbeit, die Du in die Verbesserung meiner Fähigkeiten und meine wissenschaftliche Ausbildung gesteckt hast.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig für die Chance, in seiner Klinik meine Dissertation erstellen zu dürfen.

Zudem gilt mein besonderer Dank Frau Dr. rer. nat. Wiebke Ibing für die Ausbildung und Einarbeitung im Labor sowie die tatkräftige Unterstützung bei der Etablierung der Versuche und der Durchführung der Laborarbeiten.

Mein Dank gilt auch Frau Astrid Hoffmann, die mich zu jeder Zeit im Labor unterstützte, mir auch in Zeiten von Frustration stets zur Seite stand und mir zurück auf die richtige Bahn verhalf.

Weiterhin möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester für die bedingungslose Unterstützung bedanken, auf die ich mich zu jeder Zeit verlassen kann.

Ich bedanke mich zudem bei Frau Dr. med. Maya-Lynn Leonhardt. Mit Dir an meiner Seite kann ich jegliche Herausforderung annehmen.